



“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Maestría en Ciencias en Sanidad Vegetal

Trabajo de Tesis

**Morfología, proceso infeccioso y sensibilidad
a fungicidas comerciales de tres aislados de
Gaeumannomyces spp en Nicaragua**

Autor

Ing. Ronald Misael Rivera Rivas

Asesor

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

**Managua, Nicaragua
Septiembre, 2021**





“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Maestría en Ciencias en Sanidad Vegetal

Trabajo de Tesis

**Morfología, proceso infeccioso y sensibilidad
a fungicidas comerciales de tres aislados de
Gaeumannomyces spp en Nicaragua**

Autor

Ing. Ronald Misael Rivera Rivas

Asesor

Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz

Presentado a la consideración del honorable tribunal
examinador como requisito final para optar al grado
de Maestro en Ciencias

**Managua, Nicaragua
Septiembre, 2021**



Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Maestro en Ciencias en Sanidad Vegetal

Miembros del Tribunal Examinador

Presidente (Grado académico y
nombre)

Secretario (Grado académico y
nombre)

Vocal (Grado académico y nombre)

Lugar y Fecha: _____

DEDICATORIA

A mis padres, quienes con su ejemplo han inculcado en mí el valor del esfuerzo y el trabajo duro para lograr mis metas.

A mis abuelos, quienes con sus palabras han promovido el hambre por el conocimiento y el deseo de superación.

A los ángeles que me cuidan desde el cielo y que de una u otra manera me acompañaron en estos primeros 10 años académicos de mi vida, Luis Mario Merlo Baca, Manuel de Jesús Rivera Romero, Bismark Rivera Romero, Douglas Romero Orozco, Yahoska Saraí Rivera y Manuel Rivera Martínez.

A mi mentor y más grande amigo, Ing. Leonel Rodríguez, quien ha brindado su confianza, apoyo, motivación, sabiduría, paciencia, experiencia y conocimientos en los últimos años.

A mi gran amor, Esmilse Carolina Palacios Jirón, por su apoyo, motivación, paciencia y ánimos brindados en este tiempo lleno de sacrificios para poder culminar este estudio.

A mis hermanas, mi sobrina y personas más cercanas que siempre escucharon los retos que se presentaron en este largo camino y me dieron sus ánimos.

Ing. Ronald Misael Rivera Rivas

AGRADECIMIENTO

A Dios, su hijo Jesucristo y al Espíritu santo por acompañarme cada día y cada momento de esta bonita travesía académica, por su sabiduría, su protección y ayuda para lograr cumplir esta meta de vida que desde pequeño me propuse.

A las empresas arroceras AGRÍCOLA MIRAMONTES S.A., ARROCERA VENLLANO S.A y AGRÍCOLA SANTA ISABELLA S.A. por la apertura y confianza de abrir sus puertas y permitir la recolección de los aislados participantes de este estudio.

Al Dr. Jorge Ulises Blandón Díaz, por su tiempo, atención y confianza, quien desde que le propuse esta idea creyó en mí y en la importancia de este estudio.

Al Dr. Edgardo Jiménez y todos los que hacen posible esta maestría, por su motivación para tomar este reto, la oportunidad de brindarme acceso a las instalaciones de la UNA siempre que lo solicité y por sus sabios consejos estos años.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Microbiología de la UNA, Danessa, Isaías, Rudy, Markelyn y Eliezer, por su apoyo y paciencia. Siempre estuvieron a disposición para colaborar.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA por financiar este estudio, permitir uso de equipos de laboratorio e instalaciones, y por supuesto, por la beca brindada.

Al Dr. Gustavo Prado por su guía y asesoramiento para llevar a cabo este estudio.

Al Ing. Freddy Palacios, por permitir la recolección de plantas y suelo utilizado para la descripción del proceso infeccioso sobre tallos y vainas en condiciones de invernadero.

Ing. Ronald Misael Rivera Rivas

ÍNDICE DE CONTENIDO

| SECCIÓN | PÁGINA |
|--|---------------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTO | ii |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | i |
| ÍNDICE DE CUADROS | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iv |
| ÍNDICE DE ANEXOS | v |
| RESUMEN | vi |
| ABSTRACT | vii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 Objetivo general | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos | 3 |
| III. MARCO DE REFERENCIA | 4 |
| 3.1 Importancia del cultivo de arroz | 4 |
| 3.2 Agente causal del “Mal de pie” del arroz | 4 |
| 3.2.1 Ubicación taxonómica de <i>Gaeumannomyces</i> spp. | 5 |
| 3.2.2 Biología | 6 |
| 3.2.3 Aislamiento | 7 |
| 3.2.4 Identificación a nivel de especies | 8 |
| 3.3 Manejo del mal de pie | 8 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| 4.1 Ubicación del estudio | 11 |
| 4.2 Diseño metodológico | 12 |
| 4.2.1 Recolección de muestras | 12 |
| 4.2.2 Reconocimiento del patógeno | 13 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.3 Aislamiento del patógeno | 13 |
| 4.2.4 Medio de cultivo | 14 |
| 4.3 Manejo de los ensayos | 15 |
| 4.3.1 Características morfológicas de los aislados | 15 |
| 4.3.2 Proceso infeccioso de aislados sobre la superficie de tallos y vainas de arroz | 15 |
| 4.3.3 Sensibilidad de los aislados a fungicidas comerciales | 16 |
| 4.4 Variables evaluadas | 17 |
| 4.4.1 Características macroscópicas de los aislados | 17 |
| 4.4.2 Características microscópicas de los aislados | 18 |
| 4.4.4 Proceso infeccioso de aislados sobre la superficie de tallos y vainas de arroz. | 19 |
| 4.4.5 Sensibilidad de aislados a fungicidas comerciales | 19 |
| 4.5 Análisis de datos | 19 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 23 |
| 5.1 Características morfológicas de los aislados | 23 |
| 5.1.1 Características macroscópicas de los aislados | 23 |
| 5.1.2 Características microscópicas de los aislados | 28 |
| 5.2 Identificación de especies a partir de las características de los aislados | 28 |
| 5.3 Proceso infeccioso de los aislados sobre tallos y hojas de arroz | 31 |
| 5.4 Sensibilidad de aislados a fungicidas comerciales | 38 |
| VI. CONCLUSIONES | 48 |
| VII. RECOMENDACIONES | 49 |
| VIII. LITERATURA CITADA | 50 |
| IX. ANEXOS | 56 |

ÍNDICE DE CUADROS

| CUADRO | | PÁGINA |
|--------|--|--------|
| 1. | Ubicación taxonomía de <i>Gaeumannomyces</i> spp | 5 |
| 2. | Tratamientos evaluados en el ensayo de sensibilidad <i>Gaeumannomyces</i> spp | 17 |
| 3. | Escala de severidad de <i>Gaeumannomyces</i> en hojas y tallos de arroz (Salazar, 2014) | 20 |
| 4. | Características macroscópicas de los aislados AMSA, AV y ASI en medio de cultivo PDA-SM-S-A | 26 |
| 5. | Resumen de los aislados identificados en el estudio | 29 |
| 6. | Características microscópicas de las especies <i>G. oryzinus</i> y <i>G. oryicola</i> reportadas por Hernández-Restrepo <i>et al.</i> (2016) | 30 |
| 7. | Características microscópicas de estructuras reproductivas de <i>G. oryzinus</i> recopiladas por Walker 1972, Hernández-Restrepo <i>et al.</i> (2016) y aislados AMSA y AV | 30 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | | PÁGINA |
|--------|---|--------|
| 1. | Ubicaciones de fincas arroceras involucradas en el estudio | 12 |
| 2. | Escala diagramática de severidad de <i>Gaeumannomyces</i> spp en hojas (Salazar, 2014) | 21 |
| 3. | Escala diagramática de <i>Gaeumannomyces</i> spp en tallos (Salazar, 2014) | 22 |
| 4. | Aislados de <i>Gaeumannomyces</i> spp. seis días después de iniciar su proceso de incubación en medio PDA-SM-S-A | 24 |
| 5. | Cultivo de arroz con lesiones a nivel de tallo ocasionadas por <i>Gaeumannomyces</i> spp en Arrocería Venllano, Malacatoya, Granada | 25 |
| 6. | Peritecios de aislados de AMSA y AV desarrollados en el medio SM-A | 27 |
| 7. | Infección de los aislados ASI, AV y AMSA sobre tallos de arroz de 0 a 3 ddi | 32 |
| 8. | Infección de los aislados ASI, AV y AMSA sobre tallos de arroz de 5 a 17 ddi | 33 |
| 9. | Infección de los aislados ASI, AV y AMSA sobre tallos de arroz de 21 a 44 ddi | 34 |
| 10. | Estructuras obtenidas de la prueba de infección de tres aislados de <i>Gaeumannomyces</i> spp | 37 |
| 11. | Inhibición micelial promedio de los aislados de AMSA, ASI y AV | 38 |
| 12. | Inhibición micelial lograda por fungicidas comerciales sobre aislados de <i>Gaeumannomyces</i> spp | 39 |
| 13. | Inhibición micelial resultado de la interacción fungicidas y aislados de <i>Gaeumannomyces</i> spp. | 42 |
| 14. | Inhibición de aislados de <i>Gaeumannomyces</i> spp. por Tacre Bacillus Plus [®] | 43 |
| 15. | Inhibición micelial de aislados de <i>Gaeumannomyces</i> spp por Amistar 50WG [®] | 44 |
| 16. | Inhibición micelial de aislados de <i>Gaeumannomyces</i> spp por Funibiol-K [®] | 45 |
| 17. | Inhibición micelial de aislados de <i>Gaeumannomyces</i> spp por Alto 10SL [®] | 46 |
| 18. | Inhibición micelial de aislados de <i>Gaeumannomyces</i> spp. por Amistar Xtra 28SC [®] | 47 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| ANEXO | | PÁGINA |
|-------|---|--------|
| 1. | Afectaciones por <i>Gaeumannomyces</i> spp. en Agrícola Santa Isabella S.A. Sébaco, Matagalpa. Nicaragua | 56 |
| 2. | Recolección de plantas de arroz afectadas por <i>Gaeumannomyces</i> spp. en las empresas arroceras consideradas en el estudio | 56 |
| 3. | Etapas del arroz para la obtención de semolina, ingrediente utilizado en los medios de cultivo en el presente estudio | 57 |
| 4. | Peritecios de <i>Gaeumannomyces</i> spp. germinados en el medio de cultivo PDS-SM-S-A y colonización en medio SM-A | 57 |
| 5. | <i>Gaeumannomyces</i> spp. en medio SM-A con abundante producción de peritecios | 58 |
| 6. | Peritecio maduro con presencia de ascosporas | 58 |
| 7. | Ascas y ascosporas vacuoladas obtenidas de aislados AVSA y AMSA | 59 |
| 8. | Fungicidas comerciales evaluados sobre los aislados de <i>Gaeumannomyces</i> spp. | 60 |
| 9. | Evaluación de crecimiento micelial durante ensayo de sensibilidad a fungicidas comerciales | 60 |
| 10. | Diluciones seriadas realizadas para obtener colonias del fungicida biológico Tacre Bacillus Plus [®] | 61 |
| 11. | Análisis de varianza del estudio de inhibición micelial de los aislados para determinar sensibilidad a fungicidas comerciales y sus separaciones de medias por Tukey ($\alpha=0.05$). | 62 |

RESUMEN

El hongo *Gaeumannomyces* spp causante de la enfermedad conocida como “mal de pie” es el patógeno radicular más importante de cereales y pastos en el mundo. En Nicaragua se reporta como plaga oficial en 2010, vinculándole a pérdidas de hasta el 20% de rendimientos en campos de arroz. A la fecha en el país, se desconoce su biología y las medidas de manejo más adecuadas. Por consiguiente, esta investigación se emprendió con el objetivo de caracterizar tres aislados desde el punto de vista morfológico, describir su proceso infeccioso y la sensibilidad a cinco fungicidas comerciales. Para la caracterización morfológica se recolectaron muestras de plantas arroz afectadas por el patógeno, en tres zonas arroceras donde se ha observado su presencia. Para la descripción del proceso infeccioso en tallos y hojas se estableció un ensayo *in vivo* en diseño completamente al azar en invernadero, con la variedad de arroz INTA Dorado. La evaluación de sensibilidad de los aislados a fungicidas, se utilizó la técnica del cultivo dual y medio envenenado. Para la caracterización morfológica y del proceso infeccioso se realizó un análisis descriptivo de las variables evaluadas, mientras que para las pruebas de sensibilidad a fungicidas se realizó un ANDEVA. Los aislados mostraron características morfológicas similares, y dos de ellos produjeron peritecios con alto número de ascas y ascosporas, cuyas dimensiones corresponden con la especie *Gaeumannomyces orizynus* (Sacc.). En el invernadero los tres aislados generaron lesiones con centro decolorado y bordes oscuros, las cuales avanzaron hacia la base de la planta, hasta secar las vainas de las hojas y reducir la firmeza del tallo, facilitando el acame de la planta. Los tres aislados mostraron sensibilidad diferenciada a los fungicidas comerciales evaluados.

Palabras clave: *Ophiobolus*, *Oryza sativa*, pudrición de la vaina, sintomatología, inhibición.

ABSTRACT

Gaeumannomyces spp causal agent of the disease known as "take all" is the most important root pathogen of cereals and grasses in the world. In Nicaragua it was officially reported as pest in 2010, linking it to yield losses of up to 20% in rice fields. To date in the country, its biology and the appropriate management are unknown. Consequently, this investigation was undertaken with the objective of characterizing the morphology of three isolates, describing their infectious process and the sensitivity to five commercial fungicides. For the morphological characterization, samples of rice affected by the pathogen were collected in three rice-growing areas where its presence has been observed. For the description of the infectious process in stems and leaves, an *in vivo* trial was conducted in a completely randomized design in greenhouse with INTA Dorado rice variety. In evaluating the sensitivity of the isolates to fungicides, the dual culture technique and poisoned medium was used. For the morphological characterization and the infectious process, a descriptive analysis of the evaluated variables was carried out, while for the fungicide sensitivity tests an ANOVA was performed. The isolates showed similar morphological characteristics, and two of them were able to generate perithecia with a high number of asci and ascospores, whose dimensions coincide with the species *Gaeumannomyces orizynus* (Sacc.). In the greenhouse, the three isolates generated lesions with a discolored center and dark edges, which advanced towards the base of the plant, until the leaf sheath dried up and the stem firmness was reduced, facilitating the lodging of the plant. The three isolates showed differentiated sensitivity to the commercial fungicides evaluated.

Keywords: *Ophiobolus*, *Oryza sativa*, crown sheath rot, symptomatology, inhibition.

I. INTRODUCCIÓN

Los cereales constituyen el elemento más importante de la dieta humana. Solamente el maíz, arroz y trigo representan aproximadamente el 42.5 % del suministro de calorías alimentarias del mundo. En el plano mundial, su contribución a la aportación de proteínas, que ronda el 37%, se ve apenas superada por los productos pesqueros y ganaderos (FAO, 2016).

En el caso específico del arroz (*Oryza sativa* L.) es el alimento más importante para la humanidad, el cual es consumido a diario por la mitad de las personas en todo el mundo (IRRI, 2018). Es cultivado en más de cien países que producen más de 700 millones de toneladas de arroz al año, siendo los países asiáticos los que concentran el 90% de la producción mundial. Brasil, Estados Unidos, Egipto, Madagascar y Nigeria juntos producen 5% (FAO, 2018).

En Nicaragua, el arroz es uno de los cultivos más importantes en el sector agropecuario nacional y al mismo tiempo uno de los principales alimentos en la dieta de los nicaragüenses, su aporte energético dentro de la canasta básica es del 14%. La actividad arrocera genera un equivalente a 190.70 millones de dólares a nivel nacional y alrededor de 75 mil puestos de trabajo directos e indirectos al año (ANAR, 2014).

A pesar de registrar cosechas récord en 2016 (741.56 millones de toneladas) y 2017 (756.7 millones de toneladas) a nivel mundial (FAO, 2017), son cada vez más los retos que afronta la producción de arroz. Aspectos climáticos, edafológicos, disponibilidad de agua, plagas, malezas y por supuesto los problemas fitosanitarios son con más frecuencia acusados por los productores.

La alta incidencia de enfermedades fungosas en el cultivo ha provocado grandes pérdidas en los agroecosistemas arroceros en Latinoamérica. En lo que respecta a Nicaragua y sus agroecosistemas arroceros, son varios los microorganismos que se reportan como patógenos en el cultivo. El INTA (2012) en su manual de síntomas de enfermedades y plagas asociadas reporta a *Pyricularia grisea* Sacc, *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium oryzae*, *Sarocladium oryzae* y *Ustilaginoidea virens* como patógenos del reino fungi que afectan al cultivo.

No obstante, desde 2015 diversas fincas de las zonas arroceras del país reportan la aparición de un patógeno fungoso conocido como *Gaeumannomyces*, el cual, según los productores puede reducir hasta 20% el rendimiento del cultivo.

El hongo *Gaeumannomyces* provoca la enfermedad del “mal de pie” o “pie negro”, al punto de convertirse en el patógeno más importante a nivel radicular de los cereales y pastos en el mundo (Hernández-Restrepo *et al.* 2016). Según comunicaciones verbales con el Dr. Gustavo Prado ¹ y Dr. Jorge Góngora², este ascomicete ha provocado grandes pérdidas en regiones de clima frío, en cultivos como el trigo y la avena, sin embargo, ha sido encontrado en los agroecosistemas arroceros de la región latinoamericana desde inicios de la década anterior y recientemente en países como Costa Rica y Nicaragua.

Por un lado, solamente Prabhu y Filippi (2002), Garrido (2009), Salazar (2014), Briones (2014) y Martínez *et al.* (2014) han reportado a *Gaeumannomyces* como patógeno del arroz en Brasil, Perú, Colombia y Cuba respectivamente. Sumado a esto únicamente Salazar (2014) hace referencia a la sintomatología que presenta en la planta. Por otro lado, en lo que respecta a posibles alternativas de control sobre *Gaeumannomyces* en arroz, solamente se hace referencia a *Trichoderma* (Garrido, 2009).

El MAGFOR (2010) reportó de manera oficial la presencia de *Gaeumannomyces* en los agroecosistemas arroceros de Nicaragua. A pesar de ello la gran mayoría de productores aún desconocen su biología, su proceso infeccioso y las medidas de control más adecuadas, es por ello que el presente estudio pretendió caracterizar la morfología de tres aislados provenientes de tres zonas arroceras de Nicaragua, identificar la(s) especie(s) presentes, describir su proceso infeccioso y por último evaluar su sensibilidad *in vitro* a fungicidas comerciales.

¹ Comunicación personal. Dr. Gustavo Prado, Asesor fitopatológico Agrícola Miramontes SA.

² Comunicación personal. Dr. Jorge Góngora, Asesor en área de Fitopatología, Melones de Nicaragua SA y Agropecuaria Ponte.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Generar información científica sobre las características morfológicas, identificación a nivel de especie, proceso infeccioso y sensibilidad a fungicidas comerciales de tres aislados de *Gaeumannomyces* spp obtenidos de tres zonas arroceras de Nicaragua.

2.2 Objetivos específicos

- Describir las características morfológicas de aislados de *Gaeumannomyces* spp provenientes de tres zonas arroceras de Nicaragua.
- Identificar la(s) especie(s) de *Gaeumannomyces* spp presente(s) en tres zonas arroceras de Nicaragua.
- Describir el proceso infeccioso de aislados de *Gaeumannomyces* spp sobre la superficie de tallos y vainas de arroz bajo condiciones de invernadero.
- Evaluar la sensibilidad de aislados de *Gaeumannomyces* spp a fungicidas comerciales en condiciones de laboratorio.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Importancia del cultivo de arroz

Con una cosecha anual conjunta de unos 2 500 millones de toneladas, el arroz (*Oryza sativa* L.), el maíz (*Zea mays* L) y el trigo (*Triticum durum* L.) son los productos más extensamente cultivados en el mundo y constituyen la base de la seguridad alimentaria mundial (FAO, 2016). El arroz es cultivado en más de cien países que producen más de 700 millones de toneladas de arroz al año, siendo los países asiáticos los que concentran un 90% de la producción mundial. Otro 5% es producido por países como Brasil, Estados Unidos, Egipto, Madagascar y Nigeria (FAO, 2018).

El cultivo de arroz en la región Centroamericana tiene una media productiva de 3.1 toneladas por hectárea de cultivo. Nicaragua para el año 2011 logró apenas rendimientos de 2.5 toneladas métricas incluyendo áreas de riego y secano (INTA y FONTAGRO, 2012). El Plan de Producción, Consumo y Comercio presentado por el Banco Central de Nicaragua (BCN) (2017) detalla que las áreas de riego debían alcanzar 50,700 hectáreas aproximadamente y que la meta productiva sería de 213 mil toneladas métricas, logrando un rendimiento promedio de 4.2 toneladas por hectárea.

Lo anterior representa el 67% del consumo nacional, dicha producción en su gran mayoría se distribuye en los departamentos de Río San Juan, Chontales, Boaco, Granada, León y Matagalpa (Baca, 2018). Estos sistemas productivos son establecidos de manera sucesiva al menos dos veces al año durante los meses julio a noviembre y noviembre a marzo.

3.2 Agente causal del “Mal de pie” del arroz

El monocultivo intensivo doble y triple de arroz en Asia se asocia al agotamiento de micronutrientes del suelo, al incremento de toxicidad en el suelo y la incidencia elevada de plagas y enfermedades (Singh *et al.*, 2009).

La producción arroceras dos veces al año es una costumbre se repite año con año en los sistemas productivos arroceros de Nicaragua, lo que ha favorecido el desarrollo del patógeno de raíces *Gaeumannomyces* spp. Según productores en la zona de Malacatoya, Granada, San Lorenzo,

Boaco y Sébaco, Matagalpa han observado como año con año la presencia de este ascomicete ha incrementado en sus campos.

3.2.1 Ubicación taxonómica de *Gaeumannomyces* spp.

Gaeumannomyces spp es un ascomicete que fue previamente ubicado en el orden Diaporthales. Sin embargo, nexos con especies del género Magnaporthe fueron identificados y este fue transferido a la familia Magnaporthaceae, la cual aún tendría que asignársele un orden (Cannon, 1994). Este género fue establecido por Von Arx & Olivier (1952) para acomodar *Ophiobolus graminis* Sacc., anteriormente descrita como *Rhaphidophora graminis* Sacc.

Briones (2014) hace referencia a la taxonomía del patógeno, la cual se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Ubicación taxonomía de *Gaeumannomyces* spp.

| | |
|-----------|--|
| Dominio | Eucariotas |
| Reino | Fungi |
| Phyllum | Ascomycota |
| Subphylum | Pezizomycotina |
| Clase | Sordariomycetes |
| Orden | Magnaporthales |
| Familia | Magnaporthaceae |
| Género | <i>Gaeumannomyces</i> |
| Especie | <i>graminis</i> , <i>orizinus</i> , <i>glynicola</i> |
| Variedad | <i>graminis</i> , <i>avenae</i> , <i>triticici</i> |

Prabhu & Filippi (2002); Peixoto *et al.* (2013); Salazar (2014); Martínez *et al.* (2014) han reportado a *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (Ggg) como el patógeno causante del mal de pie en el cultivo de arroz en la región latinoamericana. Además de la variedad *graminis* Freeman & Ward (2004) detallan tres variedades más dentro de la especie mencionada, siendo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt), *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae* (Gga) y *Gaeumannomyces graminis* var. *maydis* (Ggm) anteriormente reportadas por diversos autores (Walker, 1981; Deacon, 1981; Elliot *et al.*, 1993 y Yao *et al.*, 1992).

En un amplio estudio realizado por Hernández-Restrepo *et al.* (2016) donde se involucró 83 aislados de *Gaeumannomyces* y *Harpophora* (*Phialophora*) estado anamorfo de *Gaeumannomyces*, se hace mención de *G. oryzaicola*, *G. fusiformis*, *G. graminis* y *G. oryzae* todas ellas aisladas como patógenos del cultivo de arroz. Esta última especie mencionada fue introducida como *Ophiobolus oryzae* por Saccardo en 1916, creciendo en tallos en vías de descomposición en la especie *Oryza sativa* en Filipinas. Más tarde fue tratado como un sinónimo de *Ggg* por Walker (1972), que estudió los holotipos de ambas especies y concluye que son la misma especie. Sin embargo, Hernández-Restrepo *et al.* (2016) concluyen a través de análisis filogenético que *G. graminis* y *G. oryzae* (*O. oryzae*) son especies distintas.

3.2.2 Biología

Según Cook (2003) el ciclo de la enfermedad tiene dos fases distintivas, una saprofitica y otra parasítica. En su fase saprofitica, el hongo permanece como micelio en los residuos del cultivo o en otras gramíneas (malezas), usando este sustrato como fuente de alimentación para atacar al próximo cultivo. La fase parasítica toma lugar cuando las raíces de una nueva planta entran en contacto con el micelio del hongo, el cual coloniza la zona radical y penetra los tejidos (MacNish, 1994).

El hongo coloniza el sistema radicular y la base del tallo de la planta de arroz al producir dos tipos de hifas conocidas como de crecimiento y las infecciosas. Las hifas de crecimiento son oscuras, septadas, con paredes gruesas y a menudo crecen sobre la superficie de las raíces y tallos formando hebras miceliales, mientras las hifas infecciosas son hialinas con paredes delgadas y penetran el tejido del huésped (Peixoto *et al.*, 2013).

Hawerth *et al.* (2017) registraron el proceso de infección del patógeno indicando que a los 15 días después de la inoculación (ddi) el patógeno coloniza la epidermis, exodermis y células del esclerenquima. A los 20 ddi el hongo penetra hasta el cilindro central de la planta y se observa una intensa colonización de la base del tallo, lo que trae consigo la formación de micelio en el haz y envés en la vaina de las hojas. A los 25 ddi *Gaeumannomyces* spp entra en contacto con el parénquima, haces vasculares y espacios vacíos del tallo. Los primeros peritecios aparecen 30 ddi en la vaina de la primera hoja.

Además, se puede adicionar que *Gaeumannomyces* desarrolla abundante micelio, y dentro de este, se desarrollan hifopodios. Según Walker (1975) estas estructuras tienen una función fijadora y de penetración, pero su presencia no es indispensable para que la infección ocurra (Money, 1998) (Frederick *et al.*, 1998).

Posteriormente al alcanzar su estado de madurez el patógeno emite peritecios en abundancia, estos son de color oscuro, esféricos formados en las vainas de las plantas. Dentro de los peritecios se desarrollan ascas, que contienen ascosporas (Walker, 1975).

3.2.3 Aislamiento

Acorde con Datnoff *et al.* (1997) para el aislamiento de *Gaeumannomyces* es necesario, observar si hay presencia de peritecios en el tejido de la planta. Estos se retiran de las vainas de las hojas, se colocan en una gota de agua destilada estéril en un portaobjetos y se manipulan para inducir la liberación de ascosporas.

La suspensión de ascosporas resultante se extiende sobre agar agua al 2% y se agregan 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina. Los platos se incuban a 25°C. Después de 24 h, se retirarán los aislados de ascosporas germinantes individuales y se colocan en el medio de cultivo PDA o agar agua con 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina para mantenimiento. Los cultivos puros deben mantenerse a temperatura ambiente bajo luz fluorescente continua o diurna o en incubadora a 25°C bajo un fotoperíodo de 12 h. Bajo estas condiciones el hongo debería de producir abundantes peritecios después de cuatro a seis semanas de crecimiento (Datnoff *et al.*, 1997).

Elliott (1993) detalla que para aislar este patógeno pueden tomarse partes de raíz infectada o tejido del tallo. Los tejidos se desinfectan superficialmente durante 30 segundos en solución de nitrato de plata al 1%, se enjuagan durante 30 segundos en agua estéril, se dejan secar sobre papel filtro y se colocan en PDA con 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de sulfato de estreptomicina o bien en el medio SM-GGT7 (Datnoff *et al.*, 1997).

El medio SM-GGT7 es un medio específico para los géneros *Gaeumannomyces* spp, *Phialophora* sp, y *Magnaportheae* que contiene 39 gramos de PDA, 100 mg de estreptomicina, 10 mg de diclorán, 10 mg de metalaxil, 50 mg de vinclozolina, 1 mg de CGA-

173506 y 500 mg de L-dopa por litro de agua desionizada. Los antibióticos y fungicidas se agregan al PDA esterilizado y enfriado a 50°C (Elliott, 1991).

3.2.4 Identificación a nivel de especies

El conocer la sintomatología y estructuras del patógeno en el cultivo de arroz permiten lograr la identificación en campo al menos a nivel de género. Al lograr el aislamiento de un posible patógeno es necesario comprobar si se trata del organismo que causa la sintomatología observada en campo. Una herramienta muy útil para ello son las pruebas de patogenicidad (Castaño, 1986).

La patogenicidad se define como la alteración que ocasiona un parásito sobre una o varias de las funciones esenciales de la planta, donde con frecuencia el parasitismo tiene una importante (aunque no esencial) función. Por lo tanto, en las pruebas de patogenicidad se mide la capacidad de los organismos para generar esa alteración o parasitismo. Así, en la mayoría de los casos el parasitismo se encuentra estrechamente relacionado con la patogenicidad, debido a que la capacidad que tiene el parásito de invadir y establecerse en su hospedante por lo general provoca el desarrollo de una enfermedad en este último (Agrios, 1996).

Una vez asegurado de que se tiene el agente causal aislado, es momento de proceder a una identificación con mayor grado de detalle. Esta generalmente precisa el uso de claves taxonómicas, que permiten comparar las estructuras observadas a nivel de laboratorio con las ya registradas tras años de caracterización de un organismo.

Para la identificación de especies de *Gaeumannomyces* solo Hernández-Restrepo *et al.* (2016) hacen un amplio registro fotográfico de las características morfológicas para las 19 especies actualmente conocidas (anteriormente siete, se descubren 12 especies más en el estudio en mención).

3.3 Manejo del mal de pie

El manejo del mal de pie del arroz es una temática pobremente documentada y peor aún es difícil de lograr debido a la ausencia de variedades resistentes y la poca disponibilidad de fungicidas efectivos (Nunes, 2008; Peixoto *et al.* 2014; Prabhu & Filippi, 2002). Caso contrario ocurre para

el mal de pie del trigo (Ggt), para el cual su manejo ha sido ampliamente estudiado en Europa, Norteamérica y Suramérica.

En lo que refiere a tratamientos químicos para *Gaeumannomyces* se reportan casos exitosos como el Triadimenol y Fluquinconazole en tratamiento de semilla (Bockus, 1983; Vera *et al.* 2014; Dawson & Bateman, 2000), Azoxistrobina aplicado foliarmente (Jenkyn y Gutteridge, 2002), Difeconazol + Propiconazol (Briones, 2014), Tebuconazol, Difeconazol y Silthiofam (se reporta resistencia a este último por parte de Ggt) (Yun *et al.* 2012), a pesar de lograr resultados positivos ninguno de estos logra control total del patógeno.

Además de lo anterior, es importante tener en cuenta que *Gaeumannomyces* es transmitido vía suelo y que puede habitar como saprofito en rastrojos, lo que obliga a especialistas y productores a optar por estrategias integrales de manejo, que incluyan prácticas culturales, botánicas y biológicas.

Ennaïfar *et al.* (2005) argumenta que prácticas culturales como el establecimiento de especies distintas al trigo entre cosechas logra disminuir la incidencia del mal de pie, pero solo cuando se mantienen las prácticas de labranza convencional, además de ello registra una mayor incidencia en campos donde persiste trigo voluntario. Esto fue confirmado por Jenkyn *et al.* (2013) quien manifiesta que la presencia de rastrojos y hospederos de *Gaeumannomyces* garantizan el mantenimiento y aumento del inóculo en los campos.

Por otro lado, Durán *et al.* (2017), hacen referencia a “suelos supresivos” definidos como “condiciones edáficas en las que las plantas sufren menos afectaciones por patógenos de suelo que lo que deberían, principalmente por acción del microbiota existente”. Supresión que comprobó en seis de nueve suelos evaluados en Chile. Años atrás bajo esta misma línea de estudio Cook & Rovira (1976) indican que cepas de *Pseudomonas fluorescens* podrían estar involucradas en el antagonismo ocurrido en suelos supresivos.

A pesar de que Hiddink *et al.* (2005) registraron una mayor eficacia de control sobre mal de pie del trigo en suelos manejados de forma convencional que en suelos bajo manejo orgánico al aplicar *P. fluorescens* cepa Pf32-*gfp*, concluyeron que esta cepa no jugaba un papel crítico en la supresión total del patógeno, sino que apuntan a que otros géneros bacterianos tienen un papel adicional que logra inhibir el crecimiento y/o actividad del patógeno.

Dentro de estos posibles géneros bacterianos hay uno en especial que ha logrado destacar. Diversos autores han reportado al género *Bacillus* como un excelente controlador biológico de *Gaeumannomyces*. Yang *et al.* (2015) incluso reporta que el control de *Bacillus subtilis* cepa YB-05 fue mejor que tratamientos químicos sobre Ggt.

Nuevamente Yang *et al.* (2018) por segunda vez registran que *Bacillus subtilis* cepa YB-57 logra inhibir hasta en 60.9% el crecimiento micelial y a su vez disminuir 56.5% la incidencia del patógeno, con una efectividad similar a la del fungicida sintético silthiofam. Estos resultados concuerdan con los obtenidos también por Liu *et al.* (2009), Zhang *et al.* (2017a) y Zhang *et al.* (2017b) empleando la misma bacteria (cepas E1R-j, Pnf-12 y Z14 correspondientemente) sobre *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*.

Otra opción de manejo son los extractos de plantas, los cuales en los últimos años han venido ganando protagonismo en los programas de manejo de enfermedades. Zapata *et al.* (2011) en Chile, registró inhibición hasta del 100% al incorporar cuatro gramos de corteza molida de la especie *Drimys winteri* al medio de cultivo de este ascomicete, Por su parte Yang *et al.* (2019) evaluaron 17 plantas medicinales contra varios hongos patógenos, incluido *Gaeumannomyces*, a nivel *in vitro*, logrando porcentajes de inhibición máximos de 58.7% con la especie *Syzygium aromaticum* (L.).

Por último, un aspecto importante a desarrollar para el manejo de Ggg debe de ser la resistencia varietal. Peixoto *et al.* (2014) en Brasil evaluaron la resistencia de 58 variedades a este patógeno, de las cuales solamente dos resultaron resistentes. En Nicaragua *Gaeumannomyces* es un organismo que recientemente se ha identificado como patógeno en el cultivo de arroz, lo que no ha permitido al gremio trabajar en la identificación u obtención de cultivares adecuados para afrontar las afectaciones de este ascomicete.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del estudio

El estudio fue desarrollado en dos etapas, una etapa de campo para la recolección de muestras de plantas de arroz afectadas por el patógeno y una etapa de laboratorio para la caracterización morfológica, la identificación a nivel de especie, seguimiento al proceso infeccioso y la sensibilidad del patógeno a fungicidas comerciales.

La etapa de campo se desarrolló en tres zonas arroceras de Nicaragua durante el periodo febrero a octubre de 2020 en las que se seleccionaron tres fincas (Figura 1) que corresponden a:

Finca 1: Agrícola Miramontes SA, dedicada a la producción arroceras desde 2012, donde los suelos son explotados en sistema monocultivo desde los años 70's. Hoy en día se cultivan entre 4 000 a 5 000 hectáreas de este rubro. Se ubica a 120 km de la capital del país, en el municipio de San Lorenzo, Boaco (12°07'54" N; 85°43'07" O) a una altitud de 50 metros sobre el nivel del mar (msnm).

Según la estación meteorológica de la finca, la temperatura oscila entre 23°C y 33°C en temporada húmeda y alcanza cerca de los 38°C en temporada seca. El régimen pluvial alcanza los 1 500 mm en promedio anualmente y se registran humedades relativas desde 75% a 90%. En cuanto al componente edáfico, García (1990) los describe como suelos de arcilla negra y aluviales de arcilla parda, del tipo 2:1 montmorillonita, orden vertisol, con un pH 6 y pendiente nivelada (0.5%).

Finca 2: Arroceras Venllano S.A. establecida en los años 90's, cultiva alrededor de 2 000 hectáreas, al año. Se ubica en la zona de Malacatoya, Granada (12°08'52" N; 85°53'45" O). Una zona que agrupa un gran número de productores que suman unas 8 000 a 10 000 ha de cultivo. Sus suelos vertisoles, muy ricos en contenidos minerales, sobre todo bases intercambiables, pH de neutro a alcalino, conformados mayormente por arcillas montmorillonita del tipo 2:1, precipitaciones anuales próximas a los 1 300 mm, temperaturas próximas a los 27°C y a 40 msnm (Romero, 1999).

Finca 3: Agrícola Santa Isabella S.A. (ASI) fundada en 2018 en las proximidades del pueblo de Chagüitillo, municipio de Sébaco, Matagalpa (12°53'25" N; 86°05'26" O). Cultiva 200 hectáreas por año, con suelos vertisoles, de textura arcillosa, pH neutro a alcalinos, contenidos

medios de materia orgánica por haber estado más de una década en barbecho. De clima semi a húmedo tropical, la temperatura media anual oscila entre los 26°C y 28°C, precipitaciones anuales varían de los 800 a 1 300 mm y a 470 msnm (MTI, 2010).

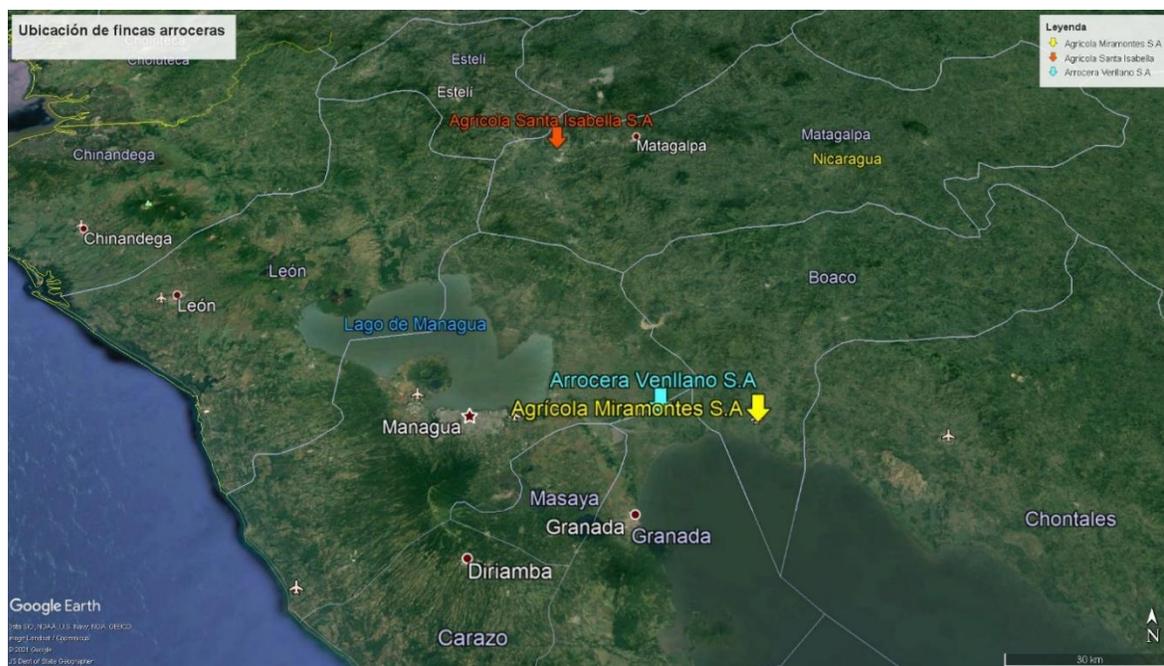


Figura 1. Ubicación de fincas arroceras involucradas en el estudio.

La segunda etapa fue realizada durante el periodo noviembre 2020 a junio 2021 se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y en el invernadero del Departamento de Protección Agrícola y Forestal (DPAF) de la Universidad Nacional Agraria (UNA) ubicada en Managua, en el kilómetro 12 de la carretera Panamericana Norte.

4.2 Diseño metodológico

4.2.1 Recolección de muestras

Para la recolección de muestras de plantas de arroz se realizaron recorridos por las unidades productivas, priorizando lotes u áreas de cultivo donde ciclos anteriores se presentó la enfermedad.

Una vez en campo, se usó la escala diagramática propuesta por Salazar (2014) que permite la cuantificación del grado de afectación de la enfermedad en el cultivo. Se realizó muestreo

destrutivo (plantas extraídas con todo el sistema radicular) sobre plantas con grado 5 y 6 de daño que además presentaban peritecios sobre las vainas de las hojas. Estas se introdujeron en bolsas plásticas transparentes con agua para hidratarlas mientras se trasladaron al laboratorio manteniéndolas a 25°C.

4.2.2 Reconocimiento del patógeno

Para el reconocimiento del patógeno a nivel de género en las muestras recolectadas en campo se utilizó un estereoscopio, microscopio, bisturí, porta y cubre objetos, agua y lactofenol, con los cuales se realizaron montajes de tejido vegetal de la siguiente manera:

1. Se realizaron dos cortes transversales en el tallo, el primero a unos cinco centímetros por debajo y el segundo a cinco centímetros por encima de donde se presentaba el síntoma de la lesión del patógeno.
2. Mediante el estereoscopio (lente objetivo 4X) se procedió a observar la presencia de micelio, peritecios e hifopodios. Al encontrarse estas estructuras en el tejido, se realizó un corte longitudinal con el bisturí de la parte superior del tejido de aproximadamente 0.5 mm de grueso, 10 mm de largo y 4 mm de ancho.
3. El corte del tejido se ubicó en un portaobjetos, en el cual previamente se aplicó una gota de lactofenol para facilitar la observación de las estructuras. Por último, se colocó un cubreobjetos y el montaje en el microscopio.
4. En el microscopio se identificaron hifas, hifopodios, peritecios, ascas y ascosporas del hongo *Gaeumannomyces* spp. y posterior a ello se procesó el tejido vegetal para el aislamiento de este.

4.2.3 Aislamiento del patógeno

Los tallos con presencia de hifas, hifopodios y peritecios fueron cortados con una tijera a 20 cm de altura. A los tallos se les retiró la vaina de la hoja, y estas vainas fueron colocadas sobre papel toalla en el estereoscopio con el lado interno expuesto hacia los objetivos del equipo. Con el lente objetivo 2X se ubicaron los peritecios que se encontraban en la vaina. Los peritecios seleccionados exponían una estructura globosa y turgente, con ascosporas aún dentro de ellos.

Los peritecios fueron retirados con ayuda de una aguja de disección, previamente sumergida en alcohol al 90% y flameada. Se depositaron cuatro peritecios por cada plato Petri, asignando cinco platos por finca y se incubaron a 25°C por tres días. Al cuarto día con ayuda de un sacabocado de cinco milímetros de diámetro se extrajo parte del micelio sin contaminantes para lograr el aislamiento.

A los aislados de cada finca se les codificó conforme sus siglas, siendo “AMSA” para el aislado de Agrícola Miramontes, “AV” para el aislado de Arrocería Venllano y “ASI” para el aislado de Agrícola Santa Isabella.

4.2.4 Medio de cultivo

En el estudio se utilizaron dos medios de cultivo. Uno contenía Papa Dextrosa Agar (PDA) (39 g L⁻¹), semolina de arroz, (25 g L⁻¹), agar-agar (20 g L⁻¹) y sacarosa (5 g L⁻¹), que fue nombrado como “PDA-SM-S-A”. El otro medio de cultivo contenía semolina de arroz (25 g L⁻¹) y agar-agar (20 g L⁻¹) y se nombró “SM-A”. Los ingredientes utilizados fueron sugeridos por el Dr. Gustavo Prado, quien ya los había utilizado un medio de cultivo muy similar en 2001.

El medio de cultivo que contenía PDA fue utilizado para aislar y evaluar las características macroscópicas de los aislados y su sensibilidad a fungicidas comerciales. Mientras que el otro medio de cultivo fue utilizado exclusivamente para obtener estructuras reproductivas del hongo.

Para mezclar la semolina de arroz con los demás ingredientes, fue previamente cocida y tamizada. Para la cocción se utilizó un Erlenmeyer, en el cual se agregó la semolina a razón de 10 g por cada 100 ml de agua destilada, se selló con papel craft y masking tape. Se calentó en un microondas hasta hervir. Posterior a ello se enfrió por cinco minutos. La solución se tamizó y vertió en una probeta graduada, sin incluir el remanente sólido de la semolina. Se mezcló con los demás ingredientes y se aforó con agua destilada, para realizar la esterilización en autoclave a 120°C por 15 minutos.

Posteriormente el medio de cultivo fue enfriado a 50°C y se agregó ácido láctico al 25% a razón de una gota por cada 10 ml de medio. El medio PDA-SM-S-A utilizado en el proceso de aislamiento fue suplementado con Sulfato de Estreptomicina a razón de 0.1 g por litro de medio, con el objetivo de reducir las posibilidades de contaminación por bacterias.

4.3. Manejo de los ensayos

4.3.1 Características morfológicas de los aislados

Se registraron las características morfológicas a nivel macro y microscópico de los aislados. Para determinar las características macroscópicas se establecieron seis platos Petri de 85 mm de diámetro con 20 ml del medio PDA-SM-S-A, suplementado con ácido láctico al 25% (una gota por cada 10 ml de medio). Cada uno con un disco del aislado de ocho milímetros en el centro. Se incubaron a 25°C, sin luz por seis días.

Para las características microscópicas se establecieron diez platos de 85 mm de diámetro con 15 ml del medio SM-A, suplementado con ácido láctico al 25% (una gota por cada 10 ml de medio). A cada plato se le depositaron de tres a cuatro discos de ocho milímetros del aislado correspondiente, se incubaron a 25°C, sin luz hasta generar estructuras reproductivas.

4.3.2 Proceso infeccioso de aislados sobre la superficie de tallos y vainas de arroz

Se estableció una prueba de infección de los aislados sobre plantas de arroz en condiciones de invernadero del DPAF. Esta consistió en inocularlas para determinar si los aislados eran capaces de generar la infección y registrar el proceso infeccioso. Para ello se utilizaron macetas de polipropileno con capacidad de dos litros a las cuales se trasplantaron plantas de variedad INTA DORADO. Se utilizaron cinco plantas por aislado y se dejaron cinco plantas sin inocular como testigo absoluto.

Las plantas provinieron de la empresa Arrocería Palacios propiedad del Ing. Freddy Palacios, cuya unidad productiva se ubica en el km 32 carretera Tipitapa a El Timal (12°14'49''N, 86°02'36''O), lugar de donde también se extrajo el suelo con el que se llenaron las macetas. El suelo no fue esterilizado, esto porque las inoculaciones fueron únicamente a nivel de vainas y tallos. Y también, para mantener la presencia de microflora benéfica que pueden proteger a la planta de la infección ya que al esterilizar el suelo se pierde ese efecto (Walker, 1981).

a. Inoculación del patógeno

Para brindar condiciones favorables al patógeno, se ajustó lo realizado por Salazar (2014) y Prado *et al.* (2001) procediendo a inocularse las plantas con dos discos de ocho milímetros de diámetro con el patógeno purificado en el medio PDA-SM-S-A. Los discos se ubicaron en la

inserción de la hoja tres y cuatro (contando de arriba hacia abajo). Una vez realizada la inoculación, la parte media de la planta fue cubierta por una bolsa transparente de polipropileno, la cual fue sujeta con ligas de hule en los extremos, para poder contener de 5 a 15 mm de agua dentro de la bolsa y así simular una cámara húmeda (Figura 7).

Las plantas fueron inoculadas cuando estas se encontraban en etapa R1 (Counce *et al.* 2000) teniendo en cuenta lo expresado por Peixoto *et al.* (2013) y Salazar (2014) en cuanto a la virulencia de *Gaeumannomyces* en esta etapa fenológica.

b. Manejo agronómico del cultivo

Previo al trasplante, en la finca del Ing. Freddy Palacios el cultivo había recibido el equivalente a 180 kg ha⁻¹ de Nitrógeno, 70 kg ha⁻¹ de Fósforo y 120 kg ha⁻¹ de Potasio, 40 kg ha⁻¹ de Azufre y 15 kg ha⁻¹ de Zinc. Al trasplante se agregó en el riego un fertilizante líquido orgánico (FERTIBIOL, 5 ml L⁻¹ de agua) que contenía por litro, 83.1 g de Nitrógeno, 40.8 g de Potasio, 12.2 g de Ácidos Húmicos, 42.6% de Ácidos Fúlvicos, trazas de Calcio, Magnesio, Azufre y Hierro y 54.88 g de Carbono Orgánico, para ayudar a la planta a un mejor establecimiento en las maceteras. El suministro de agua se realizó cada 72 horas, tratando de mantener una lámina de riego aproximadamente 2 – 5 cm.

c. Registro de síntomas

Las plantas fueron revisadas cada 72 a 120 horas para registrar los síntomas y el avance de las lesiones. Se desprendió la liga superior que sujetaba la bolsa de polipropileno y se drenó el agua para fotografiar las plantas.

4.3.3 Sensibilidad de los aislados a fungicidas comerciales

a. Establecimiento de ensayo de sensibilidad *in vitro*

Se estableció un ensayo *in vitro* para evaluar la sensibilidad de los tres aislados a tres fungicidas químicos, un botánico y un biológico mediante la técnica de medio envenenado (Shravelle, 1961) y cultivo dual (Dal Bello *et al.* 1994). El ensayo se estableció en un diseño completo al azar (DCA) con seis repeticiones. Se repitió en dos ocasiones.

La técnica de medio envenenado se utilizó con los fungicidas de síntesis química y con el botánico, debido a su composición y modo de acción. Esta consistió en agregar la dosis

comercial sugerida en el panfleto del producto conforme los volúmenes de agua (53 L ha⁻¹) utilizados en las aplicaciones aéreas que se realizan en las fincas arroceras de donde provienen los aislados. Lo anterior fue realizado utilizando un dispensador y pipetas serológicas graduadas estériles. Los fungicidas fueron agregados al medio PDA-SM-S-A previamente acidificado cuando tenía una temperatura próxima a los 50°C.

Para la metodología de cultivo dual primeramente se establecieron diluciones seriadas (Koch, 1883) del fungicida biológico en medio Agar Nutriente, para obtener colonias de *Bacillus*. Posterior a ello se colocaron discos de 8 mm del antagonista y de los aislados de *Gaeumannomyces*, ubicados a cuatro centímetros de distancia uno del otro. Los testigos fueron discos con el patógeno aislado de cada finca.

Los tratamientos fueron incubados por seis días en una incubadora Fisher Thermo Scientific® a 25°C, con cero horas luz hasta su evaluación.

b. Tratamientos evaluados

A continuación, se describen los tratamientos evaluados en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en el ensayo de sensibilidad *Gaeumannomyces* spp.

| Fungicida Comercial | Ingrediente Activo | Concentración (g L ⁻¹) | Dosis Comercial (ha) |
|----------------------|---|------------------------------------|----------------------|
| Amistar 50 WG® | Azoxistrobina | 500 | 0.25 Kg |
| Alto 10 SL® | Ciproconazol | 100 | 0.39 L |
| Amistar Xtra 28 SC® | Azoxistrobina + Ciproconazol | 200 + 80 | 0.49 L |
| Funibiol-K® | Extracto de <i>Eucalyptus globulus</i> | 50 | 1.0 L |
| Tacre Bacillus Plus® | <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. licheniformis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i> | 20 | 1.41 L |

4.4 Variables evaluadas

4.4.1 Características macroscópicas de los aislados

Se realizaron observaciones cada 72 horas a los platos Petri inoculados obtenidos de la primera generación del proceso de purificación en el medio PDA-SM-A-S y SM-A. En las observaciones se registró:

- a) Color y textura de la colonia

- b) Forma de crecimiento o colonización del medio
- c) Diámetro de colonia (mm)
- d) Formación de estructuras reproductivas

Para las primeras dos variables se realizaron revisiones visuales de los platos Petri. En cuanto al diámetro de colonia, se calculó a partir de la longitud del radio, la cual se multiplicó por dos. Este fue medido con una regla transparente graduada en milímetros a los seis días de incubación, para ello se trazaron dos líneas perpendiculares, que dividían los platos en cuatro partes y que coincidían en el centro de los platos. Se establecieron seis repeticiones por aislado.

Se realizaron observaciones hasta los 42 días de incubación de los aislados para determinar si formaban estructuras reproductivas. Una vez formadas se verificaron con la ayuda del estereoscopio y el microscopio.

4.4.2 Características microscópicas de los aislados

Las características microscópicas correspondieron a las dimensiones de las estructuras reproductivas e hifas generadas por los aislados y fueron tomadas conforme la metodología descrita por French y Hebert (1980) con un microscopio Carl Zeiss Axiostar Plus y un micrómetro ocular.

Se realizaron 30 medidas por tipo estructura para cada aislado, definiendo su dimensión en micras (μm). Se registró el ancho de las hifas, el ancho y largo de peritecios, ascas y ascosporas. El largo del peritecio se midió desde la base hasta el borde del ostiolo, mientras que el ancho se tomó en la mitad de la zona globosa, sin considerar el cuello de este. El ancho de las ascas y ascosporas se tomó en la parte media de estas estructuras, mientras que el largo se tomó de vértice a vértice.

4.4.3 Identificación de especies a partir de las características de los aislados

Una vez concluida la caracterización morfológica se procedió a la identificación de especie(s) en los aislados, comparando las características obtenidas con las reportadas por Hernández-Restrepo *et al.* (2016).

4.4.4 Proceso infeccioso de aislados sobre la superficie de tallos y vainas de arroz

Para la descripción del proceso de infección de los aislados se implementó la escala diagramática de severidad en hojas y tallos elaborada por Salazar (2014) que se presenta en el Cuadro 4 y Figuras 2 y 3. A su vez se registró fotográficamente el proceso de desarrollo de lesiones a nivel visual de los aislados sobre los tallos inoculados. Se realizaron observaciones a los 3, 5, 9, 12, 17, 21, 27, 33 y 44 días después de la inoculación (ddi).

4.4.5 Sensibilidad de aislados a fungicidas comerciales

Para la evaluación de los tratamientos establecidos con la técnica de medio envenenado se midió el crecimiento radial de los aislados utilizando la misma metodología descrita en la caracterización morfológica. En el tratamiento evaluado por cultivo dual, se midió el avance del micelio sobre una línea trazada a la mitad del plato Petri. Tomando las mediciones a los seis días después de establecido el ensayo.

La sensibilidad de los aislados se determinó a partir del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM), utilizando las medidas de los testigos y los tratamientos y calculado mediante la fórmula empleada por Michereff *et al.* (1994) que se detalla a continuación.

$$ICM (\%) = \left(\frac{CMT - CMTr}{CMT} \right) \times 100$$

Donde, ICM (%) es el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, CMT corresponde a la longitud media del crecimiento micelial testigo y CMTr es la longitud media del crecimiento micelial en los tratamientos.

4.5 Análisis de datos

Los datos fueron organizados en una base de datos en el programa Microsoft Excel® versión 2019. Los datos de la caracterización morfológica y sobre el proceso infeccioso se analizaron de forma descriptiva.

Los datos del ensayo de sensibilidad fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANDEVA) y al encontrarse diferencias significativas se procedió a realizar una separación de medias por Tukey ($\alpha = 0.05$) con el software Infostat (2017).

Cuadro 3. Escala de severidad de *Gaeumannomyces* en hojas y tallos de arroz (Salazar, 2014).

| Grado | Sintomatología |
|-------|--|
| 1 | Hojas Comienza la aparición de un color naranja en el ápice de la hoja y empieza a extenderse por un costado de esta hacia la parte basal, hasta un 10% de la lámina foliar. |
| | Tallo Comienza la aparición del micelio del hongo de color gris verdoso hifas delgadas, que se asemejan a raíces diminutas que empiezan a crecer en tallo de la planta, que pasan casi imperceptibles al ojo humano. |
| 2 | Hojas La coloración naranja se extiende por el borde de la hoja hacia la nervadura central y empieza a descender hacia la base de la hoja. Hasta un 20% de la lámina foliar. |
| | Tallo El micelio se empieza a ver a simple vista y adquiere una tonalidad más oscura y avanza envolviendo el tallo de la planta. |
| 3 | Hojas La coloración naranja avanza hacia la parte basal de la hoja y empieza a afectar la nervadura central, hasta un 30% de la lámina foliar. |
| | Tallo El micelio del hongo ya ha envuelto la totalidad el tallo de la planta y empieza a la vaina de la hoja a tomar una coloración café clara. |
| 4 | Hojas El extremo de la hoja ya presenta una coloración naranja intensa y abarca hasta un 40% de la lámina foliar. |
| | Tallo La base del tallo adquiere un color café oscuro con pequeñas vetas negras. |
| 5 | Hojas El extremo apical de la hoja empieza a doblarse hacia el haz y la coloración naranja abarca hasta un 50% de la lámina foliar. |
| | Tallo En la base del tallo la lesión se encuentra en los primeros 5 a 10 cm del suelo, la base del tallo se empieza a debilitar y se empiezan a evidenciar muerte de macollos. |
| 6 | Hojas La hoja presenta un color anaranjado intenso y se extiende a lo largo de la hoja esta coloración abarca por encima del 51% de la hoja. |
| | Tallo La base del tallo está completamente de color café oscuro y negro, la planta en su base está totalmente blanda se empiezan a observar gran cantidad de micelio. |



Figura 2. Escala diagramática de severidad *Gaeumannomyces* spp en hojas (Salazar, 2014).



Figura 3. Escala diagramática de severidad en tallos (Salazar, 2014).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Características morfológicas de los aislados

5.1.1 Características macroscópicas de los aislados

a) Color y textura de la colonia

En el medio PDA-SM-S-A la coloración de la colonia de los aislados AMSA, AV y ASI fue inicialmente hialina a blanca en su centro. Conforme su envejecimiento las colonias empezaron a tomar una coloración grisácea oscura desde el centro hacia los bordes donde el micelio era más joven. Posteriormente las hifas que se desarrollaban sobre la base del micelio, mientras que las que presentaron un crecimiento aéreo presentaron una coloración blanca (Figura 4).

La textura de los bordes de crecimiento fue lisa inicialmente para los aislados AMSA, AV y ASI, conforme su envejecimiento cambió a algodonosa. Las hifas mantuvieron forma de hebras individuales y agrupadas, al agruparse tomaban un color más oscuro.

En el medio SM-A la coloración de los aislados AMSA, AV y ASI fue inicialmente hialina, color café oscuro, hasta tomar una apariencia gris oscuro a negro. La textura fue lanosa, sin embargo, posterior al día 12, los aislados generaron micelio aéreo de color blanco y textura algodonosa. A pesar de ser medios diferentes a los utilizados por Peixoto *et al.* (2013) y Hernández-Restrepo *et al.* (2016), estas características de color y textura fueron relacionadas a las especies *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (Sacc) Von Arx & Olivier y *Gaeumannomyces oryzinus* Sacc.

El reconocimiento de estas características resulta muy importante, pues otros hongos como *Rhizoctonia* y *Nakataea* pueden presentarse en la misma zona de la planta y al aislarlos para determinar con exactitud la especie presente se requiere tener claras estas características.

b) Forma de crecimiento o colonización del medio

Las colonias de los tres aislados tuvieron un crecimiento de tipo circular, con bordes filiformes por la presencia de hifas en forma de hebras individuales y agrupadas. Los aislados AV, AMSA y ASI tuvieron la capacidad de colonizar los bordes de los platos que tuviesen una ligera capa de medio, e incluso crecer sobre el Parafilm utilizado para sellar los platos Petri. Los tres aislados tuvieron un crecimiento superficial, ya que no colonizaron el fondo de la placa Petri.

Este tipo de colonización fue reportado también por Peixoto *et al.* (2013), lo que indica la capacidad de crecimiento del hongo al tener mínimas condiciones para su nutrición. Este crecimiento sobre los bordes de los platos y el Parafilm es muy similar al encontrado en tallos de arroz, cuando *Gaeumannomyces* infecta vainas de hojas maduras y alcanza vainas más jóvenes (Figura 5), tal y como lo describe Saccardo (1916).

Lo anterior confirma la gran capacidad de colonización de este patógeno, que es capaz de colonizar raíces desde etapas iniciales del cultivo y posteriormente ubicarse en la base de la planta aún en condiciones de inundación.

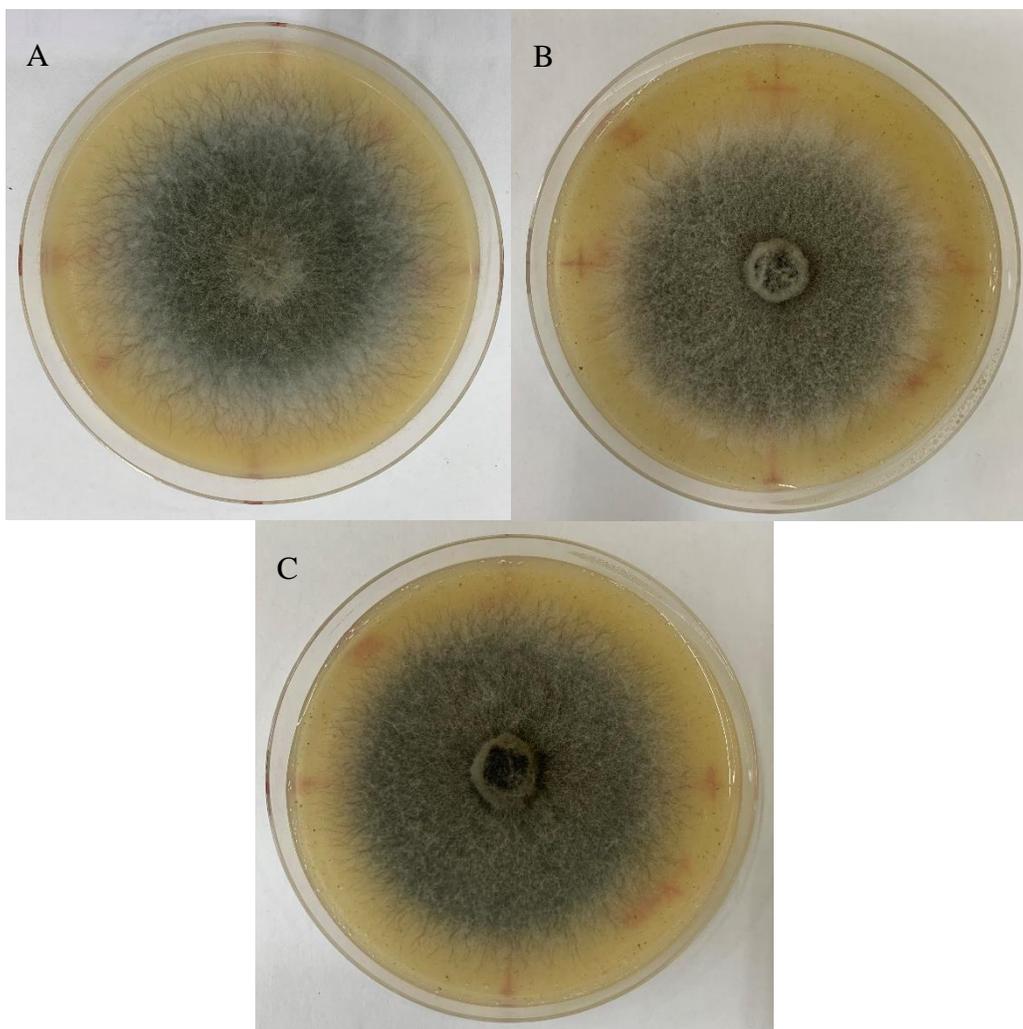


Figura 4. Aislados de *Gaeumannomyces* spp seis días después de iniciar su proceso de incubación en medio PDA-SM-S-A. A. Aislado AV. B. Aislado AMSA. C. Aislado ASI.

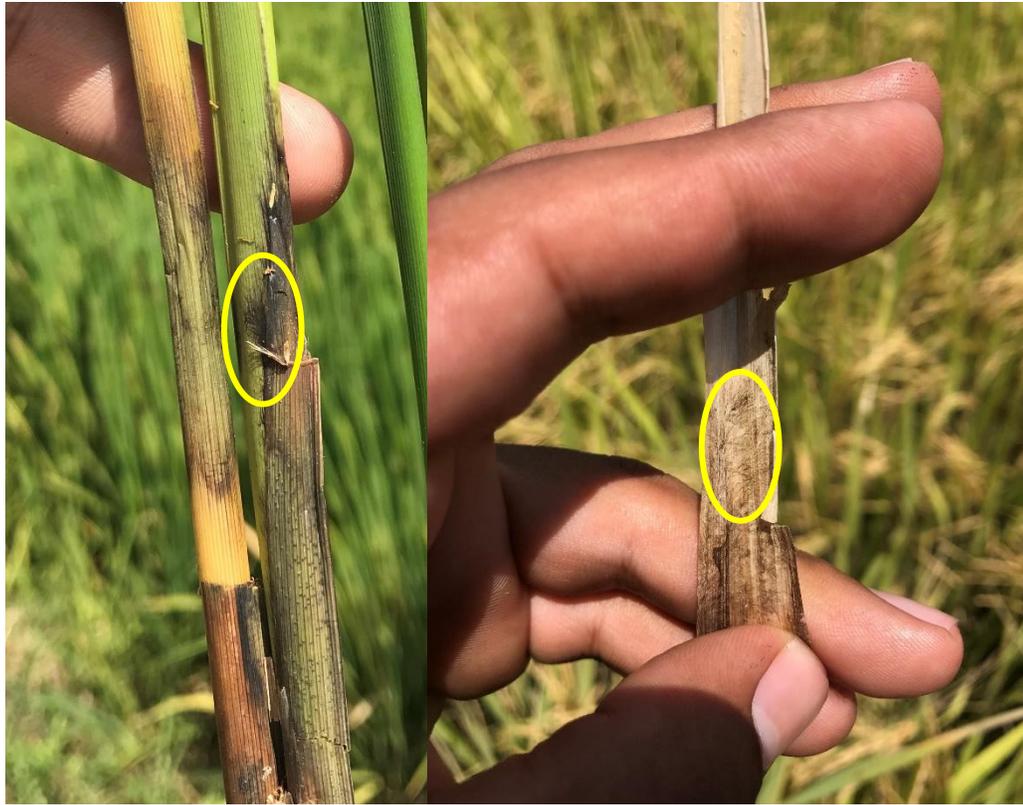


Figura 5. Cultivo de arroz con lesiones a nivel de tallo ocasionadas por *Gaeumannomyces* spp en Arrocería Venllano, Malacatoya, Granada.

c) Diámetro de colonia

En el medio PDA-SM-S-A los tres aislados se comportaron de forma similar en cuanto a su crecimiento radial en los dos medios de cultivos utilizados, puesto que colonizaron la totalidad del plato en seis días. Las lecturas indican que el aislado ASI registró un crecimiento radial de 6.33 mm día^{-1} y un diámetro de 75.9 mm a los seis días de establecido. Para el aislado AMSA fue de 5.54 mm día^{-1} y un diámetro de 66.5 mm al día seis de incubado, mientras que el aislado AV logró un crecimiento radial de 6.49 mm día^{-1} y un diámetro de 77.9 mm , todas en condiciones de incubadora a 25°C y cero horas luz. Hernández-Restrepo *et al.* (2016) reporta que el diámetro a los seis días en medio PDA para varias especies de *Gaeumannomyces* oscila entre los 75 mm y 80 mm , coincidiendo con lo reportado en este estudio.

A continuación, en el Cuadro 4 se resumen las características macroscópicas de los aislados estudiados:

Cuadro 4. Características macroscópicas de los aislados AMSA, AV y ASI en medio de cultivo PDA-SM-S-A.

| Característica de la colonia | Aislado | | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | AMSA | AV | ASI |
| Color | Hialino a gris oscuro | Hialino a gris oscuro | Hialino a gris oscuro |
| Textura | Lanosa a algodonosa al envejecer | Lanosa a algodonosa al envejecer | Lanosa a algodonosa al envejecer |
| Forma de colonización | Circular | Circular | Circular |
| Forma del borde | Filamentoso | Filamentoso | Filamentoso |
| Diámetro (mm) a los 6 días de incubación | 66.5 | 77.9 | 75.9 |

d) Formación de estructuras reproductivas

Durante el crecimiento de los aislados de *Gaeumannomyces*, se observó que estos en el medio PDA-SM-S-A solamente generaron hifas septadas, de color hialino a oscuro en sus paredes. Se distinguieron claramente dos tipos de hifas, unas agrupadas y con paredes gruesas y oscuras, y otras más finas, con paredes delgadas, con coloración hialina. Peixoto *et al.* (2013) y Hawerth *et al.* (2017) las definen como macro hifas corredoras o colonizadoras y micro hifas infecciosas, estas últimas encargadas de invadir internamente los tejidos del hospedero.

En el medio de cultivo SM-A, un medio con menor contenido de nutrientes que el medio PDA-SM-S-A, los aislados si generaron estructuras reproductivas. De los tres aislados en estudio, únicamente ASI formó hifopodios después del día 15, inicialmente tuvieron un color hialino y al madurar su coloración fue más oscura. Este aislado no formo peritecios.

Solamente los aislados AMSA y AV, después de tres semanas en incubación, desarrollaron peritecios inmaduros, de forma globosa y paredes color café oscuro. Los peritecios tardaron de cinco a ocho días en madurar, cambiando su coloración a negro, aumentando su tamaño y generando un cuello, de longitud y ancho variable, con presencia de ostiolo (Figura 6).

Los peritecios se encontraban rodeados de hifas hialinas con paredes oscuras, debido a las concentraciones de melanina que este patógeno sintetiza (Money *et al.*, 1998).

En el amplio estudio descriptivo que hace Hernández-Restrepo *et al.* (2016), únicamente detallan dos especies que generan peritecios y ascosporas en condiciones *in vitro* (medio Agar-Extracto de Malta-MEA), las cuales corresponden a *Gaeumannomyces oryziphila* M. Hern.-Restr. & Crous y *Gaeumannomyces oryzinus* Sacc.

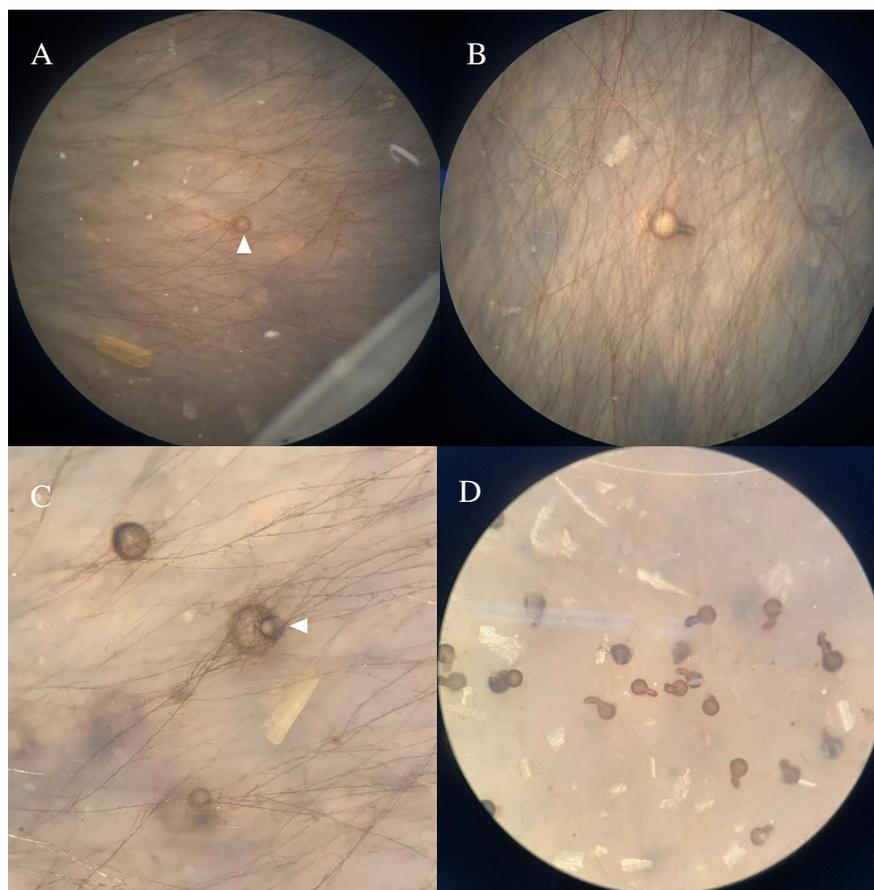


Figura 6. Peritecios de aislados de AMSA y AV desarrollados en el medio SM-A. A. Peritecio inmaduro (Vista 4X) AV. B. Peritecio maduro (vista 6.3X) AV. C. Ostiolo presente en peritecios (vista 6.3X) AV. D. Conglomerado de peritecios desarrollados en el fondo del plato Petri. (Vista 4X) AMSA.

En los peritecios del aislado AMSA no fue posible diferenciar las ascas, únicamente las ascosporas, mientras que en el aislado AV si fue posible observar la presencia de ascas hialinas, alargadas y clavadas, con pared celular bien definida. Las ascas contenían de seis a ocho ascosporas. Estas estructuras para los aislados AMSA y AV fueron de forma alargada sinuosa,

con terminaciones redondeadas, de coloración oscura en sus bordes y vacuoladas. Estas en masa tenían una coloración amarillenta. En las ascosporas no pudo diferenciarse la presencia de septos. En las examinaciones de los tres aislados no se observaron células conidiógenas. Las estructuras y sus características descritas coinciden nuevamente para las especies anteriormente mencionadas, con la excepción de que estas sí produjeron células conidiógenas en MEA.

5.1.2 Características microscópicas de los aislados

Las características microscópicas de los aislados AMSA, AV y ASI se detallan en el Cuadro 5 y 6. Al no generar estructuras reproductivas, del aislado ASI únicamente se midió el ancho de sus hifas que oscilo de 2.8 a 5.3 μm . Para los aislados AMSA y AV el ancho de hifas fue de 2.5 a 6.3 μm . El ancho y largo de los peritecios fue muy variable. Los de AMSA tuvieron dimensiones de 114-267 $\mu\text{m} \times 252-696 \mu\text{m}$ y AV expuso dimensiones de 239-346 $\times 321-558 \mu\text{m}$. Las ascas del aislado AV fueron de 97-163 $\times 12.7-15.3$, mientras que las ascosporas presentaron dimensiones de 94-114 $\times 5.1$ y las ascosporas de AMSA fueron de 92-117 $\times 5.1$.

Las medidas expuestas anteriormente son muy similares a las reportadas para las especies *G. oryicola* y *G. oryzinus* detalladas por Hernandez-Restrepo *et al.* (2016), las que se incluyen en los Cuadros 5 y 6 para facilitar su comparación.

5.2 Identificación de especies a partir de las características de los aislados

No fue posible determinar a qué especie de *Gaeumannomyces* corresponde el aislado ASI, dado que a nivel microscópico no se logró comparar las dimensiones de sus estructuras. Por su parte los aislados AV y AMSA, presentan características claves como el largo de sus ascas y ascosporas que coincide con las reportadas por Hernández-Restrepo *et al.* (2016) para la especie *Gaeumannomyces oryzinus* Sacc (Cuadro 5). Acorde con Walker (1972), el largo de las ascosporas es una de las principales diferencias entre *G. oryicola* y *G. oryzinus*, siendo estas más largas para la primera especie.

Gaeumannomyces oryzinus fue introducida como *Ophiobolus oryzinus* por Saccardo en 1916, aislada de tallos de arroz en Los Baños, Filipinas. Walker (1972) describe a detalle la morfología de esta especie, asistándose de descripciones que múltiples autores reportaron y que se muestran en el Cuadro 7. Este mismo la reporta como un sinónimo de *G. graminis* var. *graminis*

al estudiar ambos holotipos y concluye que son la misma especie. Sin embargo, Hernández-Restrepo *et al.* (2016) determinan a través de análisis filogenético que *G. graminis* y *G. oryzinus* (*O. oryzinys*) son especies distintas.

Con las evidencias morfológicas encontradas en este estudio se determina que los aislados AMSA y AV corresponden a la especie *G. oryzinus*, siendo la primera caracterización de esta especie en Nicaragua, la cual ya había sido reportada en el listado oficial de plagas publicado por el IPSA (2019), donde se reporta a *Ophiobolus oryzinus*. No obstante, se desconoce el método utilizado para su identificación.

Cuadro 5. Resumen de los aislados identificados en el estudio.

| Aislado | Procedencia | Hospedero | Especie |
|---------|---------------------|-----------|-------------------------------------|
| ASI | Sébaco, Matagalpa | Arroz | <i>Gaeumannomyces</i> spp |
| AMSA | San Lorenzo, Boaco | Arroz | <i>Gaeumannomyces oryzinus</i> Sacc |
| AV | Malacatoya, Granada | Arroz | <i>Gaeumannomyces oryzinus</i> Sacc |

Cuadro 6. Características microscópicas de las especies *G. oryzinus* y *G. Oryzicola* reportadas por Hernández-Restrepo *et al.* (2016).

| Aislado / Especie | Hifa (µm) | Ancho de peritecio (µm) | Largo de peritecio (µm) | Largo de asca (µm) | Ancho de asca (µm) | Largo de ascospora (µm) | Ancho de ascospora (µm) | Fuente |
|---------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| ASI | 2.8-5.3 | | | | | | | Este estudio |
| AMSA | 2.5-6.3 | 114-267 | 252-696 | | | 92 - 117 | 5.1 | Este estudio |
| AV | 2.5-6.3 | 239-346 | 321-558 | 97-163 | 12.7-15.3 | 94 - 114 | 5.1 | Este estudio |
| <i>G. oryzinus</i> | 1.5-6.0 | | | 113-173.5 | 14.5-24 | 96-116 | 3.5-5.5 | Hernández-Restrepo <i>et al.</i> (2016) |
| <i>G. orydicola</i> | 2.0-6.0 | 110-413 | 112-525 | 118-148 | 14-16 | 92.5-120 | 4-6 | Hernández-Restrepo <i>et al.</i> (2016) |

Cuadro 7. Características microscópicas de estructuras reproductivas de *G. oryzinus* recopiladas por Walker 1972, Hernández-Restrepo *et al.* (2016) y aislados AMSA y AV.

| Autor | Peritecio | | Asca | | Ascospora | |
|---|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| | Cuerpo (µm) | Cuello (µm) | Largo (µm) | Ancho (µm) | Largo (µm) | Ancho (µm) |
| Saccardo (1916) | | | 95-110 | 7.0-11 | 86-100 | |
| Tullis (1933) | 187-375 | 125-375 | 96-111 | 12.5-14.5 | 79-112 | |
| Padwick (1950) | 300-350 | | 95-110 | 7.0-11 | | 3.0-5.0 |
| Sprague (1950) | 187-375 | | 96-115 | 12.5-14.5 | 79-112 | 3.0-5.0 |
| Chevaugon (1952) | 187-405 | | 87-116 | 11-14.5 | 79-112 | 3.0-5.0 |
| Saccas & Fernier (1954) | 115-415 | | 72-123 | 10.5-14.5 | 70-115 | |
| Veeraraghavan (1962) | 266-392 | 140-280 | 92.8-128 | 12.8-16 | 71.4-95.2 | |
| Walker (1972) | 250-350 | 100-200 | 75-130 | 11.0-15 | 75-105 | 3.0-5.0 |
| Hernández - Restrepo <i>et al.</i> (2016) | | | 113-173.5 | 14.5-24 | 96-116 | 3.5-5.5 |
| AMSA (este estudio) * | 200-462 | 91-306 | | | 92-117 | 5.1 |
| AV (este estudio) * | 291-437 | 96-266 | 97-163 | 12.7-15.3 | 94-114 | 5.1 |

*Se detallan valores promedios para cuerpo y cuello de peritecios.

5.3 Proceso infeccioso de los aislados sobre tallos y hojas de arroz

Los aislados AMSA, AV y ASI lograron desarrollar procesos infecciosos sobre el cultivo de arroz var. INTA DORADO en condiciones de invernadero. A continuación, se describe el proceso de infección registrado:

Los aislados inicialmente colonizaron la zona del tallo e inserción de la vaina donde fueron ubicados. Generando un alto número de hifas de color oscuro (Figura 7) a los tres días después de inoculados (ddi).

Se observó necrosis en tallos y vainas a los cinco ddi. Las lesiones que se ubicaban en las vainas presentaron bordes oscuros y centros decolorados, que permitían ver a través de la vaina afectada. Las lesiones tuvieron dimensiones de cuatro a seis milímetros de largo por dos a tres mm de ancho. Con presencia de micelio en sus bordes que continuaron la colonización de la planta (Figura 8).

Las lesiones duplicaron su tamaño, tomando una forma ligeramente ovalada a los nueve ddi. Las hojas de la planta tomaron un color amarillo-naranja en su base avanzando hacia la parte superior de la misma (Figura 8).

A los 13 ddi, las zonas de las vainas que presentaron las lesiones empezaron a secarse y a tomar una coloración amarilla hacia la base de la planta, de igual forma las bases de las hojas que se mostraron cloróticas a los nueve ddi (Figura 8).

La presencia de micelio aumentó sobre el lado interno de la vaina y avanzó la marchitez a nivel de vainas. No así las hojas cuya clorosis no continuó avanzando hacia el ápice y consecuentemente se concentró en la zona media y baja de la planta. En el lado interno de estas vainas secas pudo notarse la presencia de micelio en forma de abanico muy característico de *Gaeumannomyces*. La infección avanzó hacia el centro del tallo. Estos eventos se observaron a los 17 ddi (Figura 8).

A los 21 ddi, la marchitez sobre vainas mantuvo su avance hacia zonas más bajas del cultivo (Figura 9) y a los 27 ddi, se observó la presencia de peritecios que emergieron desde el centro de la vaina hacia el haz, en conglomerados de cuatro o más peritecios (Figura 9).

Transcurridos 33 ddi, el número de peritecios incrementó, observándose conglomerados de más de 20 peritecios en las vainas. Se notó que los tallos estaban propensos a doblarse (acame), su estabilidad o firmeza era sumamente inferior a la de los testigos no infectados (Figura 9).

A los 44 ddi, los conglomerados de peritecios continuaron apareciendo en otras vainas de las hojas y se observó la inclinación en ángulos aproximados a 45° de tallos inoculados con el aislado AV (Figura 9).



Figura 7. Infección de los aislados ASI, AV y AMSA sobre tallos de arroz de 0 a 3 ddi.



Figura 8. Infección de los aislados ASI, AV y AMSA sobre tallos de arroz de 5 a 17 ddi.



Figura 9. Infección de los aislados ASI, AV y AMSA sobre tallos de arroz de 21 a 44 ddi.

Las observaciones realizadas a nivel de tallos coinciden con las reportadas por Salazar (2014), quien detalla que a los 17 ddi en la etapa R1, el patógeno desarrolló un alto grado de afectación. Conforme la escala diagramática a nivel de tallos de Salazar (2014) los aislados ASI, AV y AMSA alcanzaron el grado 2 de infección al día tres, grado 3 al día cinco, grado 4 al día 13, grado 5 al día 21 y grado 6 al día 27 después de la inoculación. Lo que implicaría que en una variedad como INTA DORADO el mayor grado de infección coincide con el periodo de llenado de granos, una etapa de gran importancia donde se define la cosecha.

En variedades de ciclo de vida medio (120-125 días) que alcanzan la floración (R3) entre los 76 a 80 días después de germinación (ddg), este tipo de afectaciones sobre el tallo pueden resultar severas, pues se compromete el transporte de agua y nutrientes, la transpiración, el soporte de la planta misma, poniendo en peligro el llenado de la panícula.

Aunque en el presente ensayo no se valoraron variables relacionadas al rendimiento, Briones (2014), analizó la influencia de *Gaeumannomyces* sobre componentes de rendimiento en el cultivo de arroz, encontrando que la incidencia de 24.94% fueron capaces de reducir significativamente el número de espigas, número de granos llenos, el peso de estos y por supuesto el rendimiento. Sin embargo, sería importante considerarlas en futuros estudios en las condiciones de nuestro país.

Las observaciones de este estudio también coinciden con las de Peixoto *et al.* (2013), quien también registró una mayor severidad de la enfermedad en plantas inoculadas a los 60 ddg. A su vez, estos mismos autores encontraron diferencias significativas en la cantidad de inóculo utilizado en las plantas. Peixoto *et al.* (2013) tal como en este estudio documentaron la aparición de micelio en forma de abanico en el lado interno de las vainas.

Además del abundante micelio se identificó la presencia de hifopodios lobados para los aislados AMSA, AV y ASI. Los hifopodios tuvieron una coloración hialina en su centro y más teñida de oscuro en los bordes. Walker (1975) detalla que los hifopodios tienen una función fijadora y de penetración. El color oscuro de esta estructura es dado por la melanina, sustancia relacionada a la rigidez y a la penetración en estructuras como apresorios. Sin embargo, la presencia de melanina en los hifopodios de *Gaeumannomyces* no es determinante para que la estructura

penetre los tejidos de la planta y tampoco es necesaria la presencia de hifopodios para que el patógeno logre la infección de las plantas de arroz (Money, 1998; Frederick *et al.*, 1998).

La formación de peritecios en plantas inoculadas es reportada por Prabhu y Filippi (2002), Peixoto *et al.* (2013), Hawerth *et al.* (2017) y en este estudio donde fueron observados 27 ddi (Figura 10). Este periodo también coincide con el tiempo que requirieron los aislados AV y AMSA para generar peritecios en condiciones de laboratorio. El aislado ASI únicamente generó peritecios en condiciones de invernadero (Figura 10).

A nivel foliar las plantas no presentaron la coloración naranja, por lo tanto, no se utilizó la escala diagramática a nivel de hojas de Salazar (2014).

Lo descrito anteriormente confirma la necesidad de que en las empresas arroceras consideradas en el estudio se mantengan estrategias de manejo de la enfermedad. en etapas vegetativas previas al cambio de primordio (etapa R0 según Counce *et al.* 2000). A la fecha han venido implementando una serie de medidas culturales y de controles botánicos, biológicos y químicos que han permitido disminuir las afectaciones de este patógeno.

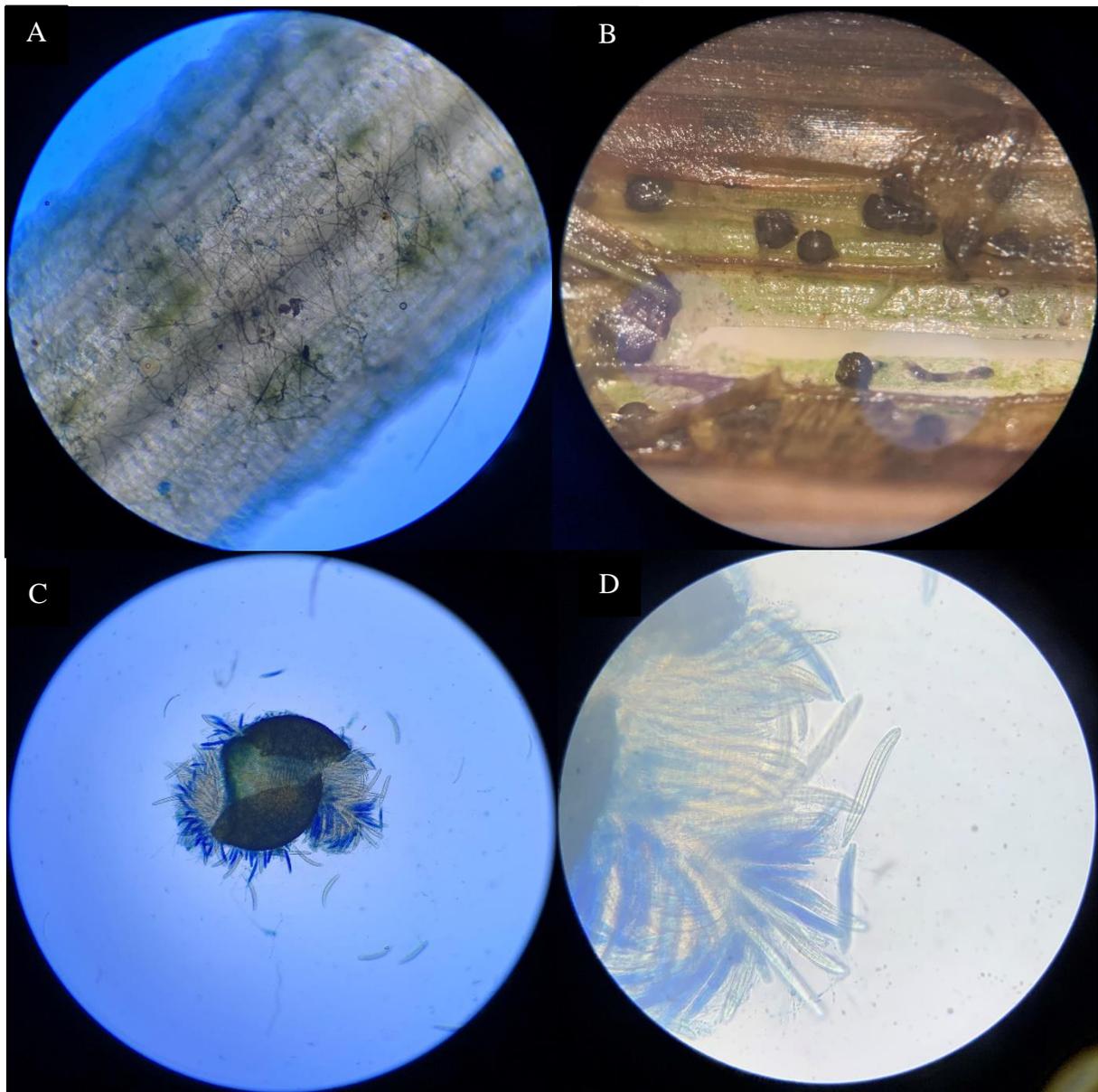


Figura 10. Estructuras obtenidas de la prueba de infección de tres aislados de *Gaeumannomyces* spp. A. Hifas e hifopodios sobre vaina de hoja (Vista 10X). B. Conglomerado de peritecios vistos desde el lado interno de la vaina (Vista 2X). C. Peritecio maduro con alto número de ascas (20X). D. Ascas conteniendo ascosporas (Vista 40X).

5.4 Sensibilidad de aislados a fungicidas comerciales

Los aislados ASI, AV y AMSA mostraron sensibilidad al ser inhibidos por los fungicidas comerciales ensayados. El análisis de varianza determinó diferencias significativas entre los aislados ($p < 0.0001$), fungicidas comerciales ($p < 0.0001$) y en la interacción de ambos ($p < 0.0001$).

La separación de medias por Tukey ubicó a los aislados en tres categorías estadísticas, siendo el aislado AMSA el menos sensible a los cinco fungicidas comerciales evaluados, al inhibir en 68% su crecimiento micelial, seguido de ASI con 70% y AV resultó el más sensible con un porcentaje de inhibición de 77% (Figura 11).

En cuanto a los fungicidas comerciales Tacre Bacillus Plus[®] y Amistar 50WG[®], fueron los que menor porcentaje de inhibición micelial tuvieron con 24% y 34% respectivamente. Mientras que las formulaciones Funibiol-K[®], Alto 10SL[®] y Amistar Xtra 28SC[®] lograron 100% de inhibición (Figura 12).

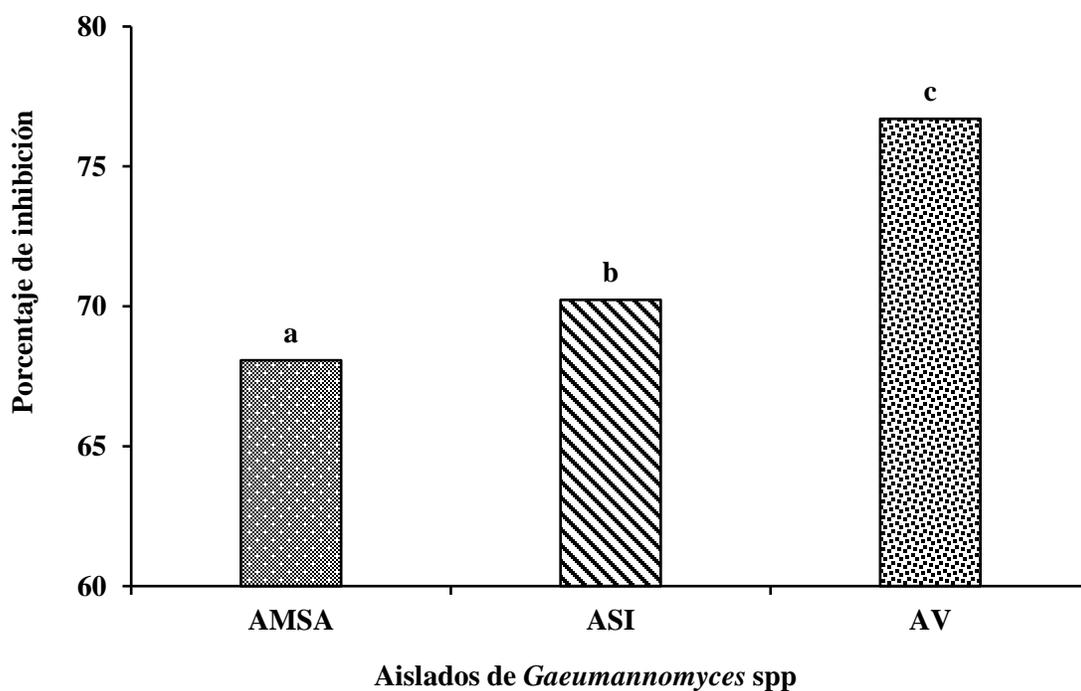


Figura 11. Inhibición micelial promedio de los aislados de AMSA, ASI y AV.

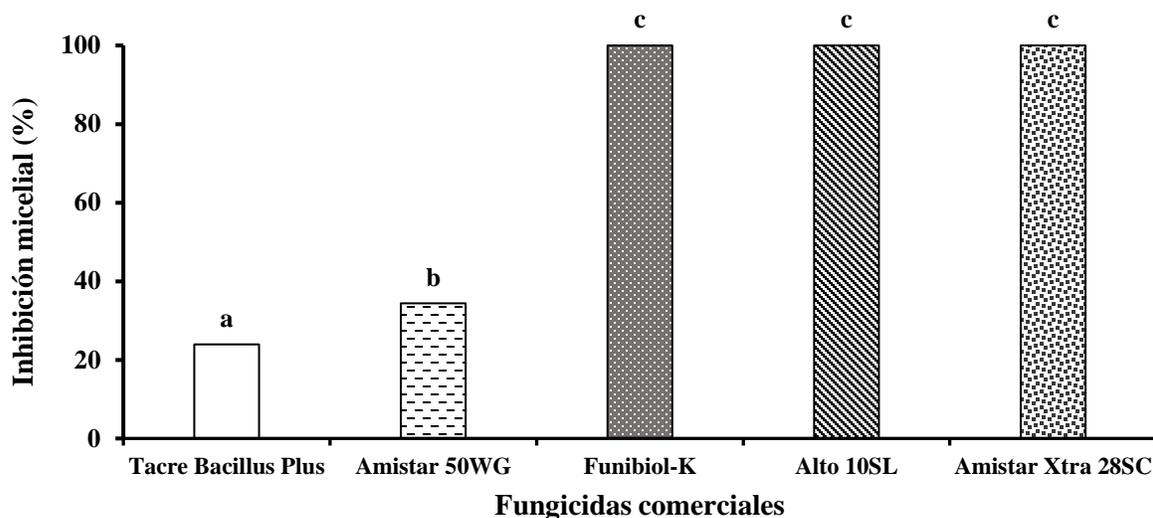


Figura 12. Inhibición micelial promedio lograda por fungicidas comerciales sobre aislados de *Gaeumannomyces* spp.

El fungicida biológico Tacre Bacillus Plus® mostró un efecto fungistático, al detener el crecimiento de los aislados una vez ambas colonias tuvieron contacto al transcurrir seis días desde la incubación (Figura 12 y 14). En ensayos anteriores las bacterias del género *Bacillus* lograron inhibir más del 50% el crecimiento micelial (Yang *et al.* 2015; Yang *et al.* 2018; Liu *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2017a; Zhang *et al.* 2017b), no obstante, es importante mencionar que el medio utilizado en estos estudios fue PDA y además el antagonista se establecía de tres a cuatro días antes que el patógeno.

Mientras que en el presente estudio se utilizó un medio que además de PDA contenía semolina de arroz, sacarosa y agar, un medio más nutritivo y similar a la planta de arroz durante la formación de la panícula. Sumado a lo anterior, la inoculación en los platos Petri fue el mismo día para ambos microorganismos, lo que igualó las condiciones de crecimiento para ambos microorganismos.

En las empresas arroceras de donde provienen los aislados, las aplicaciones de este fungicida comercial se realizan al área foliar cuando el cultivo llega a la etapa de cambio de primordio (R_0 a R_1 – 53 a 58 ddg), momento en que ya se identifican estructuras del hongo en la base de la planta, sin embargo, se desconoce si estas son capaces de entrar a la planta de arroz a inhibir el crecimiento de *Gaeumannomyces*.

Para el caso de Amistar 50WG[®] fungicida químico sintético compuesto por la molécula azoxistrobina (ubicado en la segunda categoría estadística) alcanzó un promedio de inhibición menor al 35% (Figura 12 y 15). Estos resultados coinciden con estudios a nivel de campo en el cultivo de trigo con Azoxistrobina y otras estrobirulinas sobre *G. graminis* var. *tritici*, logrando controlar de 20% a más del 80% la incidencia del patógeno (Jenkyn *et al.* 2000; Jenkyn y Gutteridge, 2002). A pesar de esto, los controles fueron inconsistentes y sugirieron valorar este ingrediente activo como una molécula que tiene mejor comportamiento sobre otros patógenos en el cultivo de trigo.

Según la ficha técnica del producto, Amistar 50WG[®] actúa como inhibidor de la respiración mitocondrial mediante la unión del sitio Qo del citocromo b, interrumpiendo el ciclo de energía dentro del microorganismo, lo que hace interferir en su ciclo de vida, principalmente durante la germinación de las esporas y la penetración del tejido. Considerando las características morfológicas de *Gaeumannomyces*, el mecanismo de infección que se basa en la abundante producción de micelio y en los resultados de este estudio, azoxistrobina puede considerarse como una molécula secundaria en los planes de manejo específicos para la enfermedad.

Por su parte, el tratamiento Alto 10SL[®], que contiene ciproconazol, logró inhibir 100% el desarrollo de micelio de los aislados (Figura 12 y 15). Yun *et al.* (2012) comprobó la inhibición micelial *in vitro* de 66 aislados de *G. graminis* var. *tritici* con dos moléculas de la misma familia química (Tebuconazol y Difenconazol), posteriormente en plantas de arroz establecidas en condiciones de campo, Briones (2014) encontró que tratamientos que contenían Tebuconazol + Carbendazin y Difenconazol + Propiconazol lograron 5.6% y 36.0 % menos incidencia de *Gaeumannomyces* que el testigo absoluto que registró incidencia de 24.94%. A pesar de ello, fue lo suficiente como para encontrar diferencias significativas en el rendimiento del cultivo y sus componentes.

Alto 10SL[®], es un fungicida que ejerce su efecto a través de la inhibición de la biosíntesis del ergosterol, lo que desencadena una serie de procesos que terminan deteniendo el crecimiento del micelio del hongo y siendo *Gaeumannomyces* un patógeno que genera abundante micelio para desarrollar su proceso infectivo, resulta ser muy específico y una de las principales moléculas para el manejo de la enfermedad.

El fungicida comercial Amistar Xtra 28SC[®] que contiene las moléculas azoxistrobina y ciproconazol inhibió el 100%, aun teniendo 20 g menos de ciproconazol que Alto 10SL[®] y 300 g menos de azoxistrobin que Amistar 50WG[®] (Figura 11 y 16). Sin embargo, sería importante valorar las concentraciones mínimas inhibitoria de estos fungicidas químicos.

El fungicida botánico Funibiol-K[®], elaborado a partir del extracto botánico de la planta *Eucalyptus globulus* logró inhibir 100% del crecimiento de los aislados de *Gaeumannomyces* considerados en este estudio, logrando un desempeño igual a Alto 10SL[®] y Amistar Xtra 28SC[®] (Figura 12 y 16). En las empresas arroceras es aplicado cuando el cultivo alcanza la etapa fenológica V6-V7 (macollamiento intermedio).

En Chile, Zapata *et al.*, (2011) también registraron 100% de inhibición de este ascomicete al incorporar cuatro gramos de corteza molida de la especie *Drimys winteri* al medio de cultivo. En Asia, Yang *et al.* (2019) evaluaron 17 plantas medicinales contra varios hongos patógenos, incluido *Gaeumannomyces*, a nivel *in vitro*, logrando porcentajes de inhibición máximos de 58.7% con la especie *Syzygium aromaticum* (L.).

Para el caso específico de la planta *Eucalyptus globulus*, Rakotonirainy y Lavédrine (2005) detallan que de su hoja se extraen los compuestos 1-8 cineole o Eucaliptol, el cual es un monoterpeno con acción fúngica. Posteriormente Zorzi *et al.* (2017) determinaron que *E. globulus*, puede contener hasta 69.32% del monoterpeno 1-8 cineole y lo ensayaron en condiciones *in vitro* sobre *Alternaria solani* (tizón temprano del tomate), encontrando que concentraciones de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ lograron inhibir entre el 91% y 100% del desarrollo micelial de este importante patógeno.

Estos resultados soportan los obtenidos en este estudio para el fungicida botánico Funibiol-K[®], la cual es una de las principales herramientas con las que se cuenta en Nicaragua para el manejo de *Gaeumannomyces*.

En cuanto a la interacción entre los tratamientos y aislados (Figura 13), los porcentajes de inhibición micelial resultaron iguales para Funibiol-K[®], Alto 10 SL[®] y Amistar Xtra 28SC[®] y sus interacciones con los tres aislados. Todos ellos se agruparon en una misma categoría estadística al lograr 100% de inhibición. El tratamiento Tacre Bacillus Plus[®] presentó un comportamiento similar sobre los aislados AMSA, AV y ASI, al lograr porcentajes de inhibición

de 24%, 24% y 25% respectivamente, los cuales se agruparon en una misma categoría estadística.

Amistar 50WG[®], fue el único tratamiento cuyos resultados de inhibición difirieron entre los aislados, logrando 17% de inhibición para AMSA, 27% con ASI y 60% para AV. Coincidiendo con los resultados inconsistentes obtenidos por Jenkyn *et al.* (2000) y Jenkyn y Gutteridge (2002). La azoxistrobina es uno de los ingredientes activos con acción fúngica más reciente en el mundo (Morton y Staub, 2008), sin embargo, el comité de acción de resistencia a los fungicidas (FRAC, por sus siglas en inglés) ha reportado el alto riesgo de desarrollar resistencia a esta molécula.

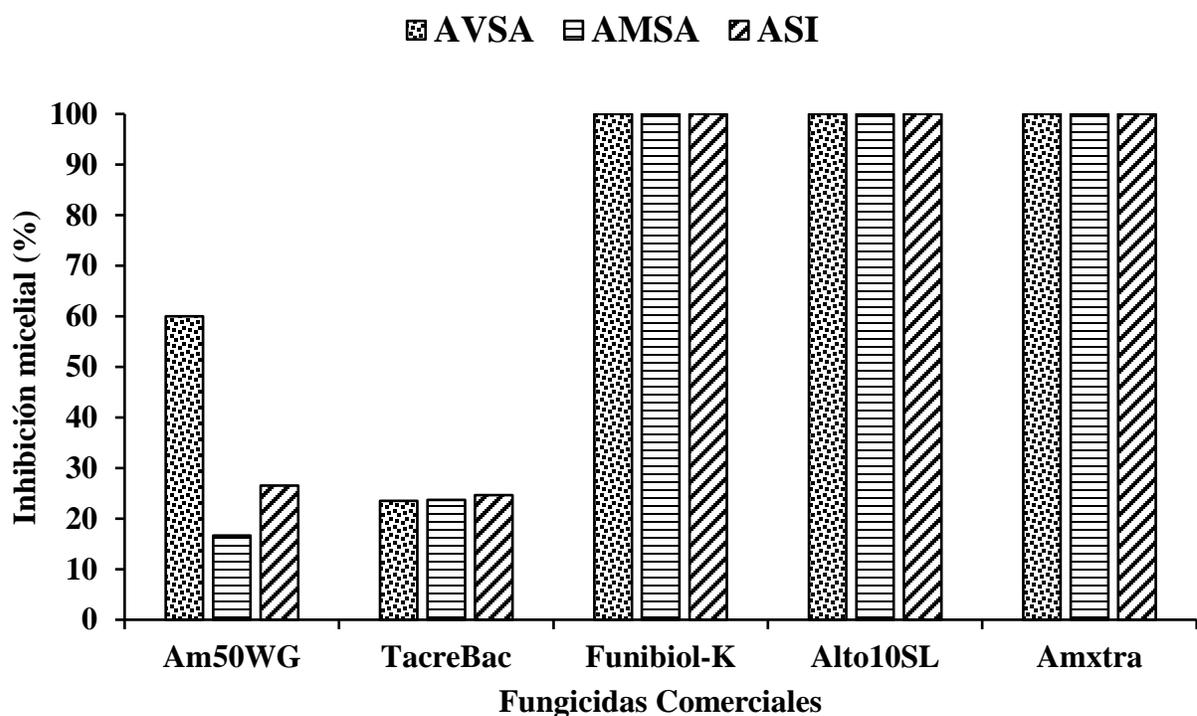


Figura 13. Inhibición micelial que resultó de la interacción fungicidas y aislados de *Gaeumannomyces* spp.

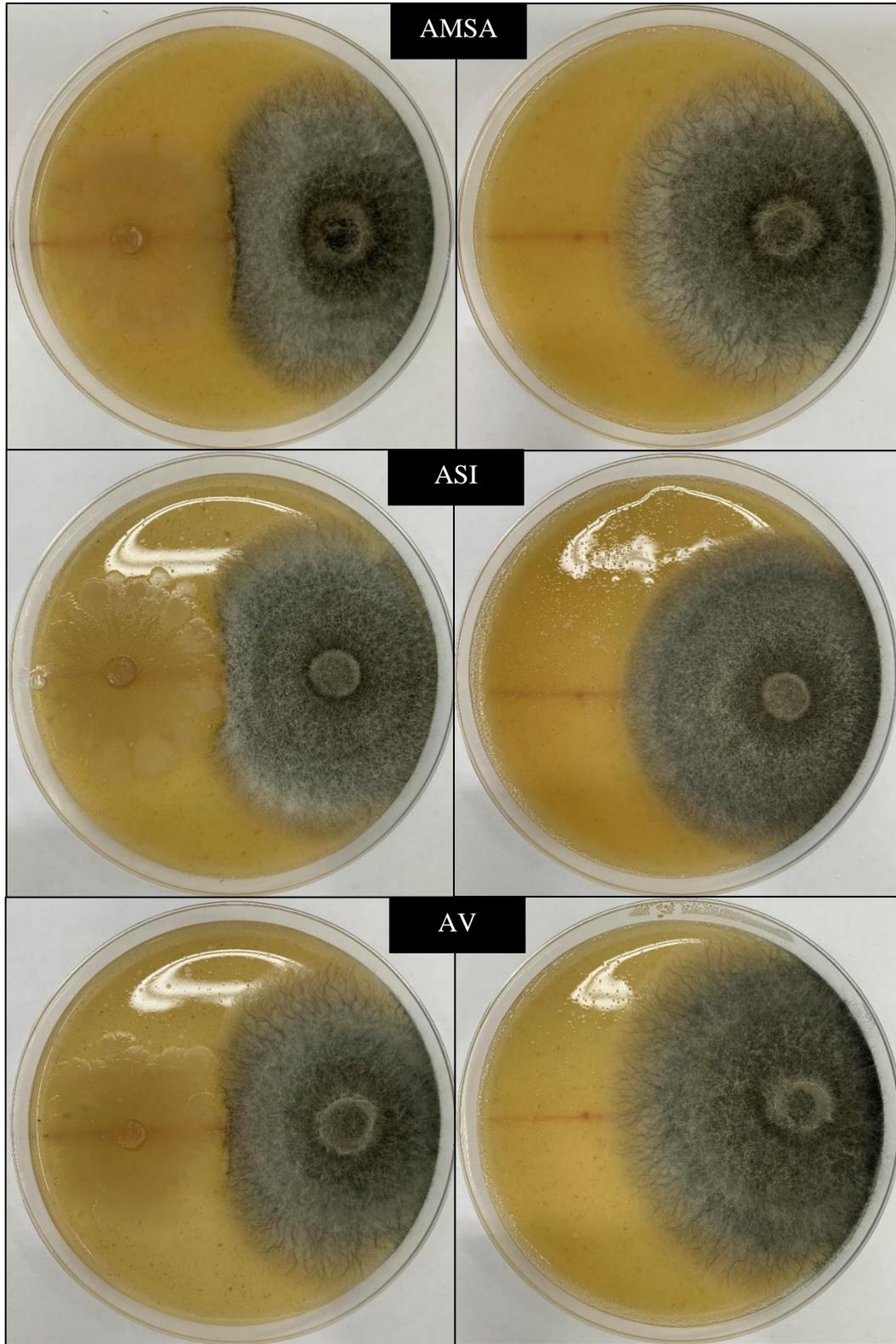


Figura 14. Inhibición micelial de aislados de *Gaeumannomyces* spp por Tacre Bacillus Plus[®] (izquierda) y aislados sin tratamiento (derecha).

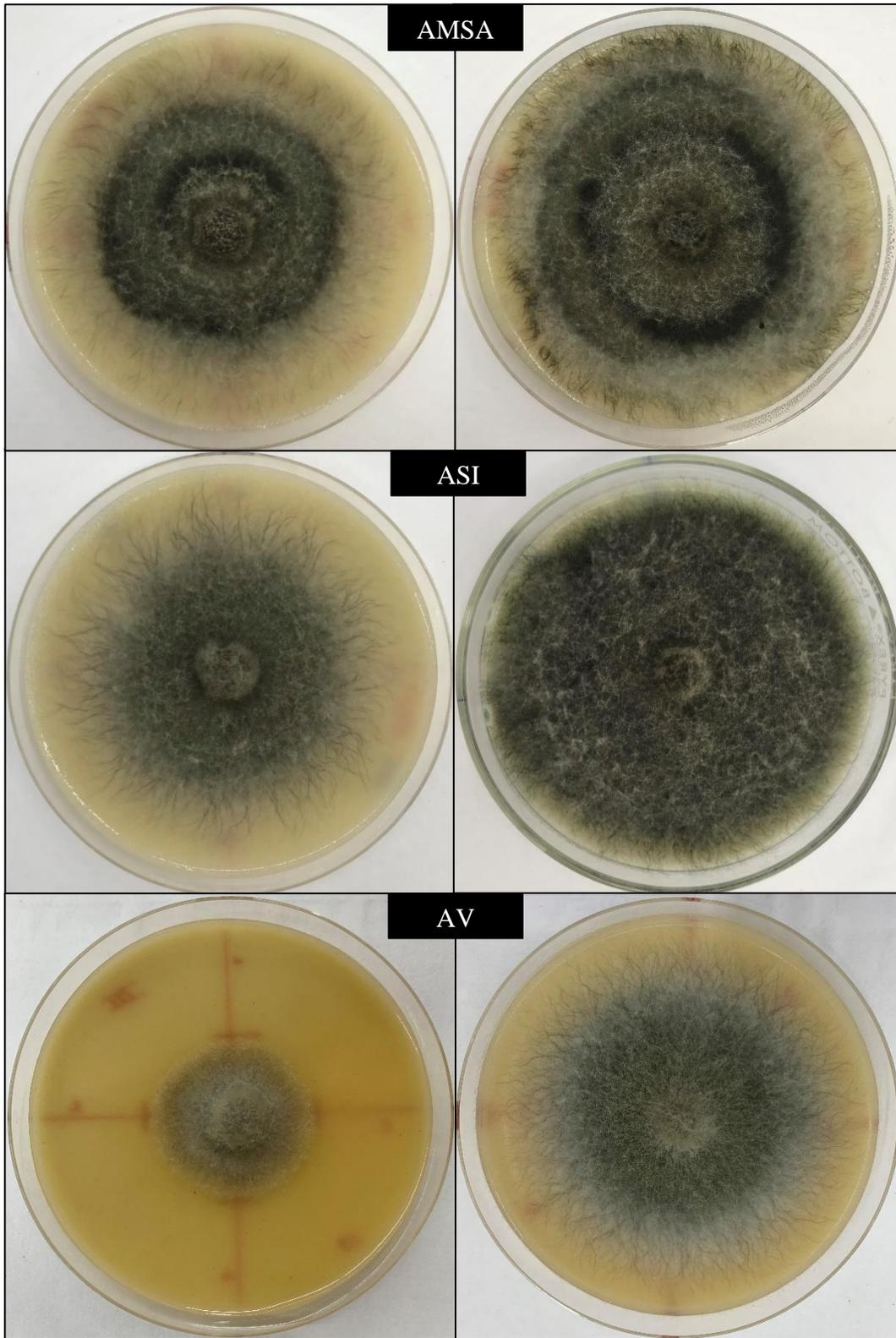


Figura 15. Inhibición micelial de aislados de *Gaeumannomyces* spp por Amistar 50WG[®] (izquierda) y aislados sin tratamiento (derecha).

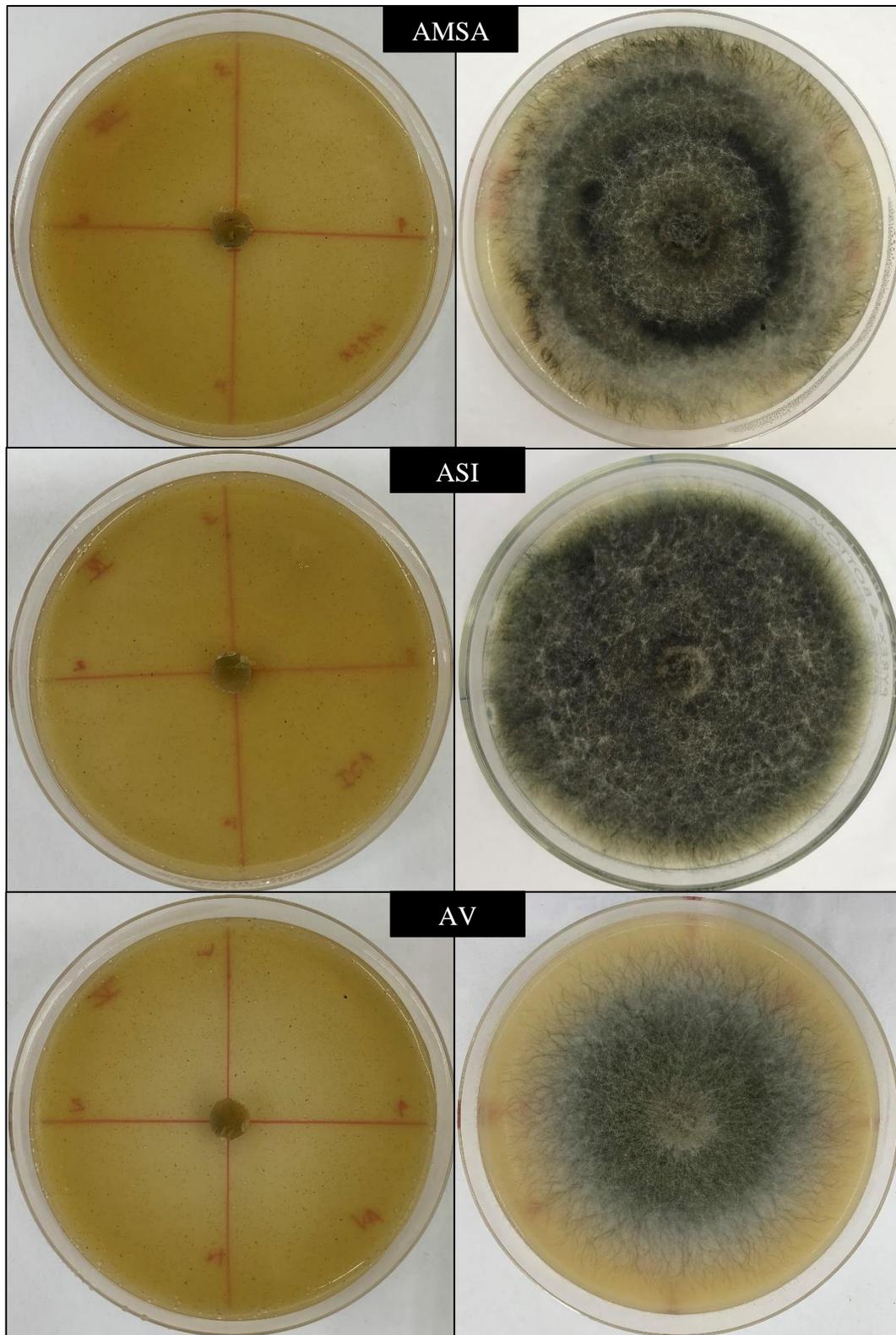


Figura 16. Inhibición micelial de aislados de *Gaeumannomyces* spp por Funibiol-K[®] (izquierda) y aislados sin tratamiento (derecha).

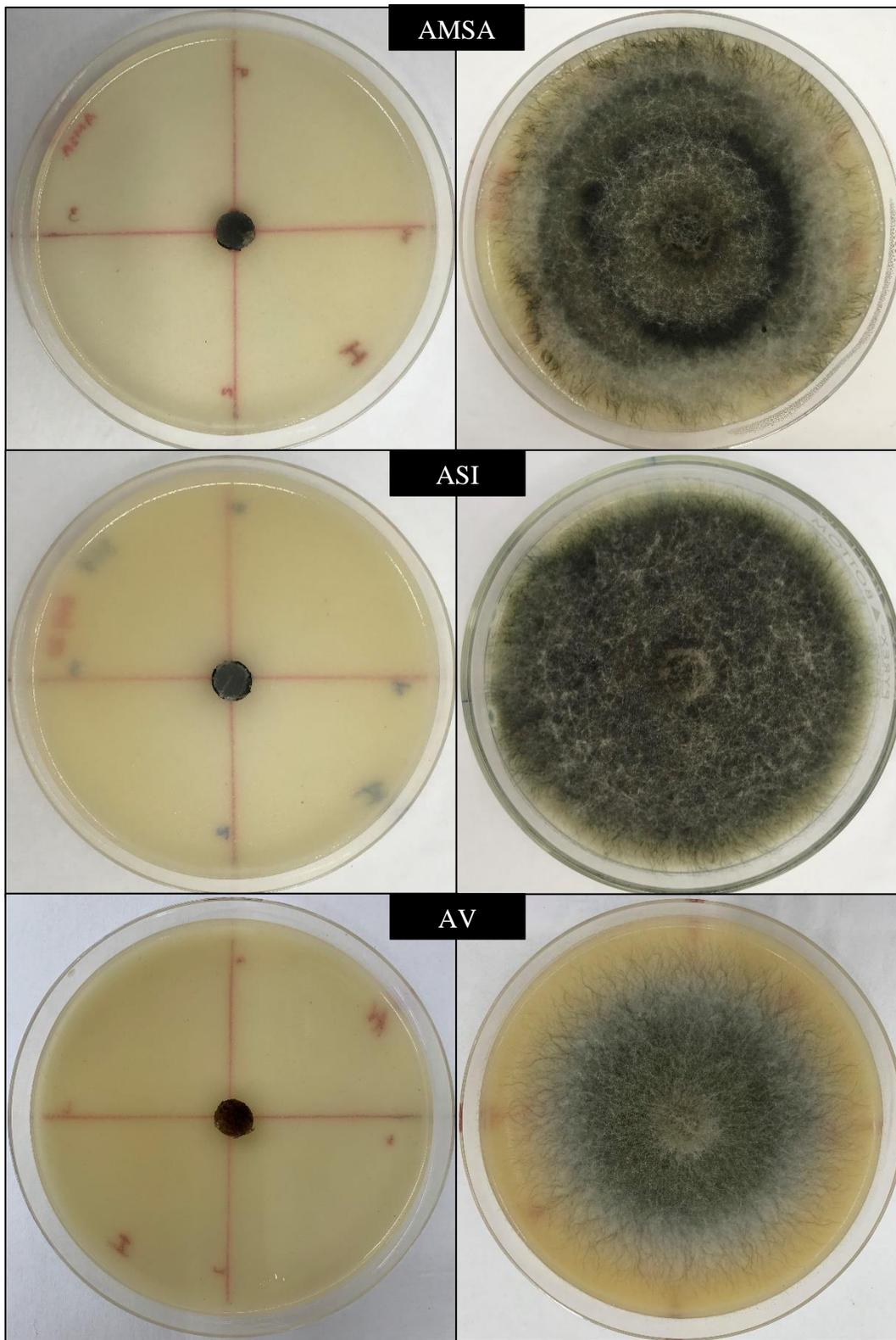


Figura 17. Inhibición micelial de aislados de *Gaeumannomyces* spp por Alto 10SL[®] (izquierda) y aislados sin tratamiento (derecha).

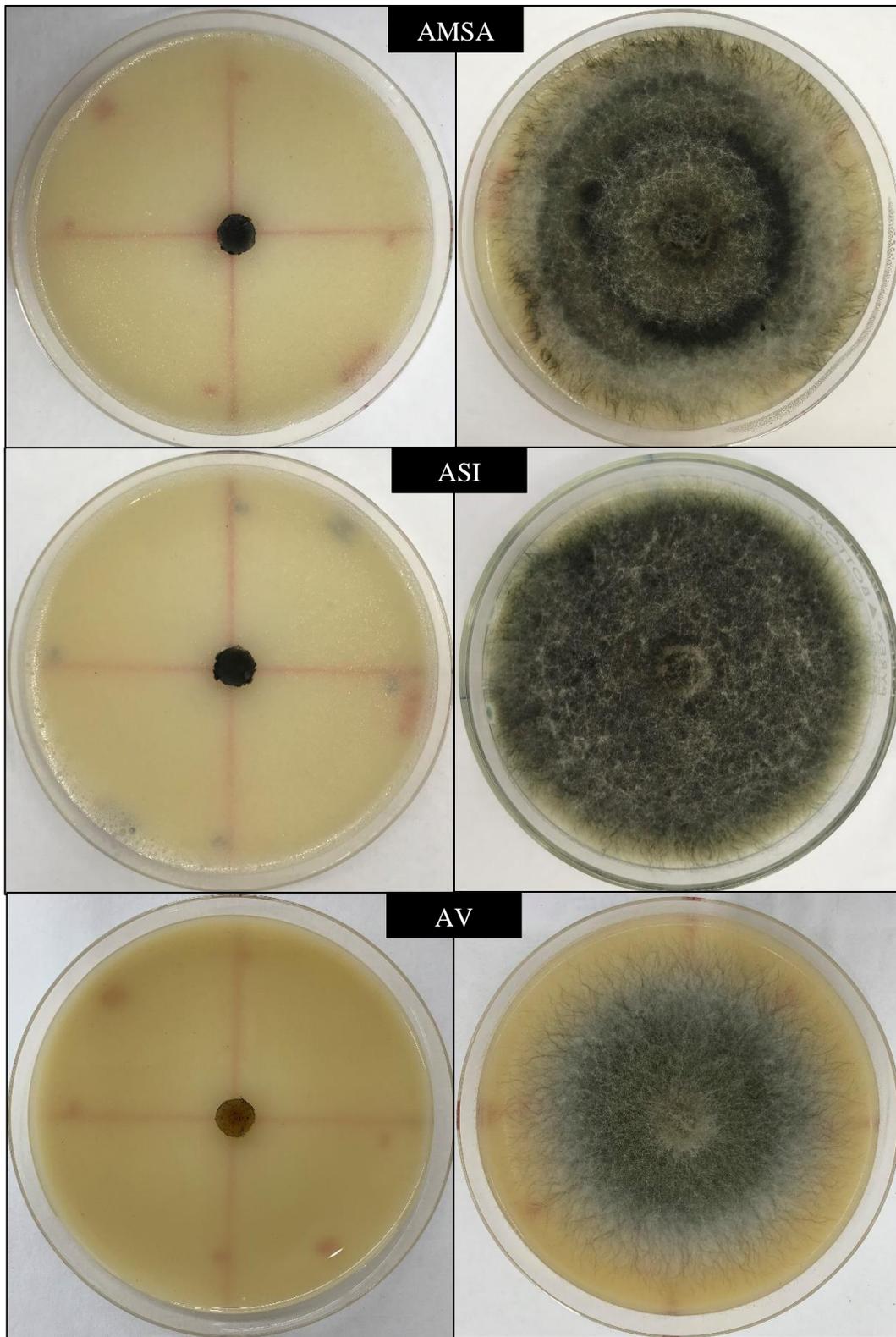


Figura 18. Inhibición micelial de aislados de *Gaeumannomyces* spp por Amistar Xtra 28SC[®] (izquierda) y aislados sin tratamiento (derecha).

VI. CONCLUSIONES

Los aislados ASI, AV y AMSA presentaron coloración grisácea oscura, textura lanosa con hifas en forma de hebras individuales y agrupadas, con colonización de tipo circular, borde filiforme, diámetro de colonia de 66 mm a 78 mm, capaces de generar peritecios con ascas y ascosporas.

Se identifica como *Gaeumannomyces* spp el aislado de ASI proveniente de Sébaco, Matagalpa y *Gaeumannomyces oryzinus* Sacc. como la especie de los aislados de AV y AMSA provenientes de Malacatoya, Granada y San Lorenzo, Boaco respectivamente.

En condiciones de invernadero, los aislados AV, AMSA y ASI generaron abundante micelio para iniciar su infección a nivel de tallos y vainas de las hojas, provocando lesiones hasta alcanzar la base del tallo, reduciendo su firmeza y estabilidad, predisponiendo el cultivo al acame.

Los tres aislados de *Gaeumannomyces* spp fueron sensibles a los fungicidas comerciales evaluados, logrando la mayor inhibición micelial los productos Funibiol-K[®], Alto 10SL[®] y Amistar Xtra 28SC[®].

VII. RECOMENDACIONES

Realizar pruebas PCR para confirmar la identificación de *Gaeumannomyces oryzinus*.

Iniciar estudios que permitan valorar la relación sobre la incidencia y severidad de *Gaeumannomyces* con el rendimiento y la calidad del cultivo de arroz en las condiciones agroclimáticas de Nicaragua.

Evaluar los fungicidas Tacre Bacillus Plus, Amistar 50WG, Funibiol-K, Alto 10SL y Amistar Xtra 28SC sobre plantas de arroz.

Realizar pruebas con diferentes dosis del ingrediente activo azoxystrobina (Amistar 50WG) y los aislados de *Gaeumannomyces* para determinar si hay resistencia hacia esta molécula.

VIII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 1996. Fitopatología. 2ª edición; Edit. Limusa. México. 756 p.
- Asociación Nicaragüense de Arroceros (ANAR). 2014. Importancia del cultivo de arroz (en línea). Consultado 05 agosto 2014. Disponible en: <http://www.anar.com.ni/arroz/importancia-del-cultivo>
- Baca, L. 2018. Mapa revela qué produce cada departamento de Nicaragua. Economía, La Prensa. Managua, NI, feb. Consultado 03 junio 2018. Disponible en: <https://www.laprensa.com.ni/2018/02/09/economia/2374127>
- BCN (Banco Central de Nicaragua). 2017. Plan de Producción, Consumo y Comercio Ciclo 2017-2018. Managua, NI. Consultado 03 junio 2018. Disponible en: <http://www.bcn.gob.ni/publicidad/img/landscape>
- Bockus, WW. 1983. Effects of fall infection by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and triadimenol seed treatment on severity of take all in Winter wheat. *Phytopathology* 73:540-543.
- Briones, GF. 2014. Efecto de *Trichoderma asperellum* sobre la incidencia y severidad de *Rhizoctonia solani* y *Gaeumannomyces graminis* en la zona de Daule. Tesis: Ing. Agrónomo. Guayaquil, Ecuador. Universidad de Guayaquil. 64 p.
- Castaño, J. 1986. Practicas de laboratorio de fitopatología. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano. 40 p.
- Cannon, PF. 1994. The newly recognized family Magnaporthaceae and its interrelationships. *Systema Ascomycetum* 13:25-42.
- Cook, RJ; Rovira, AD. 1976. The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils. *Soil Biology and Biochemistry* 8(4):269-273.
- Cook, RJ. 2003. Review Take-all of wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 73-86.
- Counce, P; Kiesling, T; Mitchell, A. 2000. A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. *Crop Science* 40:436-443.
- Dal Bello, GM; Mónaco, CI; Sisterna, MN. 1994. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el control del tizón de la plántula en trigo ocasionada por *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatología Brasileira* 19:394-400.
- Datnoff, LE; Elliott, ML; Krausz, JP. 1997. Cross pathogenicity of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* from bermudagrass, St. Augustine grass, and rice in Florida and Texas. *Plant Disease* 8:1127-1131.

- Dawson, W; Bateman, L. 2000. Sensitivity of fungi from cereal roots to fluquinconazole and their suppressiveness towards take-all on plants with or without fluquinconazole seed treatment in a controlled environment. *Plant Pathology* 49:477-486.
- Deacon, JW. 1981. Ecological relationships with other fungi: competitors and hyperparasites. In *Biology and Control of Take-All*. Asher, JC. and Shipton, PJ (eds.). London: Academic Press, pp. 75–101.
- Durán, P; Jorquera, M; Viscardi, S; Carrion, V.J; Mora, ML; Pozo, M.J. 2017. Screening and Characterization of Potentially Suppressible Soils against *Gaeumannomyces graminis* under Extensive Wheat Cropping by Chilean Indigenous Communities. *Frontiers in Microbiology* 8, 16 p.
- Elliot, ML. 1991. A selective medium for *Gaeumannomyces*-like fungi (en línea). Consultado 29 abril de 2018. Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/abstract/19912313373>
- Elliott, ML; Hagan, AK; Mullen, JM. 1993. Association of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* with a St. Augustine grass root rot disease. *Plant Disease* 77:206-209.
- Ennaïfar, S; Lucas, P; Meynard, JM; D. Makowski. 2005. Effects of summer fallow management on take-all of winter wheat caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *European Journal of Plant Pathology* 112:167–181.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2016. Ahorrar para crecer en la práctica maíz, arroz, trigo: guía para la producción sostenible de cereales. Roma, Italia. 124 p.
- FAO. 2017. Seguimiento al Mercado del Arroz de la FAO (en línea). v. XX (4). Consultado 27 abril 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/3/I8317ES/i8317es.pdf>
- FAO. 2018. FAOSTAT. Base de datos estadísticas en línea: Cultivo de Arroz. Consultado 28 mayo 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Frederick, B; Caesar-TonThat, TC; Wheeler, MH; Sheehan, KB; Edens,WA; Henson, JM. 1998. Isolation and characterization of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* melanin mutants. *Mycological Research* 103:99-110.
- Freeman, J; Ward, E. 2004. *Gaeumannomyces graminis*, the take-all fungus and its relatives. *Molecular Plant Pathology* 5(4):235-252.
- French, ER; Hebert, TT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. Ed. M de la Cruz. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, CR. 300p.
- García, D. 1990. Efecto de diferentes dosis de nitrógeno y del inhibidor CMP sobre el comportamiento del arroz (*Oryza sativa* L.) var. "Altamira 7" y la dinámica de las malezas. Tesis: Ing. Agrónoma. Managua, NI. Universidad Nacional Agraria. 53 p.

- Garrido, M. 2009. Manejo de la Pudrición de Tallos y Vainas del Arroz. Tumbes, Argentina. 30 p.
- Hawerth, C; Araujo, L; Rodrigues, FA. 2017. Infection process of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* on the roots and culms of rice. *Journal of Phytopathology* 65:692-700.
- Hernández-Restrepo, M; Groenewald, JZ; Elliott, ML; Canning, G; McMillan, VE; Crous, PW. 2016. Take-all or nothing. *Studies in Micology* 83:19-48.
- Hiddink, G; van Bruggen, A; Termoshuizen, AJ; Raaijmakers, J; Semenov, J. 2005. Effect of organic management of soils on suppressiveness to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and its antagonist, *Pseudomonas fluorescens*. *European Journal of Plant Pathology* 113:417-435.
- INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria). 2012. Manual: Síntomas de enfermedades y plagas asociadas al complejo de ácaros, hongos y bacterias (CAHB) en el cultivo de arroz. Managua, NI. 44 p.
- INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria) / FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria). 2012. Guía tecnológica del cultivo de arroz. Managua, Ni. 5 ed. 40 p.
- IPSA (Instituto De Protección y Sanidad Agropecuaria). 2019. Versión V Lista De Plagas Reportadas En Nicaragua. 64 p.
- IRRI (International Rice Research Institute). 2018. Increasing Food Security (en línea). Consultado 28 may. 2018. Disponible en: <http://irri.org/our-impact/increase-food-security>.
- Jenkyn, JF; Bateman, GL; Gutteridge, RJ; Edwards, SG. 2000. Effects of foliar sprays of azoxystrobin on take-all in wheat. *Annals of Applied Biology* 137:99-106.
- Jenkyn, JF; Gutteridge RJ. 2002. Effects of azoxystrobin on wheat at take-all, Home-Grown Cereals Authority (HGCA) Project report N° 285. United Kingdom. 35 p.
- Jenkyn, JF; Gutteridge, RJ; White, RP. 2013. Effects of break crops, and of wheat volunteers growing in break crops or in set-aside or conservation covers, all following crops of winter wheat, on the development of take-all (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) in succeeding crops of winter wheat. *Annals of Applied Biology* 165:340-363.
- Koch, R. 1883. Über die neuen Untersuchungsmethoden zum Nachweis der Mikrokosmen in Boden, Luft und Wasser. Vortrag auf dem XI. Deutschen Ärztetag in Berlin, Vereinsblatt für Deutschland, Kommissions-Verlag von F. C. W. Vogel. 273-284 p.
- Liu, B; Qiao, H; Huang, L; Buchenauer, H; Han, Q; Kang, Z; Gong, Y. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control* 49:277-285.

- MacNish, G. 1994. Take-all disease of cereals. Department of Agriculture Western Australia. 6 p.
- Martínez, E; Abreu, J; García, D. 2014. Presencia de *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* y *Magnaporthe salvinii* en variedades de arroz cultivadas en Cuba. *Fitosanidad* 18(3):163-168.
- Michereff, S.J., Silveira, N.S.S., Reis, A., & Mariano, R.L.R. 1994. Epiphytic bacteria antagonistic to *Curvularia* leaf spot of yam. *Microbial Ecology* 28:101-110.
- MAGFOR (Ministerio Agropecuario y Forestal). 2010. Lista oficial de plagas. Managua, Nicaragua.
- Money, NP; Caesar-TonThat, TC; Frederick, B; Henson, JM. 1998. Melanin synthesis is associated with changes in hyphopodial turgor, permeability, and wall rigidity in *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Fungal Genetics and Biology* 24:240-251.
- Morton, V; Staub, T. 2008. A Short History of Fungicides (en línea). American Phytopathological Society (APS). Consultado 27 agosto 2021. Disponible en: <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/Fungicides.aspx>
- MTI (Ministerio de Transporte e Infraestructura). 2010. Diagnóstico de la Infraestructura Terciaria de Transporte en los Municipios Jinotega, Matagalpa, Boaco y Chontales: Anexos de Diagnóstico de la Infraestructura Vial de la Red de Caminos Vecinales del Municipio de “Sébaco”. Volumen II. 53 p.
- Nunes, CD. 2008. Ocorrência das doenças mal-do-pé (*Gaeumannomyces graminis*) e mancha parda (*Drechslera* spp) na cultura do arroz (en línea). Río grande del sur, BR.
- Peixoto, C; Ottoni, G; Filippi, M; Silva-Lobo, V; Prabhu, A. 2013. Biology of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* isolates from rice and grasses and epidemiological aspects of crown sheath rot of rice. *Tropical Plant Pathology* 38:495-504.
- Peixoto, C; Ottoni, G; Silva-Lobo, V; Filippi, M; Prabhu, A. 2014. Mal-do-pé do arroz: Hospedeiros e resistência varietal a *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 44:318-324.
- Prabhu AS; Filippi, M. 2002. Ocorrência del mal de pie causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, una nueva enfermedad del arroz en Brasil. Goiás, BR. *Fitopatología Brasileira* 27:417-419.
- Prado, G; Correa, F; Aricapa, M. Escobar, F. 2001. Caracterización preliminar de la resistencia de germoplasma de arroz al añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kuhn). FLAR-CIAT. Colombia. *Foro Arrocerero latinoamericano* 7(1):8-11.

- Rakotonirainy, M. S., & Lavédrine, B. (2005). Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55(2):141-147.
- Romero, EJ. 1999. Efecto de tres niveles de nitrógeno en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) con cinco líneas promisorias en la localidad de Malacatoya, bajo el sistema de riego por inundación. Tesis: Ing. Agrónomo. Managua, NI. Universidad Nacional Agraria. 50 p.
- Saccardo, PA. 1916. Notae mycologicae: xx. *Nuovo giornale botanico italiano (N.S.)* 23:185-234.
- Salazar, L. 2014. Elaboración de escalas diagramáticas de severidad en hoja y tallos para evaluar la enfermedad “mal del pie” (*Gaeumannomyces graminis* Sacc.) Von Arx & d. Oliver var. *graminis* en diferentes estados fenológicos del arroz. Tesis MSc. Ciencias Agrarias. Palmira, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 77 p.
- Shravelle, VG. 1961. The nature and use of modern fungicides. Burges Publication Company, Minneosota, USA. 308 p.
- Singh, R; Erenstein, O; Gatdala, MK; Alam, MM; Regmi, AP; Singh, UP; Mujeeb ur Rehman, H; Tripathi, BP. 2009. Socioeconomics of integrated crop and resource management technologies in the rice-wheat systems of South Asia: site contrasts, adoption, and impact using village survey findings. *In* Ladha, JK; Singh, Y; Erenstein, O; Hardy, B. 2009. Los Baños, Phillippines. Integrated crop and resource management in the rice-wheat system of South Asia. International Rice Research Institute (IRRI). 405 p.
- Vera, C; Maradiaga, R; Moya-Elizondo, E. 2014. Uso de fluquinconazole como tratamiento a la semilla para el control de mal del pie (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) en trigo. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences (ex Agro-Ciencia)* 30(3):159-169.
- von Arx, JA; Olivier, D. 1952. The taxonomy of *Ophiobolus graminis* Sacc. *Transactions of the British Mycological Society* 35:29–33.
- Walker, J. 1972. Type studies on *Gaeumannomyces graminis* and related fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 58:427–457.
- Walker, J. 1975. Take-all diseases of gramineae: a review of recent work. *Review of Plant Pathology* 54:113-144.
- Walker, J. 1981. Taxonomy of take-all fungi and related genera and species. *In* Biology and Control of Take-All (Asher, M.J.C. and Shipton, P.J., eds). London: Academic Press, pp. 15-74.
- Yang, C-J; Gao, Y; Du, K-Y; Lou, X-Y. 2019. Screening of 17 Chinese medicine plants against phytopathogenic fungi and active component in *Syzygium aromaticum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 8 p.

- Yang, L; Quan, X; Xue, B; Goodwin, P.H; Lu, Shubing; Wang, J; Wei, D; Wu, C. 2015. Isolation identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biological Control* 85:52-58.
- Yang, L; Han, X; Zhang, F; Goodwin, P.H; Yang, Y; Li, J; Xia, M; Sun, R; Jia, B; Zhang, J; Quan, X; Wu, C; Xue, B, Lu, C. 2018. Screening *Bacillus* species as biological control agents of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on wheat. *Biological Control* 118:1-9.
- Yao, J.M; Wang, Y.C; Zhu, Y.G. 1992. A new variety of the pathogen of maize take-all. *Acta Mycologica Sinica* 11:99-104.
- Yun, Y; Yu, F; Wang, N; Chen, H; Yina Y; Maa Z. 2012. Sensitivity to silthiofam, tebuconazole and difenoconazole of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* isolates from China. *Pest Management Science* 68:1156-1163.
- Zapata, N; Vargas, M; Monsálvez, M; Ceballos, R. 2011. Crude extracts of *Drimys winteri* Bark to inhibit growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Chilean Journal of Agricultural Research* (71) 1:45-51.
- Zhang, D; Gao, T; Li, H; Lei, B; Zhu, B. 2017a. Identification of antifungal substances secreted by *Bacillus subtilis* Z-14 that suppress *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biocontrol Science and Technology* 27 (2):237–251.
- Zhang, D; Guo, XJ; Wang, YJ; Gao, TG; Zhu, BC. 2017b. Novel screening strategy reveals a potent *Bacillus* antagonist capable of mitigating wheat take-all disease caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Letters in Applied Microbiology* 65:512-519.
- Zorzi, E; Fernandes, G; da Silva, RT; Moura, S; Schwambach, J. 2017. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. *Scientia Horticulturae* 223:72–77

IX. ANEXOS

Anexo 1. Afectaciones por *Gaeumannomyces* spp en Agrícola Santa Isabella S.A. Sébaco, Matagalpa, Nicaragua.



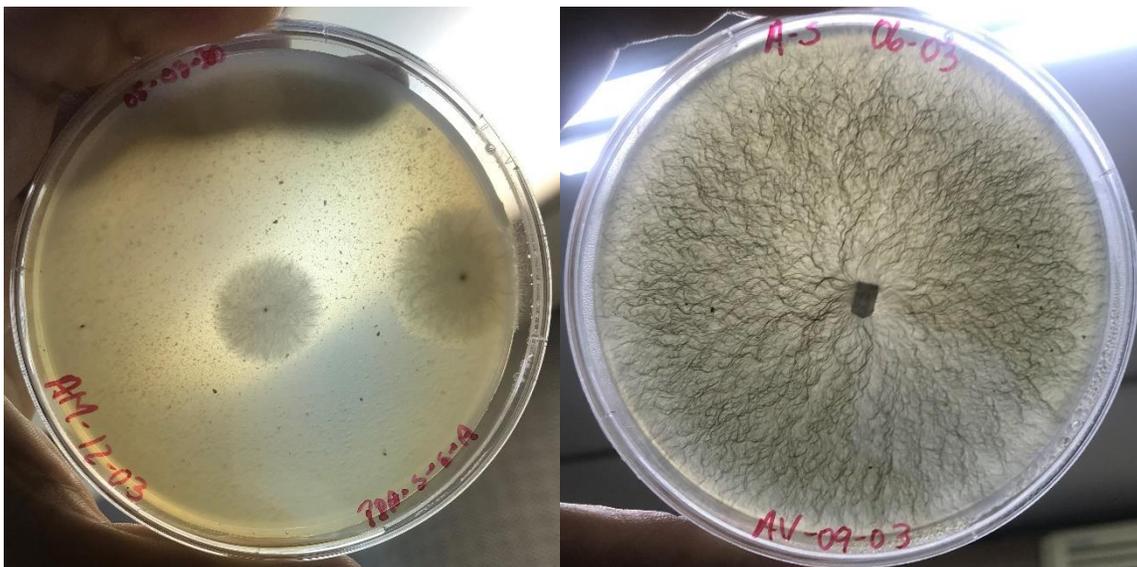
Anexo 2. Recolección de plantas de arroz afectadas por *Gaeumannomyces* spp en las fincas arroceras consideradas en el estudio.



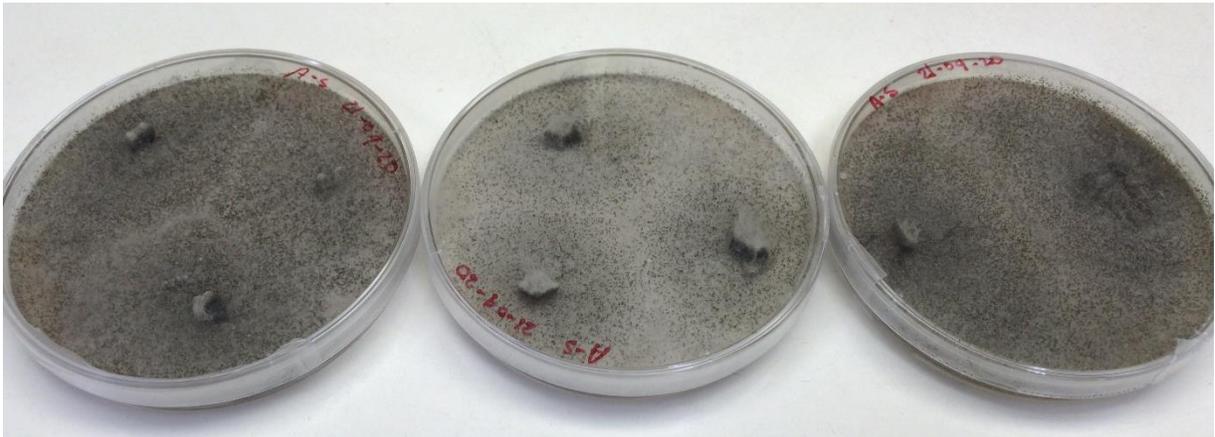
Anexo 3. Etapas del arroz para la obtención de semolina, ingrediente utilizado en los medios de cultivo en el presente estudio.



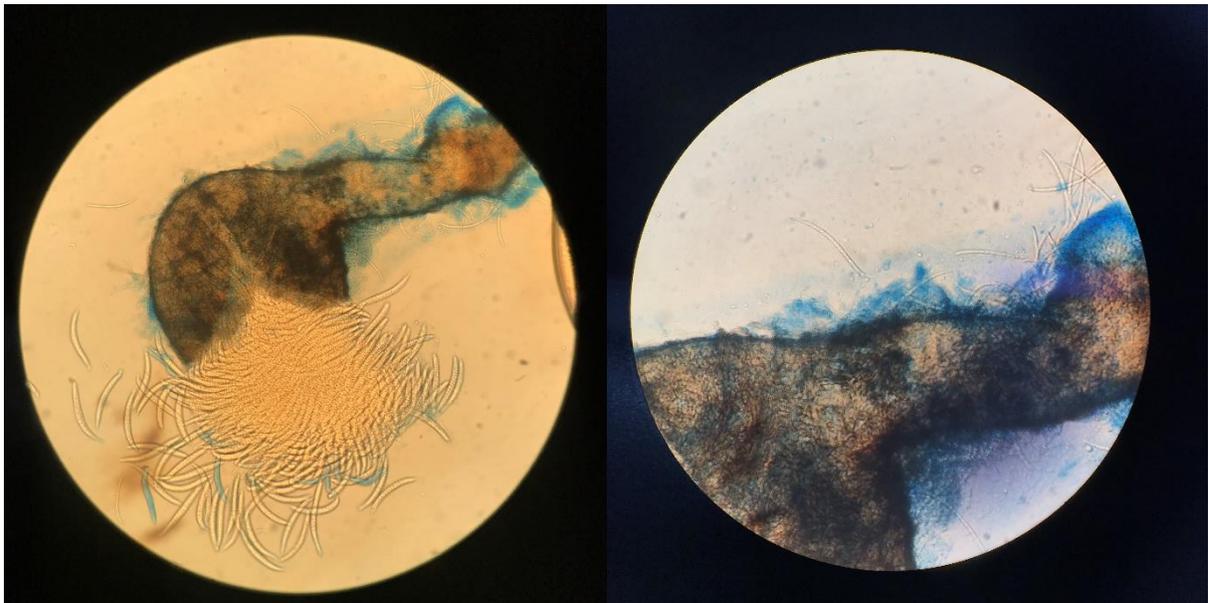
Anexo 4. Peritecios de *Gaeumannomyces* spp. germinados en el medio de cultivo PDS-SM-S-A y colonización en medio SM-A.



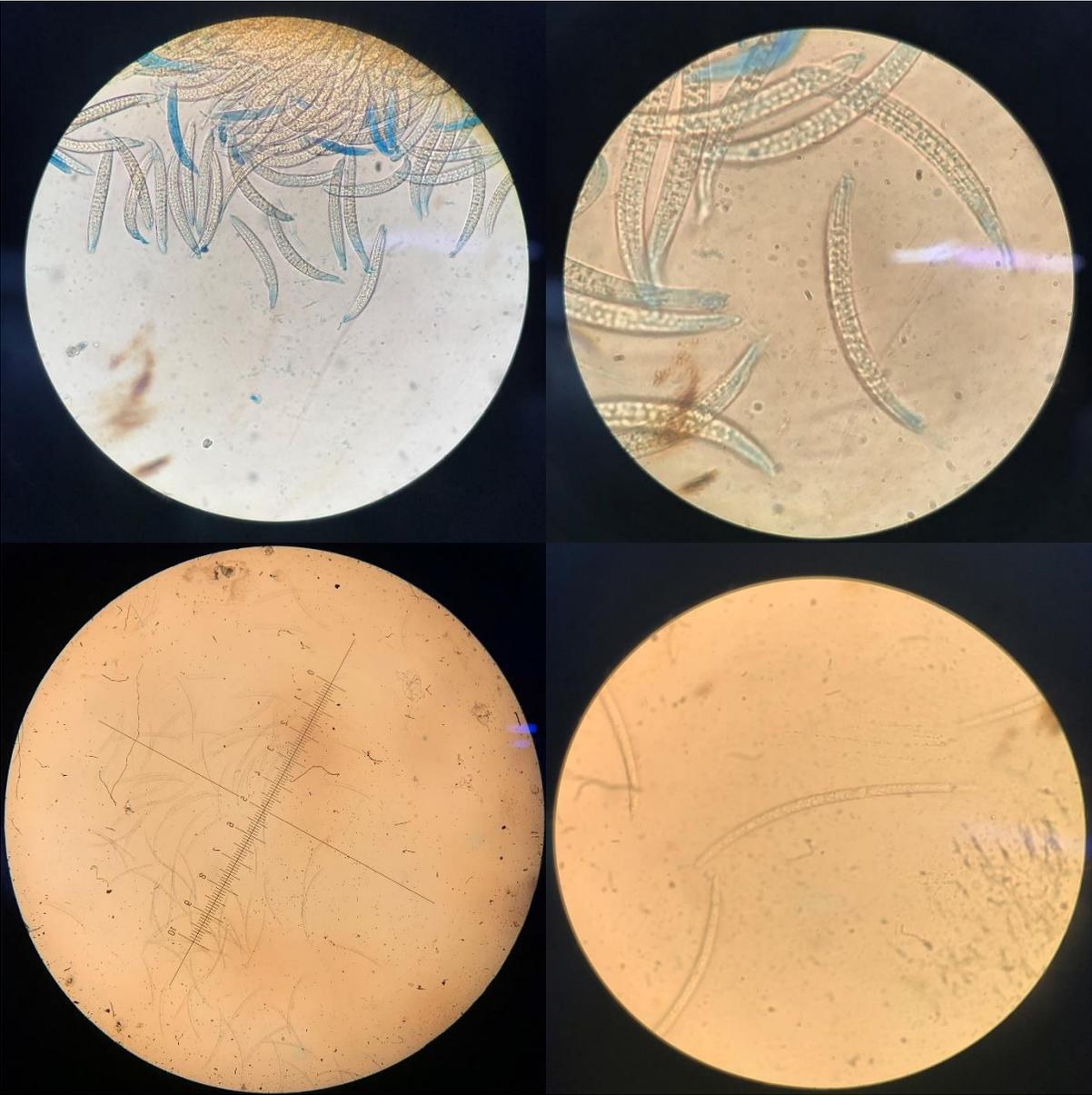
Anexo 5. *Gaeumannomyces* spp. en medio SM-A con abundante producción de peritecios.



Anexo 6. Peritecio maduro con presencia de ascosporas (vista 20X).



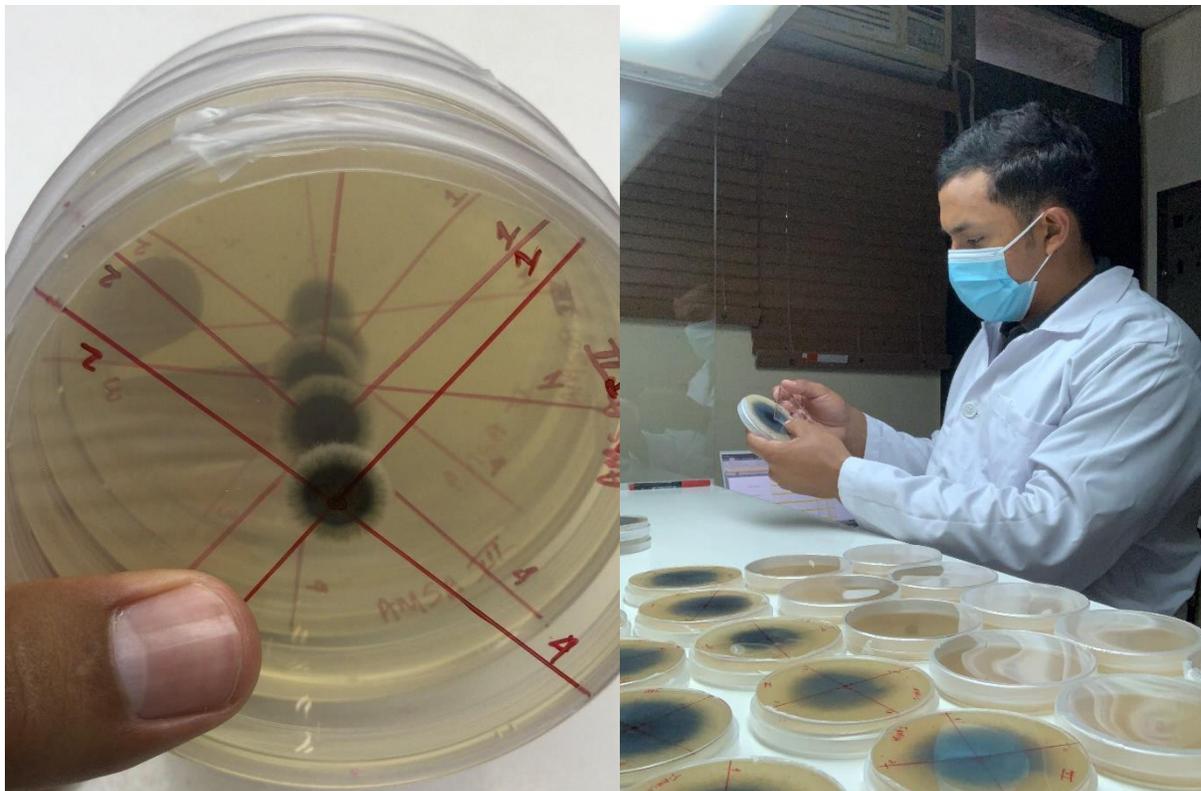
Anexo 7. Ascas y ascosporas vacuoladas obtenidas de aislados AV y AMSA.



Anexo 8. Fungicidas comerciales evaluados sobre los aislados de *Gaeumannomyces* spp.



Anexo 9. Evaluación de crecimiento micelial durante ensayo de sensibilidad a fungicidas comerciales.



Anexo 10. Diluciones seriadas realizadas para obtener colonias del fungicida biológico Tacre Bacillus Plus®.



Anexo 11. Análisis de varianza del estudio de inhibición micelial y separaciones de medias por Tukey ($\alpha=0.05$) (Infostat Ver. 2017)

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------|----|----------------|-------------------|------|
| Inhibición | 90 | 0.99 | 0.97 | 3.79 |

| F.V. | SC | gl | CM | F | Valor p |
|------------------------------|-----------|----|----------|---------|---------|
| Modelo | 115648.73 | 19 | 6086.78 | 826.9 | <0.0001 |
| Tratamientos | 109356.78 | 4 | 27339.19 | 3714.08 | <0.0001 |
| Repeticiones | 93.73 | 5 | 18.75 | 2.55 | 0.0356 |
| Aislados | 1210.47 | 2 | 605.23 | 82.22 | <0.0001 |
| Tratamientos*Aislados | 4987.76 | 8 | 623.47 | 84.7 | <0.0001 |
| Error | 515.27 | 70 | 7.36 | | |
| Total | 116164 | 89 | | | |

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.50651 Error: 7.3610 gl: 70

| Aislado | Medias | n | E.E. | |
|---------|--------|----|------|---|
| AMSA | 68.07 | 30 | 0.5 | A |
| ASI | 70.23 | 30 | 0.5 | B |
| AVSA | 76.7 | 30 | 0.5 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($\alpha < 0.05$)

| Tratamiento | Medias | n | E.E. | |
|-------------|--------|----|------|---|
| TacreBac | 23.94 | 18 | 0.64 | A |
| Am50WG | 34.39 | 18 | 0.64 | B |
| Funibiol | 100 | 18 | 0.64 | C |
| Amxtra | 100 | 18 | 0.64 | C |
| Alto10SL | 100 | 18 | 0.64 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($\alpha < 0.05$)

| Tratamiento | Aislado | Medias | n | E.E. | |
|-------------|---------|--------|---|------|---|
| Am50WG | AMSA | 16.67 | 6 | 1.11 | A |
| TacreBac | AV | 23.5 | 6 | 1.11 | B |
| TacreBac | AMSA | 23.67 | 6 | 1.11 | B |
| TacreBac | ASI | 24.67 | 6 | 1.11 | B |
| Am50WG | ASI | 26.5 | 6 | 1.11 | B |
| Am50WG | AV | 60 | 6 | 1.11 | C |
| Funibiol | AMSA | 100 | 6 | 1.11 | D |
| Funibiol | ASI | 100 | 6 | 1.11 | D |
| Funibiol | AV | 100 | 6 | 1.11 | D |
| Alto10SL | AV | 100 | 6 | 1.11 | D |
| Alto10SL | ASI | 100 | 6 | 1.11 | D |
| Alto10SL | AMSA | 100 | 6 | 1.11 | D |
| Amxtra | AV | 100 | 9 | 1.11 | D |
| Amxtra | ASI | 100 | 6 | 1.11 | D |
| Amxtra | AMSA | 100 | 6 | 1.11 | D |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($\alpha < 0.05$)