

TÉCNICA DE INOCULACIÓN RÁPIDA Y EFICIENTE PARA LA EVALUACIÓN DE MATERIALES DE MAÍZ ANTE *Rhizoctonia solani* Kühn

Juan Pineda¹, Alexander Hernández¹, Alex González², Venancio Barrientos²,
Herman Nass³ y Elizabeth Gil³

RESUMEN

Para la búsqueda de germoplasmas de maíz resistentes a *Rhizoctonia solani* es necesario realizar pruebas de inoculación y determinar su comportamiento. Para ello se requiere de una técnica de inoculación que proporcione una respuesta rápida, efectiva y confiable en la manifestación de la enfermedad, y que sea de fácil y práctica aplicación a una gran población de plantas y materiales genéticos. Con este fin se realizaron pruebas en el Posgrado de Agronomía de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, en Tarabana, estado Lara, Venezuela, y en las instalaciones de la Fundación DANAC, San Javier, estado Yaracuy, con plantas de maíz, desarrolladas en vivero. Se utilizaron las siguientes ocho técnicas: inoculación a la semilla, siembra en suelo inoculado con una de las siguientes tres formas: hojas de maíz infectadas, esclerocios o granos de arroz infectados, y aplicación sobre plantas de maíz de una de las siguientes cuatro formas: esclerocios, granos de arroz infectados, trocitos de hojas de maíz infectados o micelio sobre el ápice de plantas de 15 días de edad. La cepa de *R. solani* fue aislada de la localidad El Playón, estado Portuguesa. La técnica más adecuada resultó ser la utilización de granos de arroz infectados aplicados al momento de la siembra (incidencia 100%), aunque la utilización de esclerocios de *R. solani* también resultó eficiente, pero menos práctica su aplicación; la inoculación a la semilla de maíz fue eficiente, pero presentó el menor tamaño de mancha. Para inoculaciones al follaje, el tratamiento con mayor incidencia en plantas (100%) fue el de granos de arroz; la aplicación de micelio produjo una respuesta más rápida y mayor tamaño de mancha (9,43 cm). La técnica más segura y factible para la inoculación de *Rhizoctonia solani* en plantas de maíz de 15 días de edad la constituyó la de granos de arroz infectados con el patógeno por su facilidad de aplicación y de multiplicación del inóculo.

Palabras clave adicionales: Germoplasma, mancha bandeada, resistencia a enfermedades

ABSTRACT

Efficient and fast inoculation technique for evaluation of maize germplasms for resistance to *Rhizoctonia solani* Kuhn

In search of resistance to *Rhizoctonia solani* in maize germplasms, it is necessary to make inoculation tests to determine its behavior. Inoculation techniques that provide fast, effective, and reliable responses in the manifestation of the disease and also of easy and practical application to a wide population of plants and genetic materials are required. Tests were conducted at Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Posgrado de Agronomía in Tarabana, Lara State, Venezuela and in the facilities of DANAC Foundation in San Javier, Yaracuy State, utilizing maize plants, grown under nursery conditions. The following eight techniques were tested: seed inoculation, sowing in soil inoculated with one of three options (infected maize leaves, infected rice grains or esclerotia), and application on 15-day old maize plants of one of four options (esclerotia, micelia, infected maize leaves or infected rice grains). *R. solani* stock was isolated from the locality of El Playón in Portuguesa State. The most practical and reliable technique was the use of infected rice grains at the time of sowing (incidence 100 %), although the use of *R. solani* esclerotia also was efficient, but less practical its application; the inoculation to the maize seed was efficient, but it showed minor size of the lesions. In foliage inoculation, the treatment with more incidences in plants (100 %) also was the one of infected rice grains. The application of micelia alone produced a fast response and large size of lesions (9.43 cm). The more reliable and feasible technique for *R. solani* inoculation in 15 days old maize plants, by its facility of application and inocula multiplication, as constituted by the use of rice grains infected with the pathogen.

Additional key words: Germplasm, banded leaf spot, disease resistance

Recibido: Diciembre 1, 2004

Aceptado: Agosto 22, 2005

Proyecto financiado por el Convenio UCLA-Fundación DANAC

¹ Posgrado de Agronomía. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: jpineda@ucla.edu.ve

² Fundación DANAC. San Javier del Valle, estado Yaracuy, Venezuela

³ INIA. Estación Local Yaritagua, estado Yaracuy. Venezuela

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales más importantes en Venezuela, ubicándose en el segundo lugar después del cultivo de arroz. La producción se ha mantenido cercana al millón de toneladas hasta la última década (MAC, 1998). La producción se concentra en los llanos centrales y occidentales (estados Portuguesa, Guárico y Barinas), aproximadamente con un 55% del total, los valles intermontanos bajos del estado Yaracuy y los llanos orientales (estados Monagas, Anzoátegui y norte de Bolívar) (Fontana y González, 2000).

La mancha bandeada de la hoja del maíz causada por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn es una enfermedad común en India (Ahuja y Payak, 1984) reportándose pérdidas en rendimiento entre 11-40 % en campos experimentales (Singh y Sharma, 1976). En años recientes, la enfermedad ha sido considerada como una de las principales que afectan al maíz en China (Li et al., 1998). En América está presente desde hace muchos años, pero recientemente se ha observado una alta incidencia en siembras comerciales (Sumner y Minton, 1989; De León, 2004). En Venezuela, desde el año 1995, se ha señalado que la enfermedad afecta severamente hojas, tallos y mazorcas en siembras de maíz en la colonia agrícola Turén, estado Portuguesa (Cardona et al., 1999; Fontana y González, 2000) lo que ha traído como consecuencia una disminución en el rendimiento de los cultivares comerciales que actualmente se siembran.

Cabrera y García (2000) señalan que la mancha bandeada o Rhizoctoniosis del maíz afecta a todos los cultivares disponibles comercialmente en Venezuela, los cuales muestran susceptibilidad. En India, Ahuja y Payak (1984) encontraron que de 141 germoplasmas probados bajo infección artificial en campo, 35 se comportaron como resistentes a la enfermedad.

Actualmente el control de la Rhizoctoniosis del maíz en el país se realiza mediante la aplicación de productos químicos y biológicos, pero la habilidad saprofítica del hongo, la formación de estructuras de resistencia en el suelo y el hecho de ser un microorganismo polífago dificultan su erradicación y las prácticas de control tienden a ser ineficientes, lo cual hace al control altamente costoso, no existiendo información sobre

cultivares comerciales resistentes que es el método más económico, eficiente y duradero de control.

En la búsqueda de materiales que presenten algún grado de resistencia a *R. solani* es necesario realizar pruebas de inoculación en todos los germoplasmas disponibles a objeto de determinar su comportamiento ante el patógeno. Para estas pruebas, lo primero que se requiere es disponer de una técnica de inoculación que proporcione una respuesta rápida, efectiva y confiable en la manifestación de la enfermedad y a la vez que sea fácil y factible de aplicar a una gran población de plantas y materiales. El objetivo planteado en este trabajo fue determinar la técnica de inoculación de *Rhizoctonia solani* en plantas jóvenes de maíz que fuese efectiva en su respuesta y práctica en su aplicación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas en laboratorio y vivero se realizaron en las instalaciones del Posgrado de Agronomía de la UCLA, ubicadas en Tarabana, estado Lara, y en las instalaciones de la Fundación DANAC, ubicadas en San Javier, estado Yaracuy. Un aislamiento de *Rhizoctonia solani* identificado con las siglas PIVP1, procedente de El Playón, estado Portuguesa, se multiplicó masivamente para obtener suficientes esclerocios. También se multiplicó en granos de arroz esterilizados y humedecidos y en hojas tiernas de maíz previamente esterilizadas en autoclave. Para todas las pruebas se utilizó semilla de maíz cv. Danac-2002.

Se utilizaron ocho técnicas para la inoculación de *R. solani* las cuales se describen a continuación:

1. Inoculación a la semilla: Se utilizó una suspensión concentrada de micelio del hongo en la cual se colocó la semilla de maíz por un tiempo de 5 horas; la misma fue sembrada en recipientes plásticos con suelo de textura franco-arcillosa, previamente esterilizado, los cuales se colocaron sobre mesones en condiciones de vivero.

2. Siembra en suelo inoculado con hojas de maíz infectadas: En recipientes de plástico con suelo esterilizado se sembraron semillas de maíz, las cuales fueron cubiertas con material vegetal (hojas secas de maíz molidas) infectado con el patógeno. A esto se le agregó una solución acuosa de sacarosa al 5 % y se cubrieron con una capa

fina de suelo esterilizado.

3. Siembra en suelo inoculado con esclerocios:

En recipientes de plástico que contenían suelo esterilizado, mezclado con cascarilla de arroz en proporción 2:1 se sembraron semillas de maíz e inmediatamente se esparcieron, sobre la superficie, 20 esclerocios del patógeno, cubriéndose con una capa fina del sustrato.

4. Siembra en suelo inoculado con granos de arroz infectados: Tratamiento similar al anterior, pero colocando en el sustrato 20 g de granos de arroz esterilizados e infectados con *R. solani*. Las observaciones se efectuaron a partir de la germinación, cuando comenzaron a emerger las plántulas.

5. Aplicación de esclerocios sobre plantas en desarrollo: En plantas de 15 días de edad, previamente desarrolladas en recipientes plásticos con suelo esterilizado se aplicó inóculo de *R. solani*, constituido por trozos de esclerocios macerados. La aplicación se realizó sobre la planta de manera que el inóculo cayera sobre el ápice de crecimiento.

6. Aplicación de granos de arroz con *R. solani* sobre plantas en desarrollo: Tratamiento similar al anterior, pero multiplicando el inóculo en granos de arroz esterilizados y humedecidos, los cuales se aplicaron sobre las plantas a razón de 3-5 granos/planta.

7. Aplicación de trocitos de hojas de maíz infectadas con *R. solani* sobre el ápice: Tratamiento similar al anterior, pero utilizando trozos de tejido vegetal inoculados con el patógeno. Las hojas fueron incubadas en el laboratorio a 25 ± 2 °C y luz continua durante 7 días, en recipientes de vidrio y luego se aplicó este inóculo sobre el ápice (cogollo) de las plantas.

8. Aplicación de micelio de *R. solani* sobre plantas en desarrollo: Se utilizó una solución de hifas del patógeno en agua estéril, obtenida del raspado superficial del micelio contenido en placas de Petri. Esta solución se aplicó en plantas de 15 días de edad, colocando 1 ml en el ápice (dentro del cogollo). El criterio para seleccionar una planta de 15 días se aplicó con base a que a esta edad ya se puede apreciar y medir el desarrollo de la mancha causada por el patógeno.

Las observaciones se comenzaron a los 7 días de inoculadas las plantas, por un lapso de 15 días. Para comprobar el efecto del inóculo en la planta,

se dispuso de un tratamiento control (sin inóculo), considerándose la planta enferma cuando aparecían los síntomas típicos producidos por *R. solani* en las vainas de las primeras hojas (manchas necróticas de color marrón claro, en forma de bandas extensas, en la vaina de las primeras hojas que envuelven el tallo). La incidencia de la enfermedad se obtuvo contando el número de plantas enfermas en relación al total de plantas en cada tratamiento, expresada como porcentaje (Número de plantas enfermas x 100/total de plantas). La longitud de la mancha en la vaina foliar o en la hoja expandida se midió utilizando una regla graduada en mm, promediando el tamaño máximo de las manchas hasta los 15 días de observación, en cada tratamiento.

Se establecieron dos experimentos repetidos con cuatro tratamientos cada uno y tres repeticiones por tratamiento (4 plantas/repeticion) en donde cada técnica constituyó un tratamiento. El primero de ellos formado por los tratamientos aplicados al momento de la siembra y el segundo por los tratamientos aplicados sobre plantas de 15 días de edad. El diseño experimental usado fue completamente aleatorizado y para su análisis se utilizó el Programa Statistix versión 7.0. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayor incidencia de la enfermedad en plantas (100%) se presentó con la utilización de granos de arroz infectados con el patógeno *R. solani*, tanto en el tratamiento aplicado al suelo como en el tratamiento aplicado al follaje (ápice) (Cuadros 1 y 2). Así también, la menor incidencia de la enfermedad ocurrió cuando se utilizó material vegetal infectado (hojas secas de maíz cortadas), aplicado al suelo o en el follaje (49,9 y 33,3 %, respectivamente).

La aplicación de esclerocios de *R. solani* al suelo produjo un alto porcentaje de incidencia en plantas (83,3 %) en comparación con la aplicación de esclerocios al follaje (55,5 %). Igualmente, el porcentaje de incidencia para el tratamiento micelio aplicado al follaje fue alto y de respuesta rápida (48 h después de inoculado); sin embargo, el avance de la infección en la hoja se detuvo rápidamente. En las plantas mantenidas como

control no se manifestaron los síntomas observados en los diferentes tratamientos inoculados.

Singh et al. (2002) usando esclerocios o micelio de *R. solani* para inocular plantas de arroz de 4 semanas de edad en condiciones de invernadero recomiendan el uso de esclerocios inmaduros colocados en la vaina foliar, considerando que así se puede mantener la uniformidad del inóculo; no obstante, señalan que el período de incubación fue más corto (26 h) cuando se utilizó micelio del hongo como inóculo.

Delgado et al. (2004) probaron dos métodos de inoculación utilizando dos fuentes de inóculo, esclerocios y granos de arroz colonizados, con el objeto de probar germoplasmas de arroz ante *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de campo evaluando la proporción, forma y tipo de inoculación, además de la época de aplicación. Los resultados indicaron que la inoculación con esclerocios fue la más confiable, aunque el método de granos de arroz colonizados resultó ser más práctico y puede ser recomendado cuando la cantidad de materiales a evaluar es elevada. Este método, no obstante, presentó resultados variables por efecto de las precipitaciones luego de la inoculación.

Harris et al. (1993) desarrollaron técnicas para la inoculación de plántulas con especies de *Rhizoctonia* en recipientes pequeños utilizando sustratos orgánicos y concluyeron que la cáscara de arroz y el afrecho de trigo eran sustratos adecuados para el cultivo y la liberación de *R. solani* y *Rhizoctonia* spp. binucleadas, debido a que las partículas son fuertemente colonizadas por estos patógenos y pueden ser uniformemente incorporadas al medio en pequeñas dosis. Esto refuerza la idea de utilizar granos de arroz infectados con el hongo incorporados al suelo o al follaje para la inoculación de plantas de maíz en recipientes, ya que éstos son colonizados en toda su superficie por *R. solani* y se puede uniformizar en cierta forma el inóculo, conociendo las cantidades a aplicar.

Con relación al tamaño de la mancha, éste se observó bastante similar en la mayoría de los tratamientos aunque hubo diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos. El mayor tamaño de la mancha correspondió a los tratamientos con granos de arroz infectados, esclerocios aplicados al suelo y micelio aplicado al follaje. Singh et al.

(2002) consideran que en arroz, la susceptibilidad relativa de los cultivares a la enfermedad causada por *R. solani* debe ser estimada de acuerdo a la longitud de la lesión, 96 h después de la inoculación. En este experimento ocurrió uniformidad en la longitud de la mancha en todos los tratamientos, excepto cuando se utilizó material vegetal infectado aplicado al follaje y semilla de maíz infectada con el patógeno. Sin embargo, la mancha se extendió a medida que transcurrió el tiempo desde la inoculación y posiblemente este proceso podría ser más acelerado en los materiales muy susceptibles a la enfermedad.

Cuadro 1. Comparación de medias de incidencia y longitud de la mancha por *R. solani* en plantas de maíz para técnicas de inoculación aplicadas al suelo y a la semilla

Técnicas	Incidencia (%)	Longitud de la mancha (cm)
Granos de arroz infectados aplicados al suelo	100,00 a	9,23 a
Esclerocios aplicados al suelo	83,33 ab	10,03 a
Semilla infectada	83,33 ab	6,61 b
Hojas de maíz infectadas aplicadas al suelo	49,99 b	8,69 ab

Separación de medias según prueba de Tukey, $P \leq 0,05$

En general, todas las técnicas fueron efectivas (excepto la utilización de material vegetal infectado) en cuanto a la expresión de la enfermedad en la planta. La aplicación de esclerocios al suelo y micelio aplicado al follaje aseguran un alto porcentaje de incidencia y un buen tamaño de la mancha, lo cual sería suficiente para evaluar materiales en cuanto a su resistencia, pero el método más seguro y factible por su facilidad de aplicación y de multiplicación del inóculo lo constituyó el de granos de arroz infectados, aplicados ya sea al suelo o al follaje. Además, la aplicación de esclerocios al suelo puede ser riesgosa, ya que éstos están expuestos al ataque por antagonistas habitantes del suelo que pueden afectar su viabilidad en el campo (Ulacio et al., 2000); adicionalmente, si las condiciones no son apropiadas, podría retardarse mucho su germinación o simplemente no germinan, lo cual afectará el porcentaje de incidencia de la enfermedad en plantas.

Esta técnica puede ser efectiva y práctica bajo condiciones de umbráculo o condiciones controladas para evaluar materiales de maíz y poder realizar una discriminación previa de cultivares antes de ser probados en campo, con lo cual se ahorraría tiempo y recursos y se probaría rápidamente el comportamiento de una gran cantidad de materiales.

Cuadro 2. Comparación de medias de incidencia y longitud de la mancha por *R. solani* para técnicas de inoculación al follaje en plantas de maíz de 15 días de edad

Técnicas	Incidencia (%)	Longitud de la mancha (cm)
Granos de arroz infectados aplicados al ápice	100,00 a	7,94 ab
Micelio aplicado al follaje	88,88 a	9,43 a
Esclerocios aplicados al ápice	55,55 ab	8,19 ab
Hojas de maíz infectadas aplicadas al ápice	33,33 b	3,96 b

Separación de medias según prueba de Tukey, $P \leq 0,05$

CONCLUSIONES

La técnica más segura y factible para la inoculación temprana de *Rhizoctonia solani* en plantas de maíz (a partir de 15 días de edad), la constituyó la de granos de arroz infectados aplicados ya sea al suelo o al follaje, por su facilidad de aplicación y de multiplicación del inóculo.

La utilización de esclerocios de *R. solani* también fue eficiente, pero menos práctica para su aplicación. El uso de micelio produjo una respuesta más rápida y mayor tamaño de la mancha al principio; sin embargo, el avance se detiene rápidamente. Esta técnica de inoculación es rápida, eficiente y altamente reproducible para la evaluación temprana de materiales de maíz ante la mancha bandeada del maíz, en condiciones de vivero y puede ser aplicada también en el campo.

LITERATURA CITADA

- Ahuja, S.C. y M.M. Payak. 1984. Screening of maize germplasm for resistance to banded leaf and sheath-blight. *Indian J. Sci.* 54 (12): 1019-1022.
- Cabrera, S. y P. García. 2000. Incidencia, severidad y efecto sobre el peso de la mazorca de maíz (*Zea mays*) de la mancha bandeada (*Rhizoctonia solani*) en siembras comerciales en el estado Portuguesa: V Jornada Científica Nacional del Maíz. UNELLEZ. Guanare. pp. 101-102.
- Cardona, R., H. Rodríguez y H. Nass. 1999. Manchas bandeadas en maíz causadas por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. *Fitopatología Venezolana.* 12 (2): 32-33.
- De León, C. 2004. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en campo. CIMMYT. México. 118 p.
- Delgado, N. J., H. A. Rodríguez, y M. C. Ramón. 2004. Evaluación de métodos de inoculación de *Rhizoctonia solani* sobre germoplasma de arroz en campo. *Rev. Fac. Agron.* 21: 374-384.
- Fontana, N. y C. González. 2000. El maíz en Venezuela. Enfermedades del maíz en Venezuela. Fundación Polar. Caracas. 529 p.
- Harris, A.R., D.A. Schisler y S.M. Neate. 1993. Culture of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* spp. on organic substrates for inoculation of seedlings in containers. *Soil Biol. Biochem.* 25(3): 337-341.
- Li, H.R., B.C. Wu y S.Q. Yan. 1998. Aetiology of *Rhizoctonia* in sheath blight of maize in Sichuan. *Plant Pathology* 47:16-21.
- MAC. (Ministerio de Agricultura y Cría). 1998. Dirección de estadística e informática. Anuario estadístico agropecuario. Caracas. Venezuela. 319 p.
- Singh, B.M. y Y.R. Sharma. 1976. Evaluation of maize germplasm to banded sclerotial disease and assessment of yield loss. *Indian Phytopath.* 29: 129-132.
- Singh A., R. Rohilla, U.S. Singh, S. Savary, L. Willocquet y E. Duveiller. 2002. An improved

- inoculation technique for sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Can. J. Plant Pathol. 24: 65-68.
12. Sumner, D.R y N. A. Minton. 1989. Crop losses in corn induced by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 and nematodes. Phytopathology 79: 934-941.
13. Ulacio, D., H. Nass y J. Pineda. 2000. Viabilidad de *Rhizoctonia solani* AG1-1A bajo condiciones de inundación. III. Comportamiento *in vitro* de los propágulos. Bioagro 12(1): 3-9.