

VIABILIDAD DE *Rhizoctonia solani* AG1-IA BAJO CONDICIONES DE INUNDACIÓN. III. COMPORTAMIENTO *IN VITRO* DE LOS PRÓPAGULOS

Dilcia Ulacio¹, Herman Nass² y Juan Pineda³

RESUMEN

Se investigó la viabilidad *in vitro* de propágulos de *Rhizoctonia solani* AG1-IA a fin de detectar su sobrevivencia luego de permanecer bajo una lámina de agua por 15, 30 y 45 días. Tanto micelio como esclerocios del hongo fueron enterrados en bolsas de polietileno a 3, 10 y 17 cm de profundidad utilizando suelo con tradición arroceras tanto esterilizado como sin esterilizar. Cumplido cada período de tiempo, el micelio en trozos de hojas de arroz y esclerocios fueron extraídos del suelo y colocados en Agar-Agua. El testigo del ensayo consistió en colocar propágulos sin tratar en medio de cultivo. Los resultados demostraron que el hongo puede sobrevivir bajo condiciones anaeróbicas. Sin embargo, a mayor tiempo de inundación menor fue la sobrevivencia del micelio disminuyendo a un 58 % de viabilidad cuando fue enterrado por 45 días, no así los esclerocios que mantuvieron un promedio de 89 % de viabilidad en todos los tiempos de inundación independientemente de la profundidad y de la condición de esterilización del suelo.

Palabras clave adicionales: Sobrevivencia, anaerobiosis, arroz

ABSTRACT

Viability of *Rhizoctonia solani* AG1-IA in flooding conditions. III. *In vitro* behaviour of pathogen propagules

A research concerning survival of *Rhizoctonia solani* AG1-IA was carried out *in vitro* conditions. Propagules of *R. solani* were placed in flooded soil at depths of 3, 10 and 17 cm in plastic bags for 15, 30 and 45 days, using non esterilized and esterilized soils. Non treated *R. solani* propagules were utilized as control. At the end of each time period, the propagules were transferred to Water-Agar. Results showed that propagules survived even in anaerobic condition. However, survival of micelyum was reduced (aproximatelly at 58 % of viability) when the water lodging time was increased from 15 to 45 days. Sclerotia maintained an average of 89 % of viability, regardless of lodging time, depth and soil condition.

Additional key words: Survival, anaerobic condition, rice

INTRODUCCIÓN

Rhizoctonia solani, del grupo de anastomosis AG1-IA, constituye uno de los grupos más importantes de la especie (Anderson, 1982; Ogoshi, 1987; Sneh et al., 1991). Causa, entre otras enfermedades, el tizón de la vaina de la hoja de arroz (*Oryza sativa*), cultivo de gran importancia en áreas tropicales y subtropicales. La enfermedad representa un problema grave en muchas zonas arroceras, especialmente en países asiáticos y en algunas regiones de Estados Unidos donde se le ha considerado una de las principales enfermedades del cultivo (Busch Agricultural

Resource, 1992; Jones y Belmar, 1989; Lee y Rush, 1983). *Rhizoctonia solani* sobrevive entre cultivos como esclerocios en el suelo y en menor grado como micelio en restos de plantas (Ogoshi, 1987).

Se considera que el desarrollo de la enfermedad no es controlada ni aún por las plantas consideradas resistentes al hongo, por lo que se buscan otras estrategias para limitar la producción de esclerocios o su longevidad. Teóricamente, el inóculo primario puede ser reducido si se combinan cultivares resistentes con fungicidas. Esto último, en conjunto con programas culturales diseñados para limitar el

Recibido: Abril 27, 1999

Aceptado: Enero 28, 2000

¹ Dpto. de Ciencias Biológicas. Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado.

² FONAIAP, CIAE - Yaracuy. Estación local Yaritagua. Apdo. 09. Yaritagua, estado Yaracuy. Venezuela.

³ Posgrado de Fitopatología, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado.

Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela.

inóculo y reducir la severidad de la enfermedad, están siendo mejorados y desarrollados a nivel mundial (Bush Agricultural Resource, 1992; Lee, 1980). Entre estos programas están los de mantener bajo inundación los propágulos del hongo para limitar su sobrevivencia o lograr cierto control biológico a través de antagonistas del suelo (Martin, 1977; Mew y Rosales, 1985).

En Venezuela la enfermedad causada por *R. solani* AG1-IA es endémica en todas las zonas arroceras. Sin embargo, se ha observado un incremento en la incidencia del tizón de la vaina, principalmente en los estados Barinas y Guárico (Rodríguez y Nass, 1991). Así mismo, el patógeno está causando graves problemas en maíz en el estado Portuguesa (R. Cardona, FONAIAP, Comunicación personal).

Actualmente, a nivel nacional, algunos institutos de investigación están orientando estudios en el comportamiento de este fitopatógeno y las posibles formas de control no sólo químicas si no también culturales. En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue detectar la sobrevivencia *in vitro* de *R. solani* AG1-IA tanto del micelio (ubicado en trozos de vainas de hojas de arroz) como de los esclerocios después de haber permanecido enterrados en diferentes períodos de tiempo a diferentes profundidades bajo una lámina de agua, tratando de reducir el potencial de inóculo así como disminuir el daño causado en el cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fase preliminar

Esclerocios de *R. solani* AG1-IA fueron colocados en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) a pH 7,0 a temperatura ambiente con el fin de producir mayor cantidad de estas estructuras de resistencia para inocular plantas de arroz y obtener los esclerocios necesarios para ser utilizados posteriormente.

Se utilizó suelo trasladado desde la finca "La Unión", que ha sido tradicionalmente cultivada de arroz y está ubicada en la zona de Araure, estado Portuguesa. El suelo fue utilizado en dos condiciones: sin esterilizar y esterilizado.

Ensayos con las muestras de tejido enfermo

Para obtener las muestras de tejido enfermo, los esclerocios de *R. solani* fueron inoculados en

las plantas de arroz variedad Colombia 1 siguiendo todo el procedimiento descrito previamente (Ulacio et al., 1998). Las muestras fueron colocadas en bolsitas de nylon (Lumsden, 1981) a 3, 10 y 17 cm de profundidad durante períodos de 15, 30 y 45 días utilizando tanto suelo esterilizado (SE) como suelo no esterilizado (SNE). Para cada profundidad se realizaron tres repeticiones.

Ensayo con esclerocios de *R. solani*

Se colocaron 20 esclerocios de entre 15 y 20 días de edad con un tamaño aproximado entre 5 a 6 mm en bolsitas de nylon los cuales fueron sometidos al mismo proceso utilizado para los trozos de tejido enfermo.

Cumplido cada período de inundación, las bolsitas de nylon fueron extraídas y lavadas con agua.

Pruebas en el laboratorio

Posteriormente, cuatro trozos de tejido enfermo extraídos de cada una de las profundidades establecidas en los diferentes períodos bajo inundación, tanto de SNE como de SE, fueron colocados en cajas de Petri con Agar-Agua, siendo comparados con el testigo en lo relativo al inicio del crecimiento micelial y porcentaje de sobrevivencia. Igual procedimiento se realizó a los esclerocios que se mantuvieron bajo inundación. El testigo consistió en colocar los propágulos en las cajas de Petri en condiciones normales de laboratorio.

El estudio fue conducido y analizado como un diseño completamente al azar en parcelas divididas, tal como fue descrito anteriormente (Ulacio et al., 1999). La variable analizada fue el porcentaje de sobrevivencia de los propágulos del hongo. En un caso se colocaron cuatro trozos de tejido enfermo (micelio) provenientes del suelo inundado en cada caja de Petri, realizando tres repeticiones para cada profundidad. El porcentaje de sobrevivencia fue el promedio de aquellos trozos de tejido cuyo micelio fue viable en las tres profundidades para cada uno de los períodos de inundación y las condiciones de suelo establecidos. En el caso de los esclerocios, fue colocado uno de ellos por cada caja de Petri. El porcentaje de sobrevivencia fue medido de acuerdo a su capacidad para producir micelio (Lee, 1980), luego de haber permanecido en los

tres períodos de inundación y las tres profundidades del ensayo. Estos resultados fueron comparados con el testigo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Prueba de sobrevivencia del micelio de *R. solani*

Todos los tratamientos que habían estado sometidos a inundación iniciaron su crecimiento micelial aproximadamente a las 72 horas, a diferencia del testigo que inició el crecimiento al día siguiente del aislamiento (aproximadamente a las 15 horas). Aunque hubo una diferencia de tiempo entre los tratamientos y el testigo de aproximadamente dos días, era de esperar este tipo de respuesta al exponer al micelio a una condición tan adversa. Sin embargo, esta leve diferencia lo coloca como uno de los hongos con alta capacidad de sobrevivencia tomando en cuenta que el micelio es el propágulo más vulnerable.

La mayor producción de micelio provino de los trozos de tejido enfermo sometidos a inundación por 15 días, con promedios estadísticamente superiores al de aquellos inundados por 45 días (Cuadro 1). Se observa que la viabilidad del micelio disminuyó hasta un 58 % aproximadamente cuando el tiempo de inundación pasó de 15 a 45 días. Esto está en concordancia con la virulencia mostrada por el hongo en

estudios previos (Ulacio et al., 1999). Se destaca que, en promedio, la sobrevivencia del micelio fue de aproximadamente 31 % en relación a la del testigo.

Cuadro 1. Porcentaje promedio de supervivencia del micelio de *R. solani* para los factores tiempo de inundación, esterilización de suelo y profundidad

Factor	Tratamiento	Sobrevivencia (%)
Tiempo	15 días	40,3 a
	30 días	30,6 ab
	45 días	23,6 b
Condición de suelo	SE	38,0 a
	SNE	25,0 b
Profundidad	3 cm	44,4 a
	10 cm	26,4 b
	17 cm	23,6 b

Prueba de medias según Duncan al 5 %

El hecho de que sólo hubo crecimiento micelial en el 31 % de los tratamientos bajo inundación indica que factores inherentes al suelo inundado (reacciones químicas, anaerobiosis, microorganismos) afectaron de una u otra forma la viabilidad del micelio, independientemente de la profundidad. El porcentaje de sobrevivencia del micelio difirió entre SNE y SE, especialmente para los trozos de tejido enfermo mantenidos a 30 y 45 días de inundación (Figura 1).

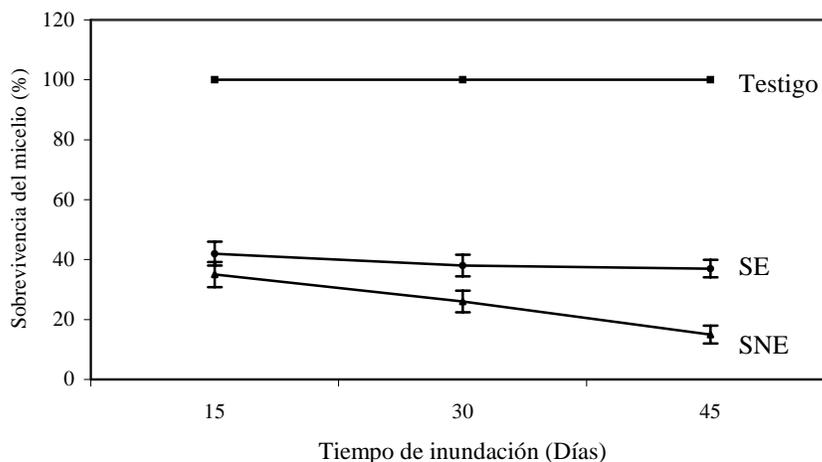


Figura 1. Relación entre la sobrevivencia del micelio de *R. solani* proveniente de tejido enfermo y los tiempos de inundación bajo estudio. SE: suelo esterilizado; SNE: suelo no esterilizado. La longitud de las barras representa el error estándar.

Estos resultados son corroborados por el análisis estadístico (Cuadro 1), donde el factor condición de suelo resultó con diferencias significativas y la mayor sobrevivencia provino de SE. En general, la menor sobrevivencia del micelio se evidenció también de los trozos de tejido enfermo provenientes de 45 días bajo inundación en SNE. Esto indicó que el mayor tiempo de inundación aunado a la presencia de microorganismos (Ulacio et al., 1998) influyeron en la viabilidad del micelio de *R. solani* tal como se evidenció para la virulencia del hongo en las plantas de arroz (Ulacio et al., 1999).

En estudios realizados sobre la sobrevivencia saprofítica de *Thanatephorus cucumeris* (teleomorfo de *R. solani*) en paja de arroz en condiciones secas y húmedas, tanto en SNE como en SE (Mew y Rosales, 1985), se comprobó que dicha sobrevivencia fue disminuyendo en suelo inundado. Así mismo, la recuperación del hongo en los trozos de hojas declinó con el tiempo. Esto coincide con los resultados del presente estudio, donde la sobrevivencia del micelio fue bastante afectada en todos los tratamientos bajo inundación en ambas condiciones del suelo y la recuperación del mismo también declinó con el tiempo de inundación (Figura 1).

Papavizas (1970) menciona que la capacidad saprofítica del hongo en el suelo va a depender no solo de la tasa de crecimiento y producción de antibiótico o toxinas entre otros, sino también de otros microdeterminantes del ecosistema como lo son el número y la variedad del antagonista que se encuentre en el sustrato. Señala que los saprófitos fuertes son frecuentemente más capaces de sobrevivir que los saprófitos débiles, existiendo evidencias en cuanto a que el grado de saprofitismo y la longevidad de *R. solani* están fuertemente interrelacionados.

Un hongo tan variable en su capacidad para colonizar sustratos en el suelo, no debería depender solamente de su nutrición parasítica para su sobrevivencia en el mismo (Papavizas, 1970). Existen evidencias de que la presencia de *R. solani*, en suelo naturalmente infestado, no dependió completamente de la nutrición parasítica por al menos 20 semanas. Esto también se observó en la presente investigación donde en ambas condiciones de suelo hubo sobrevivencia del micelio. Los bajos porcentajes

en tratamientos con inundación en constrate con los resultados del testigo, podrían atribuirse no sólo a la condición anaeróbica, si no también a los cambios químicos que según De Datta (1986) se suscitan en un suelo inundado. Sin embargo, estas probables reacciones químicas y la presencia de microorganismos no fueron determinantes en este estudio para inhibir completamente la viabilidad de *R. solani* AG1-IA en cajas de Petri.

En relación a lo anterior, se podría inferir que la sobrevivencia del micelio de *R. solani*, pudiera presumiblemente relacionarse con dos condiciones: a) la existencia de bases alimenticias a través de restos de cosecha y el crecimiento de plantas acuáticas, que favorecerían la sobrevivencia del hongo, y b) la presencia de otros microorganismos que exigirían un mayor esfuerzo para sobrevivir por parte de *R. solani*.

En cuanto a la profundidad, este factor resultó con diferencias altamente significativas presentándose mayor porcentaje de sobrevivencia a los 3 cm, tal como se muestra en la prueba de medias (Cuadro 1). Este predominio se observó con mayor énfasis en SNE, pero en general, el menor porcentaje de sobrevivencia para ambas condiciones de suelo se observaron en aquellos trozos de tejido enterrados a los 17 cm provenientes de 45 días bajo inundación, es decir, las condiciones más adversas. No hubo diferencias significativas en las interacciones entre los factores estudiados, indicando que cada uno actuó en forma independiente. Según De Datta (1986) y Rivillo (1986), la condición de anaerobiosis no ocurre totalmente en suelos inundados. Ellos señalan que luego de la inundación se mantiene cierta condición aeróbica en la superficie del suelo y en ocasiones en una capa por debajo de la capa arable. Existen estudios (Papavizas, 1970) que demuestran que los diferentes aislamientos de *R. solani* no solo difieren en su capacidad parasítica y saprofítica, sino también en su tolerancia al CO₂ y otros agentes antimicrobiales. Esta capacidad al parecer es propia en los diferentes grupos de anastomosis en mayor o menor grado, mas aún en el grupo AG1-IA, que según Anderson (1982) tienen la característica de soportar ambientes acuáticos. Otros estudios con *R. solani* en suelo seco (Papavizas et al., 1975) demostraron que la actividad del hongo estuvo confinada por encima de 10 cm de profundidad en el suelo y que a 20 ó

25 cm se reduciría el potencial del inóculo y la sobrevivencia del patógeno el cual pudiera no ser capaz de colonizar extensivamente residuos de plantas a estas profundidades. Así mismo, este efecto debería relacionarse con la presencia de los microorganismos. En un trabajo previo, la presencia de microorganismos y lapsos prolongados de anaerobiosis retrasaron posteriormente la producción de esclerocios a partir del micelio a tal punto que en algunas cajas de Petri no fue posible la formación de estas estructuras de resistencia y en otros casos sólo lograron formarse unas pocas de ellas (Ulacio et al., 1998).

B. Prueba de sobrevivencia de los esclerocios de *R. solani*.

Tal como ocurrió con el micelio, los esclerocios sometidos a inundación iniciaron el crecimiento micelial a las 72 horas y el testigo a las 15 horas luego del aislamiento en PDA. La diferencia de sólo dos días con respecto al testigo para iniciar crecimiento micelial sugiere que los mismos como estructuras de resistencia pudieron soportar los cambios que se suscitaron en el suelo por efecto de la inundación manteniendo una alta viabilidad *in vitro*, la cual para este ensayo presentó una media general del 89 %. En el Cuadro 2 se observa que aunque aparentemente existió una leve tendencia del comportamiento de los esclerocios similar al del micelio, las diferencias entre tratamientos fueron muy pequeñas, sin significancia estadística. Estos resultados difieren un poco de los encontrados en *Sclerotium cepivorum* por Redondo y Hernández (1985), quienes señalan que ocurrió una pérdida importante de viabilidad de los esclerocios sometidos a inundación en el laboratorio; sin embargo, coinciden con los de Castillo y Garzón (1987), quienes detectaron una alta viabilidad luego de 30 días bajo inundación en condiciones de invernadero. En ensayos para determinar la patogenicidad de los esclerocios de *R. solani* AG1-IA sobre plantas de arroz, se observó que la viabilidad de los mismos se mantuvo aún después de 45 días bajo inundación (Ulacio et al., 1999).

Cuadro 2. Porcentaje promedio de supervivencia de los esclerocios de *R. solani* para los factores tiempo de inundación, esterilización de suelo y profundidad

Factor	Tratamiento	Sobrevivencia (%)
Tiempo	15 días	100 ns
	30 días	89,0
	45 días	77,8
Condición de suelo	SE	92,7 ns
	SNE	85,3
Profundidad	3 cm	100 ns
	10 cm	89,0
	17 cm	77,8

Prueba de medias según Duncan al 5 %

Se detectaron esclerocios no viables, con mayor frecuencia cuando estuvieron bajo 30 y 45 días de inundación, provenientes tanto de SNE como de SE. Naiki (1983) indica que existe un marcado incremento en el tamaño de las poblaciones microbiales alrededor de la superficie del esclerocio en el suelo con el período de incubación y destacan que diversos micoparásitos y otros efectos antagonistas de los microorganismos del suelo pueden afectar la germinación esclerocical.

Con respecto a la producción de nuevos esclerocios a partir de los mantenidos bajo inundación cuando los mismos se colocaron en PDA, se observó que no hubo mucha diferencia de tiempo en el inicio de formación de los mismos entre el testigo (5 días), y los de SE en condiciones inundadas (6 a 8 días). Sin embargo, en aquellos tratamientos de SNE bajo condiciones de inundación, no se observó la formación de las estructuras de resistencia detectando la presencia de *Rhizopus sp* y colonias bacterianas. En aquellos tratamientos donde hubo producción de esclerocios, el número de éstos (10 a 15 esclerocios/caja de Petri) estuvo muy por debajo del testigo (50 a 60 esclerocios/caja de Petri a pH 7,0). De este resultado se podría suponer que la viabilidad de los esclerocios con respecto al micelio posiblemente se vio afectada más por la presencia de los microorganismos que por la condición anaeróbica ya que el grupo de anastomosis AG1-IA tolera esta condición precisamente en la forma de estructuras de resistencia (Anderson, 1982).

CONCLUSIONES

El micelio de *R. solani* AG1-IA fue capaz de desarrollarse en medio de cultivo luego de permanecer enterrado bajo inundación. Sin embargo, su sobrevivencia se vio progresivamente afectada a medida que aumentó el período inundado y la profundidad en el suelo.

La sobrevivencia de los esclerocios fue poco afectada por los factores antes mencionados. Sin embargo, no se descarta un efecto sobre el potencial del inóculo debido a la baja producción de nuevas estructuras de resistencia a partir de los ya tratados.

Los propágulos del hongo demostraron una alta capacidad saprofítica competitiva. Sin embargo, aparentemente los microorganismos presentes también influyeron en la viabilidad de los mismos siendo mayor el porcentaje de sobrevivencia cuando el suelo fue esterilizado.

LITERATURA CITADA

- Anderson, N. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Ann. Rev. Phytopathol. 20: 329-347.
- Busch Agricultural Resource 1992. Compendium of Rice Disease. Robert R. Webster y Pamela S. Gunnel (eds.). APS Press. St Paul. Minnesota.
- Castillo, T. de J. y J. A. Garzón. 1987. Control de la "Pudrición blanca" (*Sclerotium cepivorum*) en el cultivo de ajo por medio de inundación y fungicidas. XIV Congreso Nacional de Fitopatología. Morelia. México. Memorias. p. 124.
- De Datta, S. 1986. Producción de Arroz. Fundamentos y Prácticas. Editorial Limusa. México.
- Jones, R. K. y E. G. Belmar. 1989. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia spp* isolated from rice, soybean and other crops grown in rotation with rice in Texas. Plant Disease 73 (12): 1001 – 1010.
- Lee, N. F. 1980. Number, viability, and buoyancy of *Rhizoctonia solani* sclerotia in Arkansas rice fields. Plant Disease 64(3): 298 - 305.
- Lee, F. y M. C. Rush. 1983. Rice sheath blight: A major rice disease. Plant Disease 67 (7): 829 – 832.
- Lumsden, R. D. 1981. A nylon fabric technique for studying the ecology of *Phythium aphanidermatum* and other fungi in soil. Phytopathology 71 (3): 282 - 285.
- Martin, A. 1977. Introduction to Soil Microbiology. Second edition. Wiley & Sons New York.
- Mew, T. W. y A. M. Rosales. 1985. Influence of *Thichoderma* on survival of *Thanatephorus cucumeris* in association with rice in the tropics. In: C. A. Parker et al. (eds). Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. APS Press. St Paul. Minnesota. pp. 117 – 120.
- Naiki, T. 1983. Population and survival of sclerotia of *Rhizoctonia solani* in soil. In: Parker et al. (eds.) Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. APS Press. St Paul. Minnesota. pp. 51 – 53.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*. In: C. A. Parker et al. (eds.). Ecology and Management Soilborne Plant Pathogens. APS Press. St Paul. Minnesota. pp. 57 - 58.
- Papavizas, G. C. 1970. Colonization and growth of *Rhizoctonia solani* in soil. In: John Parmeter (ed.). *Rhizoctonia solani* Biology and Pathology. American Phytopathological Society. University of California. Berkeley. pp. 108 – 121.
- Papavizas, G. C., P. B. Adams, R. D. Lumsden, J. A. Lewis, R. L. Dow, W. A. Ayers y J. G. Kantzes. 1975. Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. Phytopathology 65: 871 – 877.

15. Redondo J. E. y A. Hernández. 1985. Disminución de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* B. en el suelo por inundación. XII Congreso Nacional de fitopatología. Guanajuato. México.
16. Rivillo, A. 1986. Cinéticas físico – químicas de suelos venezolanos bajo condiciones de inundación. Tesis. Posgrado en Ciencias del Suelo. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 377 p.
17. Rodríguez, H. y H. Nass 1991. Las enfermedades del arroz y su control. Fonaiap Divulga 9(35): 18-21.
18. Sneh, B., L. Burpee y A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. APS Press. St Paul. Minnesota.
19. Ulacio, D. M, H. Nass, J. Pineda y A. Carrasco. 1998. Viabilidad de *Rhizoctonia solani* Kuhn AG1-IA bajo condiciones de inundación. I. Micoflora asociada al patógeno en tejido de *Oryza sativa*. Bioagro 10(2): 40-47.
20. Ulacio, D., H. Nass y J. Pineda. 1999. Viabilidad de *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de inundación. II. Comportamiento de los propágulos en plantas de arroz. Bioagro 11(2): 61 – 68.