

RHIZOCTONIA ORYZAE-SATIVAE, AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA AGREGADA DEL ARROZ EN VENEZUELA

LUIS CEDEÑO,^{1,2} HERMAN NASS³, CHRYSYIAN CARRERO¹, REINALDO CARDONA³,
HUMBERTO RODRIGUEZ³ y LUIS ALEMÁN³

RESUMEN

Se identificó a *Rhizoctonia oryzae-sativae*, especie binucleada de la forma-género *Rhizoctonia*, como la causa de la mancha agregada que ataca la vaina de las plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) en Venezuela. La enfermedad está presente en Barinas, Guárico y Portuguesa, donde durante los últimos años se ha venido observando un incremento apreciable en los niveles de incidencia y severidad. Las lesiones de mancha agregada se reconocen porque aparecen como bandas agregadas de centro verde-grisáceo a café-claro y margen marrón a marrón-rojizo. En PDA el hongo produjo hifas que tuvieron un grosor promedio de 6,04 (5-7) (μ) y formó esclerocios superficiales, individuales y agregados, de color marrón a marrón-grisáceo, irregularmente globosos y con el tejido no diferenciado médula y corteza. Las colonias fueron inicialmente blancas y posteriormente marrón-claras. Los esclerocios midieron 1,9 (0,9-2,2) x 1,2 (0,9-

1,5) mm y se apreciaron constituidos por células globosas apreciablemente estranguladas a nivel del septo y por hifas indiferenciadas. Las células esclerociales globosas midieron 20,7 (13-28) x 16,7 (12-23) (μ m). Con la tinción HCl-Giemsa se comprobó que las células somáticas fueron principalmente binucleadas; sin embargo, ocasionalmente se visualizaron células con 1, 3, y 4 núcleos. El hongo realizó anastomosis consistentemente con la cepa ATCC-52545 de *R. oryzae-sativae* aislada de arroz en California. Las inoculaciones realizadas en arroz 'Cimarrón', produjeron síntomas similares a los observados en el campo. *R. Oryzae-sativae* fue aislado continuamente de las plantas inoculadas, confirmando los postulados de Koch. El estado sexual no fue observado en PDA ni en los materiales infectados natural y artificialmente.

SUMMARY

Rhizoctonia oryzae-sativae, a binucleate species of the form-genus *Rhizoctonia*, was identified as the cause of aggregate sheath spot on rice (*Oryza sativa* L.) in Venezuela. The disease was observed on rice plants cultivated in Barinas, Guárico and Portuguesa states, where its incidence and severity have increased during the past few years. On potato-dextrose-agar (Difco PDA), the fungus produced colonies that formed undifferentiated sclerotia. The colonies, whose hyphae averaged 6.04 (5-7) (μ) in diameter, were initially white and later turned light-brown. The sclerotia appeared individually and aggregated and were observed irregularly globose, brown to grayish-brown

and constituted by globose cells interspersed with undifferentiated hyphae. One hundred sclerotia averaged 1.9 (1.6-2.2) x 1.2 (0.9-1.5) mm. The globose sclerotial cells measured 20.7 (13-28) x 16.7 (12-23) (μ m). HCl-Giemsa staining revealed mainly binucleate hyphal cells, however occasionally cells showing 1, 3 and 4 nuclei were seen. The fungus frequently anastomosed with the culture ATCC 52545 of *R. oryzae-sativae* isolated from rice in California. Inoculations done on plants of rice 'Cimarrón' produced symptoms similar to those observed in the field. *R. Oryzae-sativae* was continuously isolated from experimentally infected plants confirming the Koch' postulates.

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es indudablemente importante en Venezuela. Existen unas 50.000 has cultivadas en los estados Apure, Barinas, Cojedes, Guárico y Portuguesa, que anualmente producen cerca de 600.000 tons de granos. La producción nacional no sólo satisface la demanda interna, sino que además deja un excedente disponible para la exportación. Sin embargo, debido a la forma intensiva

como se cultiva este cereal, las plantas están permanentemente expuestas a la acción de enemigos naturales, principalmente hongos habitantes del suelo, que reducen los rendimientos y deterioran la calidad del grano.

En marzo de 1994, durante inspecciones de rutina realizadas en los arrozales de Calabozo, estado Guárico, con el propósito de conocer las enfermedades que afectan el cultivo en Venezuela, frecuentemente se encontraron plantas con le-

siones en la vaina, semejantes a las descritas en la literatura como mancha agregada (Gunnell y Webster, 1985; Webster y Gunnell, 1992). Las lesiones se observaron en forma de bandas concéntricas con centro verde-grisáceo a café-claro y margen marrón a marrón-rojizo. A partir de los tejidos infectados, se aisló consistentemente un hongo que produce esclerocios no diferenciados en médula y corteza e hifas con la morfología característica de las especies de la forma-gé-

nero *Rhizoctonia*. Observaciones posteriores permitieron comprobar que la enfermedad también se presenta en Barinas y Portuguesa, donde los niveles de incidencia y severidad alcanzados durante los últimos años, sugieren la necesidad de tomar las previsiones necesarias para impedir que en el futuro inmediato los daños causados tengan apreciable repercusión en la productividad del cultivo. En Venezuela se han reportado cuatro especies de hongos que atacan la hoja

PALABRAS CLAVE/ *Oryzae-Sativae* / Mancha Arroz / *Rhizoctonia* /

1 Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Apdo. 77 (La Hechicera), Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A,

2 Centro de Microscopía Electrónica, Apdo 167, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A, E-mail: cluis@ing.ula.ve

3 Centro de Investigaciones Agropecuarias Portuguesa-FONAIAP, Apdo. 102, Acarigua, Venezuela.

envainadora del arroz y producen esclerocios; dos especies pertenecen al género *Rhizoctonia*, *R. solani* Kühn (Cedeño *et al.*, 1996; Malaguti, 1951) y *R. Oryzae* Ryker & Gooch (Cedeño *et al.*, 1995a), y las dos restantes al género *Sclerotium*, *S. hydrophilum* (Cedeño *et al.*, 1995b) y *S. oryzae* (Garrido y Malaguti, 1995), siendo la primera de las mencionadas la que entraña mayor importancia económica.

El trabajo que se reporta fue realizado con el propósito de establecer correctamente la identidad del agente causal de la enfermedad investigada. Un reporte preliminar fué publicado en forma de resumen (Cedeño *et al.*, 1995c).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento

Del margen de lesiones de mancha agregada se cortaron fragmentos de 2 mm² que fueron tratados por 3 min en hipoclorito de sodio 0,5 %, lavados varias veces con agua destilada estéril, secados y sembrados asépticamente en placas de agar-agua 2 %. Las placas se incubaron en condiciones normales (22- 24°C) del Laboratorio de fitopatología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de la Universidad de Los Andes. Los aislamientos obtenidos fueron purificados por transferencias continuas de ápices hifales a placas de PDA (Difco) y posteriormente se conservaron bajo refrigeración (4°C) en tubos de PDA inclinado. Las características del crecimiento in vitro se evaluaron en cultivos de 30 d en PDA incubados a 26 - 28 °C en completa total. La tasa de crecimiento radial se determinó en 5 placas de PDA, midiendo en cada una de ellas dos diámetros en ángulo recto a las 72 h de la siembra. Como inóculo se usaron discos de agar-micelio (8 mm diam), extraídos del margen de colonias producidas durante 4 d en el mismo medio señalado

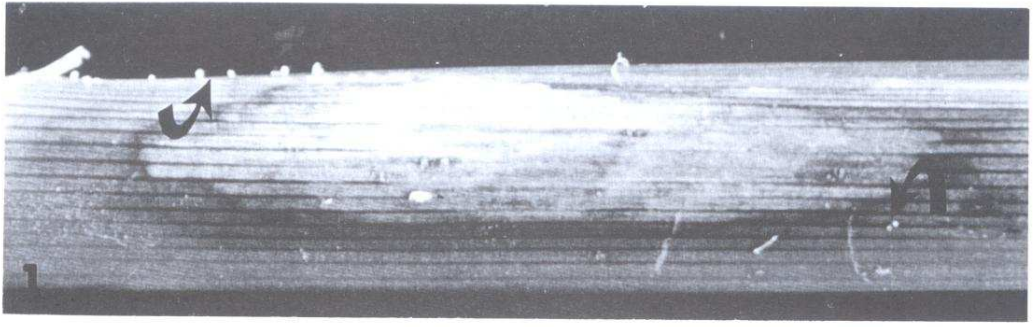


Fig. 1. Lesión causada por *R. oryzae-sativae* en arroz. Las flechas curvas señalan esclerocios en formación.

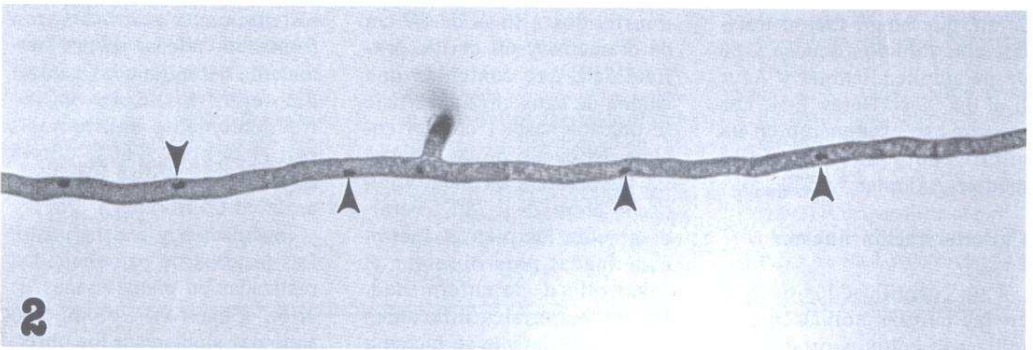


Fig. 2. Hifa mostrando núcleos teñidos con HCl-Giemsa. X 420.

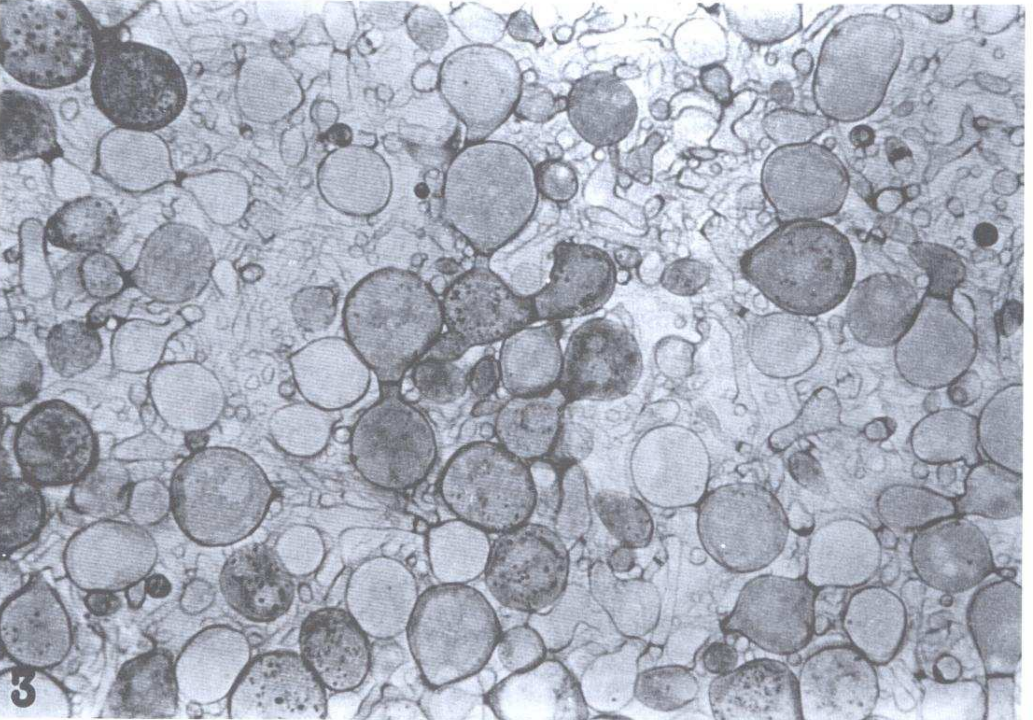


Fig. 3. Sección (2 μ) de esclerocio incluido en la resina de Spurr, en la cual se aprecian claramente células globosas e hifas indiferenciadas. X 703,5.

anteriormente. Esclerocios maduros fueron incluidos en la resina de Spurr (1969), para conocer la organización de los tejidos. Los especímenes fueron fijados con formaldehído y glutaraldehído diluidos ambos al 3 % en tampón cacodilato de sodio 0,1 M y pH 6,3; postfijados en tetraóxido de Osmio 1 %, deshidratados en soluciones seriadas de alcohol etílico (30, 50, 70, 80 y 100%), incluidos en la resina e incubados en estufa a 60°C hasta la polimerización. En un ultramicrotomo con cuchilla de diamante se hicieron cortes de 2 µm, que luego fueron tratados con solución acuosa 2 % de parafenilendiamina y Azur II al 0,5 % en Bórax 1 %. Las muestras se examinaron en un microscopio fotónico Zeiss modelo Axioplan MC80.

Caracterización nuclear

Para cuantificar los núcleos en las células somáticas, se utilizaron cultivos producidos durante 24 - 48 h, a 26-28°C en completa oscuridad, sobre portaobjetos cubiertos con una capa fina de PDA que se colocaron en cápsulas de Petri con varilla de vidrio en forma de "V" y papel filtro humedecido con agua destilada estéril. La tinción se hizo siguiendo el procedimiento HCl-Giemsa de Rogers (1965). Los núcleos se contabilizaron en células distintas a la terminal y penúltima.

Anastomosis

Las pruebas de anastomosis se realizaron en placas de agua agar 2 % acidificado con ácido láctico, que se incubaron a 26-28 °C bajo oscuridad. Como inóculo se usaron discos de agar-micelio (0,5 cm de diám) del hongo investigado y de la cepa ATCC 52545 de *R. oryzae-sativae*, cortados de la periferia de cultivos producidos durante 3-4 d en PDA. Los discos inóculo se dispusieron distanciados por 2 cm. De la zona donde los cultivos hicieron contacto, se cortaron rectángulos que seguidamente fueron teñidos con lactofucsina

ácida al 0,025% y examinados en el microscopio fotónico para comprobar la fusión de las paredes celulares.

Inoculación

Las pruebas se realizaron en plantas de arroz 'Cimarrón' cultivadas durante 60 d en envases de plástico (3 kg de capacidad). Como inóculo se utilizaron esclerocios cosechados de cultivos producidos en PDA. Los esclerocios se colocaron (uno/ planta) entre la vaina y el tallo e inmediatamente los recipientes fueron transferidos a tinas de 80 cm de diámetro y 60 cm de profundidad, que contenían una lámina de agua cuya superficie se ubicaba hasta 1 cm por encima del cuello de las plantas. La temperatura de incubación osciló entre 26 y 28°C. Periódicamente las plantas fueron examinadas para observar el desarrollo de la enfermedad. De los materiales infectados experimentalmente se hicieron reaislamientos para comprobar los postulados de Koch.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación

Los numerosos aislamientos obtenidos de los tejidos con síntomas de mancha agregada (Fig.1), desarrollaron en PDA colonias fúngicas de características similares. Las colonias se observaron rasas, sin micelio aéreo aparente e inicialmente fueron blancas y luego marrón-claras. Las hifas tuvieron un grosor promedio de 6,04 (5-7) µm y la tasa promedio de crecimiento radial fue 7,9 mm/día. La tinción con HCl-Giemsa demostró que las células hifales fueron principalmente binucleadas (68 %) (Fig. 2), aunque ocasionalmente también se visualizaron células con 1, 3 y 4 núcleos. Los cultivos incubados a 26 - 28 °C en completa oscuridad, comenzaron a formar los esclerocios 4 d después de la siembra. Los esclerocios aparecieron inicialmente blancos y luego se volvieron marrón-grisáceos, irregularmente glo-

bosos, superficiales, individuales y agregados en masas irregulares. Cien esclerocios cosechados de cultivos producidos durante 30 d en PDA, tuvieron un tamaño promedio de 1,9 (1,6-2,2) x 1,2 (0,9-1,5) µm (media más desviación estándar). En las secciones de 2 µm examinadas con microscopía de luz, los esclerocios incluidos en la resina de Spurr (1969) se observaron constituidos por células globosas e hifas indiferenciadas (Fig. 3). Las células globosas tuvieron tamaño promedio de 20,7 (13-28) x 16,7 (12-23) µm y consistentemente se observaron formando cadenas cortas fuertemente estranguladas a nivel del septo. El hongo realizó frecuentemente anastomosis con el cultivo ATCC 52545 de *R. oryzae-sativae* aislado de arroz en California.

Inoculación y reaislamiento: Las pruebas de patogenicidad realizadas en plantas sanas de arroz 'Cimarrón', produjeron síntomas similares a los observados en el campo. Las lesiones se observaron inicialmente verde-claras y más tarde presentaron centro café-claro y margen marrón a marrón-rojizo. Posteriormente alrededor de las lesiones iniciales, se agregaron otras bandas de tejidos necrosados con bordes claramente definidos, proporcionándole el aspecto de bandas agregadas del cual se deriva el nombre común de la enfermedad.

DISCUSIÓN

La morfología y el diámetro hifal, la anatomía y tamaño de los esclerocios, la característica nuclear de las células somática y la anastomosis, confirmaron que el hongo investigado es *R. oryzae-sativae* (Mordue, 1974; Ou, 1972; Sneh *et al.*, 1991; Webster y Gunnell, 1992). El hongo fué primeramente llamado Sclerotium *oryzae-sativae* por Sawada, quien en 1922 lo identificó como la causa de la mancha esclerocial del arroz en Taiwan (Ou, 1972). Sin embargo, posteriormente, Mordue (6), en consideración a la morfología

hifal y la anatomía esclerocial, trasladó el género a *Rhizoctonia* DC. Su estado teleomórfico es *Ceratobasidium oryzae-sativae* Gunnell y Webster y fue descubierto por primera vez en plantas de arroz atacadas por la mancha agregada en California (Gunnell y Webster, 1985). *C. oryzae-sativae* se distingue de las otras especies de *Ceratobasidium* porque produce basidios esféricos con sólo dos esterigmas (Gunnell y Webster, 1985).

El hongo realizó anastomosis consistentemente con la cepa ATCC 52545 correspondiente a un cultivo de *R. oryzae-sativae* aislado de arroz en California. Sus células hifales fueron principalmente binucleadas, aunque esporádicamente se consiguieron células con 1, 3 y 4 núcleos. Estos resultados coinciden en parte con los publicados por Gunnell y Webster (1984), quienes en su reporte no señalaron la observación de células uninucleadas. La característica nuclear de las células vegetativas, conjuntamente con la naturaleza del septo y la morfología de la estructura sexual, son los criterios de mayor confiabilidad y utilidad taxonómica en la identificación de especies de *Rhizoctonia* y *Rhizoctonia*-semejantes (Parmeter *et al.*, 1967).

Los esclerocios del hongo investigado se apreciaron individuales y agregados, irregularmente globosos, de color marrón a marrón-grisáceo y constituidos por células globosas e hifas indiferenciadas. Estas características coinciden con las descritas por Mordue (1974) y Ou (1972).

Las pruebas de inoculación y reaislamiento demostraron que *R. oryzae-sativae* es el agente causal de la mancha agregada del arroz en Venezuela. La enfermedad ha sido reportada, además, en China, EE.UU, Malasia, Sri Lanka, Japón y Vietnam (Gunnell y Webster, 1984; Mordue, 1974; Ou, 1972). En California su incidencia y severidad se incrementaron luego de que los productores de arroz co-

menzaron a sembrar cultivares semi-enanos en sustitución de los de porte erecto (Gunnell y Webster, 1984). Los síntomas de la mancha agregada son semejantes a los del añublo y la mancha de la vaina, cuyos agentes causales *R. solani* AG-1-1A y *R. oryzae* (Ou, 1972; Webster y Gunnell, 1992), respectivamente, se caracterizan por poseer células hifales multinucleadas (Sneh *et al.*, 1991). De manera similar como ocurre en las enfermedades causadas por *R. solani* y *R. oryzae*, las infecciones de mancha agregada se inician en los tejidos de la vaina localizados a nivel de la superficie de la lámina de agua y usualmente son provocadas por esclerocios que flotan en la misma (Gunnell y Webster, 1984). De acuerdo a Gunnell y Webster (1984), la mayor susceptibilidad de los cultivares semi-enanos de arroz,

en comparación con los de porte erecto, está más relacionada con el microclima que estos generan que con la composición genética, por cuanto los cultivares semi-enanos producen más brotes, pueden sembrarse a mayores densidades y responden mejor a dosis elevadas de nitrógeno.

REFERENCIAS

Cedeño, L., Cardona, R., Nass, H., Carrero, C., Rodríguez, H. y Alemán, L. (1995a): *Rhizoctonia oryzae*, patógeno del arroz (*Oryza sativa* L.) en Venezuela. *Rev. For. Venez. 1*: 70. (Resumen).
 Cedeño, L., Cardona, R., Nass, H., Carrero, C., Rodríguez, H. y Alemán, L. (1995b): *Sclerotium hydrophilum*, patógeno del arroz (*Oryza sativa* L.) en Venezuela. *Rev. For. Venez. 1*: 70-71. (Resumen).
 Cedeño, L., Nass, H., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H. y

Alemán, L. (1995c): *Rhizoctonia oryzae-sativae*, causante de la mancha agregada del arroz (*Oryza sativa*) en Venezuela. *Rev. For. Venez. 1*: 98-99. (Resumen).
 Cedeño, L.; Nass, H.; Carrero, C.; Cardona, R.; Rodríguez, H.; Alemán, L. y Quintero, K. (1996): *Rhizoctonia solani* AG-1-1A, causa principal del añublo del arroz en Venezuela. *Fitopatol. Venez. 9*: 6-9.
 Garrido, M. J. y Malaguti, G. (1995): Ocurrencia de *Sclerotium oryzae* en Calabozo, Venezuela. *Fitopatol. Venez. 8*: 19.
 Gunnell, P. S. y Webster, R. K. (1984): Aggregate sheath spot of rice in California. *Plant Dis. 68*: 529-531.
 Gunnell, P. S. y Webster, R. K. (1985): The perfect state of *Rhizoctonia oryzae-sativae*, causal organism of aggregate sheath spot of rice. *Phytopathology 75*: 1383 (Abstract).
 Malaguti, G. (1951): Mancha de la hoja envainadora del arroz causada por *Rhizoctonia solani*. *Agron. Trop. 1*: 71-75.

Mordue, J. E. M. (1974): CMI-Descriptions of pathogenic fungi and bacteria N° 409. *Commonw. Mycol. Inst.*, Kew, Surrey, England.
 Ou, S. H. (1972): Rice Diseases. *Commonw. Mycol. Inst.*, Kew, Surrey, England, 368 pp.
 Pameter, J. R., Jr., Whitney, H. S. y Platt, W. D. (1967): Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology 57*: 218-223.
 Rogers, J. D. (1965): The conidial state of *Coniochaeta lignaria*. Morphology and cytology. *Mycologia 57*: 368-378.
 Sneh, B., Burpee, L. y Ogoshi, A. (1991): Identification of *Rhizoctonia* species. *Am. Phytopathol. Soc. Press*, St. Paul, Minnesota. 133 pp.
 Spurr, A. R. (1969): A low viscosity resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrast. Res. 26*: 31-43
 Webster, R. K. y Gunnell, P. S. (1992): Compendium of rice diseases. *Am. Phytopathol. Soc. Press*, St. Paul, Minnesota. 62 pp.

TO ALL OUR READERS

Due to increasing production costs, we have been forced to raise our subscription rates for 1999, as follows:

Institutions	U.S. & CANADA	US\$ 70
Institutions	EUROPE	US\$ 75
Institutions	JAPAN & AUSTRALIA	US\$ 80
Institutions	LATIN AMERICA & CARIBBEAN	US\$ 50
Individual	LATIN AMERICA & CARIBBEAN	US\$ 30
Individual	ALL OTHER COUNTRIES	US\$ 35

Checks should be made out to the order of *INTERCIENCIA*, in US\$ currency against any bank within territorial United States.

Please mail to: Apartado 51842, Caracas 1050-A, Venezuela