

Rhizoctonia solani AG-1-IA, CAUSA PRINCIPAL DEL AÑUBLO DE LA VAINA DEL ARROZ EN VENEZUELA

Luis Cedeño^{1,2}, Herman Nass³, Chrystian Carrero¹, Reinaldo Cardona³, Humberto Rodríguez³
y Luis Alemán³

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Apdo. 77, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A; ² Centro de Microscopía Electrónica, Apdo. 167, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A; ³ Estación Experimental Portuguesa-FONAIAP, Apdo. 102, Acarigua-Araure 3101-A, Portuguesa, Venezuela.

Recibido: 06 de Junio de 1996.

RESUMEN

ABSTRACT

Cedeño, L., Nass, H., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H. y Alemán, L. 1996. *Rhizoctonia solani* AG-1-IA, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. Fitopatol. Venez. 9:6-9.

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirmaron que un hongo perteneciente al grupo de anastomosis AG-1-IA de *R. solani*, estado asexual de *Thanatephorus cucumeris*, es la causa principal del añublo que ataca la vaina del arroz (*Oryza sativa*) en Venezuela. La tinción nuclear con HCl-Giemsa reveló que las células somáticas del patógeno fueron multinucleadas. En células distintas a la terminal y penúltima, el número de núcleos varió entre 3 y 7. El hongo realizó fusión hifal consistentemente con la cepa CBS 205.84 del grupo de anastomosis AG-1-IA de *R. solani*, adquirida del Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda. En papa-dextrosa-agar el patógeno originó colonias marrón-amarillentas y esclerocios semi-esféricos de base aplanada, no diferenciados en médula y corteza, con orificios por donde ocasionalmente se observó emerger una sustancia ámbar. Las inoculaciones realizadas en plantas de arroz 'Cimarrón' produjeron síntomas y signos similares a los observados en el campo. *R. solani* AG-1-IA fue aislado continuamente de los materiales infectados experimentalmente.

Palabras clave adicionales: *Thanatephorus cucumeris*, *Oryza sativa*

Cedeño, L., Nass, H., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H. and Alemán, L. 1996. *Rhizoctonia solani* AG-1-IA, major cause of rice sheath blight in Venezuela. Fitopatol. Venez. 9:6-9.

Results obtained in this study confirmed that a fungus belonging to the anastomosis group AG-1-IA of *R. solani* is the major cause of sheath blight on rice (*Oryza sativa*) in Venezuela. Nuclear staining with HCl-Giemsa revealed that somatic cells were multinucleated. In distinct terminal and penultimate cells the number of nuclei varied between 3 and 7. The fungus consistently anastomosed with the strain CBS 205.84 of the anastomosis group AG-1-IA acquired from Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands. On potato-dextrose-agar the pathogen produced yellowish-brown colonies and semi-spherical sclerotia with flattened base and not differentiated in medulla and cortex. Sclerotia possessed orifices from which a substance was occasionally observed to emerge. Inoculations of healthy 'Cimarrón' rice plants produced symptoms and signs similar to those seen in the field. *R. solani* was continuously isolated from experimentally infected tissues.

Additional key words: *Thanatephorus cucumeris*, *Oryza sativa*

INTRODUCCION

En Venezuela, el arroz (*Oryza sativa* L.) ocupa el segundo lugar entre los cereales de mayor importancia económica.

Anualmente en el país se producen aproximadamente 600.000 ton de arroz, cosechadas en 150.000 has distribuidas en los estados Guárico, Portuguesa, Cojedes, Apure y Barinas. Sin embargo, la explotación de este rubro es continuamente



Fig. 1. Síntoma del añublo de la vaina causado por *R. solani* AG-1-IA en plantas de arroz 'Cimarrón' infectadas experimentalmente.

amenazada por la aparición de enfermedades que afectan la calidad del grano y reducen los rendimientos. En Guárico y Portuguesa, regiones que aportan el 85% de la producción nacional, frecuentes evaluaciones de campo han demostrado que durante los últimos años, el síntoma conocido como añublo de la vaina, ha alcanzado niveles de incidencia y severidad bastante significativos. Tanto es así, que actualmente los daños ocasionados por esta enfermedad, que también ataca la panícula, hojas y tallos, solamente son superados en importancia por el 'brusone' causado por *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. (= *Pyricularia oryzae* Cav.). El agente causal del añublo de la vaina produce lesiones que inicialmente son verde-pálido y, posteriormente, presentan un centro de color semejante al de la paja seca o blanco-grisáceo y borde marrón-rojizo a púrpura (Fig. 1). La infección generalmente comienza en los tejidos de la vaina situados a nivel de la superficie de la lámina de agua. El síntoma de añublo resulta de la unión de varias lesiones. Aislamientos preliminares originaron colonias de un hongo estéril que formó esclerocios y presentó hifas con la morfología típica de *Rhizoctonia* DC. En esta forma-género se han incluido hongos Basidiomicetos, Ascomicetos y Deuteromicetos con características hifales semejantes (14). En virtud de lo anterior, la caracterización de la fase sexual se presenta como el criterio taxonómico más confiable para la diferenciación de estos hongos (10); sin embargo, tiene la dificultad de que su aparición espontánea es rara y, además, difícil de inducir experimentalmente. En ausencia del estado perfecto, la observación del septo y la cuantificación de núcleos en las células vegetativas facilitan el diagnóstico de algunas de estas especies (14). Por otra parte, en *R. solani* la evaluación de anastomosis permite el reconocimiento de grupos intra-específicos (12). Varias especies de *Rhizoctonia*, *R. solani* Kühn, *R. oryzae* Ryker & Gooch, *R. zae* Voorhees y *R. oryzae-sativae* (Saw.) Mordue, atacan la hoja envainadora del arroz (18); sin embargo, en Venezuela solamente *R. solani* ha sido formalmente reportada (5). Los síntomas causados por estas especies en las plantas de arroz son indistinguibles, pero se sabe que las células somáticas de *R. solani*, *R. oryzae* y *R. zae* son multinucleadas y las de *R. oryzae-sativae* binucleadas (17).

El presente estudio contiene información sobre la identificación y patogenicidad del agente causal de la enfermedad. Un reporte preliminar fue publicado en forma de resumen (11).

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento. Los materiales infectados se colectaron el 23-2-92 en Payara, estado Portuguesa. De los límites de las lesiones se cortaron fragmentos de 2x1 mm que fueron sumergidos por 5 min en solución 0,5% de hipoclorito de sodio, lavados varias veces en agua destilada estéril, secados y transferidos asépticamente a placas de agua-agar 2%. En el mismo medio también se sembraron esclerocios desinfectados superficialmente como antes se describió. Las placas se incubaron en condiciones normales del laboratorio (20-24°C). Los aislamientos obtenidos fueron posteriormente subcultivados en papa-dextrosa-agar (PDA), para producir los cultivos puros que serían utilizados en las pruebas de identificación y patogenicidad.

Caracterización nuclear. Para la cuantificación de núcleos en las células vegetativas hifales, se usaron cultivos producidos por 24-48 h, a 26-28°C, sobre portaobjetos cubiertos con una capa delgada de PDA e incubados en cámara húmeda preparada con cápsula de Petri, varilla de vidrio en forma de "v" y papel filtro estéril humedecido con agua destilada estéril. Los cultivos se tiñeron con HCl-Giemsa (15). Con el propósito de confirmar la efectividad del procedimiento de tinción, varias muestras de agar-micelio (3 mm diám) fueron extraídas del borde de colonias producidas en placas finas de PDA (6,5 ml) y procesadas para incluirlas en la resina de Spurr (16). Antes de la inclusión los materiales fueron fijados con una mezcla de formaldehído y glutaraldehído diluidos al 3% en tampón cacodilato de sodio 0,1M y pH 6,3; postfijados con tetróxido de osmio 1% y deshidratados en una serie gradual de alcohol etílico (50, 70, 80, 95 y 100%). De igual manera se incluyeron esclerocios producidos en PDA, a fin de evaluar la organización de los tejidos. Con un ultramicrotomo Sorvall-Porter Blum MT2 y cuchilla de diamante se hicieron cortes de 2µm que luego fueron colocados en portaobjetos, teñidos con Azur II 0,5% en solución acuosa de bórax 1% y examinados en un microscopio fotónico Zeiss modelo Axioplan MC 80.

Anastomosis. En la evaluación de anastomosis se utilizaron cepas representativas de los grupos de anastomosis de *R. solani*, adquiridas del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). El hongo investigado y los cultivos patrones se aparearon en placas preparadas con 6,5 ml de agua-agar 2% acidificado con ácido láctico, que se incubaron en condiciones normales del laboratorio (18-22°C) y completa oscuridad. Como inóculo se usaron discos (5 mm diám) de agar-micelio extraídos del margen de cultivos producidos durante 4 d en PDA, los cuales se colocaron separados por 2 cm. De la zona donde los micelios enfrentados hicieron contacto se cortaron rectángulos que fueron tratados con lactofucsina ácida 0,025% y examinados microscópicamente para confirmar la fusión de las paredes celulares.

Inoculación. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en plantas de arroz 'Cimarrón' de 60 d de edad cultivadas en recipientes de arcilla. La inoculación se hizo mediante la colocación de esclerocios entre la vaina y el tallo. En los controles no se colocaron esclerocios. Inmediatamente

después de la inoculación, los envases de arcilla se transfirieron a recipientes plásticos más grandes que contenían una lámina de agua, cuya superficie llegaba hasta 1cm por encima de la base del tallo. Las plantas se incubaron a 26-28°C y periódicamente fueron revisadas para observar el desarrollo de la enfermedad. De los tejidos inoculados se hicieron aislamientos para comprobar el cumplimiento de los postulados de Koch.

RESULTADOS

Aislamiento. Todos los aislamientos originaron colonias de características idénticas y en consecuencia correspondientes a un mismo hongo. Las colonias fueron inicialmente blancas, luego marrón-amarillentas y formaron esclerocios grandes, marrón-oscuro, semi-esféricos de base aplanada y con orificios por donde se observó emerger una sustancia de color ámbar. Cien esclerocios producidos por cultivos de un mes de edad presentaron un diámetro promedio de 3,7 mm (2-9 mm).

Caracterización nuclear. La tinción con HCl-Giemsa reveló que las células somáticas fueron multinucleadas (Fig.2). En células distintas a la terminal y penúltima el número de núcleos varió de 3-7. Los análisis practicados a las muestras miceliales incluidas en la resina de Spurr demostraron que efectivamente las células vegetativas del hongo investigado fueron multinucleadas, confirmando que el procedimiento de tinción utilizado es confiable para el revelado de los núcleos de esta clase de hongos. Esto permitió descartar la posibilidad de que los núcleos hubiesen sido confundidos con otros componentes celulares que también tienen afinidad con los colorantes básicos de uso rutinario en las tinciones nucleares rápidas, como es el caso de vacuolas cargadas con materiales de desecho, las cuales pueden alcanzar dimensiones similares a las estructuras nucleares.

Anastomosis. El hongo únicamente realizó anastomosis con la cepa AG-1-IA de *R. solani* (CBS 205. 84).

Inoculación y reaislamiento. Las pruebas de patogenicidad realizadas en plantas de arroz 'Cimarrón', produjeron síntomas y signos similares a los observados en el campo. Las plantas usadas como control permanecieron sanas. El patógeno causó lesiones en la vaina que más tarde se extendieron hasta las hojas. Las lesiones fueron inicialmente de color verde-grisáceo, de aspecto húmedo, circulares, oblongas a elipsoidales, pero posteriormente presentaron en el centro un color semejante al de la paja seca y un margen marrón a marrón-púrpura. La infección produjo la quema total de la vaina. El hongo inoculado fue aislado continuamente de los materiales infectados experimentalmente.

DISCUSION

Sobre la base de las características de los esclerocios, el número de núcleos en las células somáticas y las pruebas de anastomosis, se concluyó que el hongo investigado pertenece al grupo de anastomosis AG-1-IA de *R. solani* (17, 18). *R. solani*, anamorfo del basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk., es un hongo polífago que posee numerosas cepas causantes de enfermedades en una amplia variedad de plantas (1). Como la mayoría de estas cepas presentan diferencias en las características del crecimiento *in vitro* y



Fig. 2.(A-B). A) Característica nuclear en hifas de *R. solani* tratadas con HCl-Giemsa a las 24-48h de crecimiento en portaobjetos cubiertos con PDA. X488. B) Segmento de micelio incluido en la resina de Spurr, en el cual aparece parte de una hifa (flecha) seccionada longitudinalmente mostrando tres núcleos con sus nucléolos. X 775.

la patogenicidad, se ha inferido que en la especie existen grupos intraespecíficos (12). En virtud de lo anterior, varios criterios han sido evaluados para tratar de determinar relaciones de afinidad entre las cepas y, en consecuencia, establecer grupos claramente definidos. Sin embargo, la anastomosis es la única metodología que ha permitido separar la especie en grupos de anastomosis (AGs-) (12). Hasta ahora en *R. solani* han sido reconocidos doce AGs-(AG-1~11 y AG-BI) (1, 17). El AG-1, a su vez, fue subdividido en cuatro subgrupos, tres de los cuales(AG-1-IA~C) son causantes de quema foliar en huéspedes distintos (12), incluyendo arroz, maíz, sorgo y soja (3).

Varias especies de *Rhizoctonia*, *R. solani*, *R. oryzae*, *R. zea* y *R. oryzae-sativae*, cuyas hifas son morfológicamente indistinguibles, producen lesiones similares en la vaina del arroz y sólo pueden ser correctamente identificadas en función de la caracterización de la fase sexual. Sin embargo, la determinación del número de núcleos es un criterio útil para el diagnóstico preliminar. *R. oryzae* y *R. zea* son multinucleadas y originan el mismo estado teleomórfico, *Waitea circinata* Warcup & Talbot (13), mientras que

R. oryzae-sativae es binucleada y su estado perfecto es *Ceratobasidium oryzae-sativae* Gunnell & Webster (2). Además, según Marshall y Rush (7), los mecanismos de infección de *R. solani* y *R. oryzae* son idénticos. Ambas producen cojines de infección y apresorios lobulados, a partir de los cuales se forman elementos de perforación que penetran directamente los tejidos del huésped. De lo anterior se deduce que estos patógenos no pueden ser diferenciados por la sintomatología y que, en consecuencia, es indispensable realizar y analizar los aislamientos correspondientes para poder determinar la exacta identidad de agentes patógenos particulares y, en base a ello, proceder a seleccionar las prácticas de control más adecuadas.

Las pruebas de patogenicidad y reaislamiento confirmaron que la cepa investigada es la causa principal de la quemadura que ataca la vaina de las plantas del arroz en Venezuela. La enfermedad se encuentra ampliamente extendida en las principales áreas arroceras del país, ocasionando daños que la ubican como la segunda más importante del cultivo. El añublo de la vaina aparece frecuentemente en las plantaciones de arroz de las regiones templadas y tropicales (4); sin embargo, el presente artículo constituye el primer reporte formal sobre la presencia del grupo de anastomosis AG-1-IA de *R. solani* en Venezuela. En el sur de EE.UU. tiene carácter endémico y es la enfermedad más notable del cultivo (4). Las infecciones iniciales usualmente son provocadas por esclerocios y residuos contaminados que flotan en el agua (6). La infección inicial es causada por estructuras de penetración que se originan en cojines de infección (7). Marshall y Rush (7) reportaron que la penetración se produce por presión mecánica, pero Matsuura (8), manifestó no tener la certeza de si la perforación fue provocada por fuerza mecánica o por acción enzimática. Aunque Marshall y Rush (7) también observaron penetración por los estomas, consideraron que ellas fueron ineficientes y no implicaron la formación de cojines de infección. Según estos mismos autores la severidad de la enfermedad está directamente relacionada con la formación de estructuras de infección y al respecto señalaron que esta habilidad es estimulada por el huésped y, además, constituye una medida de la agresividad del patógeno hacia un huésped en particular.

Estudios realizados con microscopía de luz y electrónica de barrido han proporcionado informaciones contradictorias en relación al sitio de penetración del hongo. Marshall y Rush (7) opinaron que la penetración se produce por la epidermis externa, mientras que Matsuura (8) sostiene que ocurre a través de la superficie interna. De cualquier manera, posteriormente la infección alcanza la hoja bandera y la panícula, afectando el llenado de los granos y, en consecuencia, disminuyendo los rendimientos. Las plantas de porte semi-enano son más susceptibles que las de altura estándar, ya que la distancia entre la superficie de la lámina de agua y el follaje es mucho más corta (6). Los elevados índices de prevalencia y severidad que actualmente se registran en Asia y EE.UU. han sido atribuidos a los incrementos en los niveles de fertilización nitrogenada, la siembra de cultivares que poseen una gran capacidad formadora de brotes, el uso de soja en los programas de rotación y el aumento en la densidad de población (6, 9).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la valiosa asistencia técnica de la T.S.U. Kleyra Quintero.

LITERATURA CITADA

1. Carling, D.E., Rothrock, C. S., MacNish, G. C., Sweetingam, M. W., Brainard, K. A. and Winters, S. W. 1994. Characterization of anastomosis group 11 (AG-11) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 84:1387-1393.
2. Gunnell, P. S. and Webster, R. K. 1984. The teleomorph of *Rhizoctonia oryzae*. *Phytopathology* 74: 857 (Abstract).
3. Jones, R. K. and Belman, S.B. 1989. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from rice, soybeans, and other crops grown in rotation with rice in Texas. *Plant Dis.* 73: 1004-1010.
4. Lee, F. N., and Rush, M. C. 1983. Rice sheath blight: a major rice disease. *Plant Dis.* 67: 829-832.
5. Malaguti, G. 1951. Mancha de la hoja envainadora del arroz causada por *Rhizoctonia solani*. *Agron. Trop.* 1: 71-75
6. Marchetti, M. A. 1983. Potential impact of sheath blight on yield and milling quality of short-statured rice lines in the southern United States. *Plant Dis.* 67: 167-165.
7. Marshall, D. S. and Rush, M. C. 1980. Relation between infection by *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* and disease severity in rice. *Phytopathology* 70:941-946.
8. Matsuura, K. 1986. Scanning electron microscopy of the infection process of *Rhizoctonia solani* in leaf sheaths of rice plants. *Phytopathology* 76: 811-814.
9. Mew, T. W. and Rosales, A. M. 1986. Bacterization of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76: 1260-1264.
10. Mordue, J. E. M., Currah, R. S., and Bridge, P. D. 1989. An integrated approach to *Rhizoctonia* taxonomy: cultural, biochemical and numerical techniques. *Mycol. Res.* 92: 78-90.
11. Nass, H., Cedeño, L., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H., y Alemán, L. 1995. *Rhizoctonia solani* AG-1-1A, importante patógeno del arroz (*Oryza sativa*) en Venezuela. *Rev. For. Venez.* 1: 142-143 (Resumen).
12. Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Khun. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 125-143.
13. Oniki, M., Ogoshi, A., Araki, T., Sakai, R., and Tanaka, S. 1985. The perfect state of *Rhizoctonia oryzae* and *R. zea* and the anastomosis groups of *Waitea circinata*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 26: 189-198.
14. Parmeter, J. R., Jr., Whitney, H. S, and Platt, W. D. 1967. Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 57: 218-223.
15. Rogers, J. D. 1965. The conidial state of *Coniochaeta lignaria*. *Morphology and cytology.* *Mycologia* 57: 368-378.
16. Spurr, J. D. 1969. A low viscosity resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31-43.
17. Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. *Am. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul, Minnesota.* 133 pp.
18. Webster, R. K. and Gunnell, P. S. 1992. Compendium of rice diseases. *Am. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul, Minnesota.* 62 pp.