

Evaluación de métodos de inoculación de *Rhizoctonia solani* sobre germoplasma de arroz en campo

N. J. Delgado^{1,2}, H. A. Rodríguez¹ y M. C. Ramón¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro de Investigaciones Agropecuarias del estado Portuguesa. Apartado Postal 102. Acarigua. Estado Portuguesa.

Resumen

El éxito de la selección de individuos resistentes a las enfermedades, se basa en la utilización de métodos de inoculación que induzcan un nivel de incidencia de la enfermedad cercana al 100%. Con el objeto de determinar un método eficiente de inoculación de arroz con *R. solani*, se llevó a cabo un ensayo durante los años 2001 y 2002 en Araure, estado Portuguesa. El ensayo se realizó en bloques al azar con cuatro repeticiones, utilizando dos fuentes de inóculo, esclerocios (*Es*) y granos de arroz infectados con *R. solani* (*GAI*). Los métodos de inoculación con *GAI* difirieron en la dosis, forma y época de aplicación del inóculo. Los resultados indican que la inoculación con *Es* fue más confiable, con una incidencia superior al 98%, en ambos años. Los resultados obtenidos con *GAI* fueron variables, al ser afectados por las precipitaciones ocurridas en el período post-inoculación, en el año 2002. Durante el año 2001, sin embargo, se alcanzó una incidencia cercana al 100%, en las parcelas donde se aplicaron 25 g de arroz infectado, al voleo, 70 días después de la siembra. Este método es más práctico y puede ser recomendado, en el caso donde la cantidad de individuos a ser evaluados es elevada, si la inoculación coincide con el período de salidas de lluvia.

Palabras clave: Inoculación, *Rhizoctonia solani*, arroz, añublo de la vaina

Introducción

El añublo de la vaina es causado por un hongo denominado *Rhizoctonia solani* AG1-1A y constituye una de las enfermedades más difundidas y limitantes del rendimiento del arroz a nivel mundial (7, 12, 17). En Venezuela, la producción de arroz

basada en la utilización de tecnologías agrícolas, caracterizadas por la alta densidad de siembra y el elevado uso de fertilizante nitrogenado, ha conllevado al aumento en la intensidad y distribución de la enfermedad, la cual origina pérdidas en la calidad y el

Recibido el 12-6-2003 ● Aceptado el 9-2-2004

²Autor de correspondencia email: ndelgado@inia.gov.ve

rendimiento del cultivo (6, 15). Uno de los métodos más económicos para controlar las enfermedades de las plantas, lo constituye el uso de materiales resistentes. Todos los cultivares de arroz son susceptibles a *R. solani*, pero el grado de susceptibilidad es variable (9, 13, 20) y a pesar de no encontrarse resistencia completa al hongo en esta especie, esta resistencia parcial puede aprovecharse combinada al manejo adecuado de las prácticas culturales, para disminuir los efectos patológicos sobre el rendimiento, reduciéndose la densidad y viabilidad de los esclerocios en el suelo y por ende, su diseminación e incidencia (2, 8, 11, 16). Los mejoradores de plantas comúnmente evalúan cantidades elevadas de germoplasma y requieren de metodologías adecuadas para la evaluación de las características a seleccionar. En el estudio de la reacción a las enfermedades, no solo la evaluación sino también la inoculación

debe realizarse de manera sencilla, debiéndose garantizar el contacto del patógeno y la planta en un ambiente adecuado al desarrollo de la enfermedad (1), disminuyéndose así los riesgos de escape, para que el fitomejorador pueda estar seguro de que las plantas que está seleccionando son realmente resistentes. Las técnicas de inoculación que se han empleado con este hongo, incluyen la colocación de esclerocios, micelio, tallos, palillos o arroz colonizado con el hongo, sobre hojas y vainas *in vitro* o en el campo, cuando el cultivo se encuentra en el estado de máximo macollamiento o prefloración (3, 9, 14, 15, 18, 19, 20). Sin embargo, muchos de estos métodos no son fáciles de emplear y sus resultados han sido inconsistentes (20). Con el objetivo de seleccionar el método más adecuado de inoculación de *R. solani*, para los requerimientos de los fimejoradores, se evaluaron siete métodos de inoculación con este hongo en arroz.

Materiales y métodos

El experimento se realizó en el campo experimental "Araure" del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, en Araure, estado Portuguesa, durante los períodos de lluvia de los años 2001 y 2002, en suelos conducivos a la enfermedad. El primero se sembró el 15 de agosto de 2001 y se inoculó el 23 de octubre, mientras que el segundo se sembró el 3 de junio y se inoculó el 9 de agosto. El diseño experimental que se utilizó fue el de bloques al azar con cuatro repeticiones, donde cada parcela

experimental estuvo constituida por cuatro hileras de 1,20 m de longitud separadas a 0,20 m. Las plantas estuvieron distanciadas a 0,20 m dentro de la hilera, lo cual resultó en 11 plantas por hilera y 44 por parcela o unidad experimental. Se utilizó la variedad de arroz Fundarroz PN-1, susceptible a *R. solani*. Después del acondicionamiento del suelo mediante el batido o fanguero, el ensayo de campo se instaló trasplantando plántulas de 20 días de edad, provenientes de un semillero. Los métodos, tratamientos

o combinación de factores evaluados (cuadro 1), se compararon entre sí utilizando la prueba de medias de Fisher o lsd (21), con la idea de conocer cual combinación de factores era el más adecuado para inocular germoplasma de arroz de manera eficiente. De esta manera, no se realizaron las comparaciones entre los factores, es decir entre la aplicación de inóculo al voleo o por hilera o voleo, al momento del transplante o a los 70 ddi, utilizando esclerocios o arroz colonizado por el patógeno. El inóculo, utilizado en los seis primeros tratamientos, consistió en arroz descascarado colonizado por el micelio del hongo, preparado siguiendo la metodología descrita por Graterol *et al.* (9). Las dos proporciones de arroz colonizado empleadas, se obtuvieron pesando 25 g del inóculo en una balanza analítica o vertiendo arroz colonizado en un cilindro graduado de 500 cc de capacidad, hasta la marca de 100 cc. Este inóculo se aplicó sobre

el suelo drenado, según la proporción, época y forma definida en el tratamiento correspondiente a cada parcela. La aplicación en hileras, se hizo esparciendo el inóculo en bandas al lado de la hilera de plantas, sin llegar a tocarlas, mientras que la aplicación al voleo se realizó sobre el suelo cubriendo el área ubicada entre las hileras de plantas, sin tocar el follaje de las mismas. Los esclerocios utilizados en el tratamiento 7, se produjeron colocando un esclerocio en el centro de cajas de petri que contenían medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) al 2%. Después de 15 días de incubación, los esclerocios formados se desprendieron con la ayuda de una aguja de disección estéril y se colocaron en papel absorbente para seleccionar los de tamaño mediano y homogéneos, descartándose los mas grandes. Para asegurar la infección y reducir la probabilidad de escape de la enfermedad, se inocularon dos

Cuadro 1. Métodos de inoculación con granos de arroz (pesados y medidos volumétricamente) colonizados por *Rhizoctonia solani*, esclerocios y testigo sin inocular, evaluados en el campo.

Métodos	Dosis del inóculo	Forma de aplicación	Época de aplicación (dds)
1	25 g	Hilera	20
2	100 cc	Hilera	20
3	25 g	Hilera	70
4	100 cc	Hilera	70
5	25 g	Voleo	70
6	100 cc	Voleo	70
7	Inoculación con esclerocios, en la 2 y 3 vaina del tallo principal, 70 dds.		
8	Testigo sin inocular		

dds: días después de la siembra

esclerocios insertándolos en la cara interna de la vaina a la altura del cuello, uno en la segunda y otro en la tercera, en sentido ascendente. Todas las plantas de las dos hileras centrales de la parcela fueron inoculadas cuando las plantas se encontraban en el estado de bota, embuchamiento o prefloración (70 dds). Las evaluaciones se realizaron en las plantas de las dos hileras centrales de cada parcela a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación (ddi). A las muestras de suelo tomadas posterior a la preparación del mismo, se les determinó la cantidad de inóculo presente mediante la técnica descrita por Carling y Summer, 1992. Para ello se tomaron 10 muestras de suelo de 1 kg cada una, a una profundidad de 5-

10 cm y se secaron al aire por 14 días. Luego, se pulverizaron, se colocaron en un recipiente, se les añadió agua destilada hasta cubrirlas y se agitaron. La mezcla permaneció en reposo durante la noche al siguiente día, el sobrenadante se vertió en dos cribas de diferentes diámetros, una para separar el material grueso y la otra (1,7 mm), para retener el material más pequeño presente en la mezcla de suelo obtenida en el primer paso. Este material se colocó en papel absorbente para cuantificar, ante el microscopio esteoroscópico, la cantidad de esclerocios. El número de esclerocios se contabilizó para cada una de las muestras de suelo.

Resultados y discusión

La prueba de homogeneidad de varianzas indica que las varianzas del ensayo en los años 2001 y 2002 fueron heterogéneas, por ello los datos no se pudieron analizar en conjunto y los resultados se presentan para cada año.

El número promedio de esclerocios encontrados en el suelo donde se desarrolló el estudio, una vez preparado el suelo y previo a la instalación del ensayo, para ambos años, fue de 2 esclerocios por kilogramo de suelo (escl./kg), resultado que coincide con el reportado por otros autores, en experiencias realizadas en suelos cultivados con arroz (4, 7).

Experimento Año 2001

La prueba de medias para la incidencia de la enfermedad, de las parcelas inoculadas con los diferentes métodos evaluados y el testigo sin

inocular, durante las cuatro evaluaciones semanales realizadas, se presenta en el cuadro 2. En la primera evaluación (7 ddi) las parcelas inoculadas, independientemente del tratamiento, tuvieron al menos la mitad de las plantas con los síntomas típicos de la enfermedad, mientras que las parcelas testigos, alcanzaron el 32,9%. La incidencia de la enfermedad con el método 6, fue la más alta y estadísticamente similar a la inoculación con esclerocios, pero diferente del resto de los métodos y del testigo. En la evaluación de los 14 ddi, la incidencia de plantas enfermas en el testigo también fue inferior al 50,0%, mientras que con el método 6 ya se había alcanzado un 92,1% de plantas enfermas, resultado estadísticamente similar ($p=0,05$) al obtenido en la

Cuadro 2. Incidencia (%) del añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani*) en arroz con diferentes métodos de inoculación después de 7, 14, 21 y 28 días de aplicado el inóculo, en el año 2001.

Tratamiento	Días después de la inoculación			
	7	14	21	28
1	61,9 cd	76,2 abc	79,4 bc	85,7 b
2	51,9 d	68,2 cd	82,7 abc	92,8 ab
3	60,6 cd	66,3 cd	79,2 bc	89,9 ab
4	60,9 cd	70,8 bc	82,5 abc	93,5 ab
5	60,3 cd	72,2 abc	77,8 c	90,9 ab
6	87,3 a	92,1 a	95,2 a	100,0 a
7	76,4 ab	89,0 ab	94,3 ab	98,0 a
8	32,9 e	48,7 d	59,0 d	70,5 c
Mds	19,0	19,9	15,4	10,4

inoculación con esclerocios. Veintiún días después de la inoculación, con todos los métodos evaluados, la incidencia de la enfermedad había superado el 75,0%, alcanzándose un 95.2% con el método 6, con el cual se obtuvo una incidencia estadísticamente igual a la inoculación con esclerocios. Veintiocho días después de la inoculación, todas las plantas en las parcelas inoculadas con el método 6 mostraron los síntomas típicos de la enfermedad, mientras que en las parcelas no inoculadas se alcanzó una incidencia promedio de 70,5 %. La cantidad de esclerocios encontrada en el suelo no logró que la incidencia de la enfermedad, en las parcelas no inoculadas, fuera superior. El valor promedio de incidencia obtenido (70,5%) nos indica que un elevado número de plantas, aproximadamente 30,0%, escaparon a la enfermedad. Este hecho incide negativamente en la adecuada selección de los individuos por su reacción a esta enfermedad, en

poblaciones segregantes, donde cada individuo es genéticamente diferente el uno del otro.

Experimento Año 2002

Durante este año, la inoculación con esclerocios (tratamiento 7) produjo la mayor incidencia de la enfermedad y el menor escape, cuadro 3. El porcentaje de plantas enfermas por parcela, utilizando este método, fue el más alto desde la primera evaluación alcanzando un valor de 98,8% a los 21 ddi. Las parcelas no inoculadas, tuvieron la incidencia más baja de la enfermedad, con un máximo de 24,6% a los 28 ddi, lo cual indica que la cantidad de inóculo naturalmente presente en el suelo no fue suficiente para la evaluación de germoplasma con fines de selección, corriéndose el riesgo de que una buena parte de los individuos evaluados (75,0%) escapen a la enfermedad y su reacción no pueda ser evaluada exitosamente. Ambos resultados coinciden con los del experimento del año 2001. Durante las

Cuadro 3. Incidencia (%) del añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani*) en arroz con diferentes métodos de inoculación después de 7, 14, 21 y 28 días de aplicado el inóculo, en el año 2002.

Tratamiento	Días después de la inoculación			
	7	14	21	28
1	41,4 bc	55,3 bc	57,6 bc	68,1 bc
2	51,4 b	66,1 b	66,1 b	64,3 bc
3	29,4 bcd	38,5 cd	38,5 cde	55,9 c
4	25,5 cd	26,7 d	31,2 de	50,8 c
5	46,8 bc	59,5 bc	62,0 bc	78,2 ab
6	24,2 cd	43,0 bcd	46,5 bcd	58,3 bc
7	87,5 a	96,5 a	98,8 a	98,8 a
8	11,8 d	17,6 d	17,6 e	24,6 d
Mds	24,1	26,1	25,0	22,0

evaluaciones del año 2002, el mejor tratamiento, utilizando arroz colonizado, consistió en la aplicación de 25 g de arroz colonizado, al voleo, 70 días después de la siembra (tratamiento número 5); la incidencia de la enfermedad en las parcelas inoculadas con este método fue de 78,2% en la evaluación final. Este resultado difiere del encontrado durante el ensayo del año 2001, donde la incidencia de la enfermedad causada por el método 6 (100 cc de arroz colonizado, aplicado al voleo, 70 días después de la siembra) fue similar a la causada por la inoculación con esclerocios y mejor que la obtenida con el método 5. Las diferencias encontradas son atribuibles a las condiciones meteorológicas de ambos años. Las temperaturas y humedades relativas máxima y mínima diarias, que ocurrieron en el campo experimental Araure, desde el día de la inoculación hasta 30 ddi (figuras 1 y 2) fueron similares durante los dos

años, a pesar de que el mes en el cual transcurrió el período post-inoculación en los ensayos fue diferente, (octubre-noviembre 2001 y agosto-septiembre 2002). Sin embargo, se observaron diferencias importantes en la cantidad de precipitación ocurrida el día de la inoculación y el período inmediatamente posterior a él. Durante el año 2001, no hubo precipitación el día de la inoculación ni en los dos días posteriores, mientras que en el año 2002, el día de la inoculación ocurrió una precipitación intensa de 11,2 mm, seguida de precipitaciones de menor intensidad los dos días posteriores (figura 3). Es probable que durante el período de inoculación, sucediera el lavado del inóculo, afectando el éxito de las inoculaciones realizadas. La inoculación con esclerocios, en cambio, no se vio afectada por la lluvia, ya que éstos quedaron protegidos en la cara interior de las vainas foliares inoculadas. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los

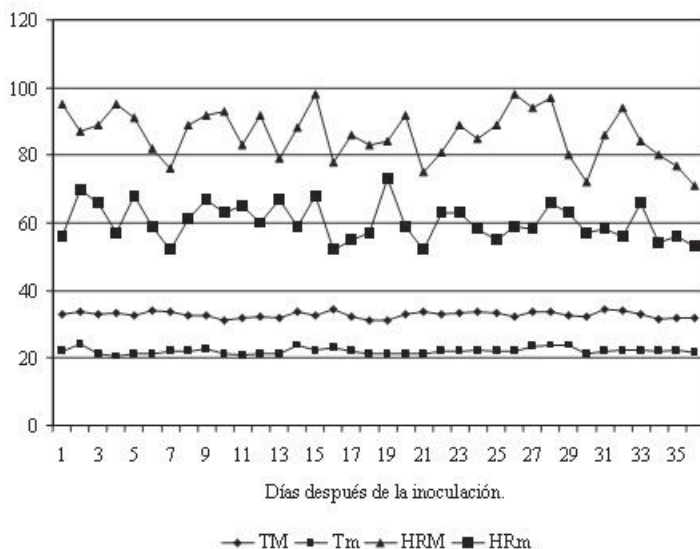


Figura 1. Temperaturas máxima (TM) y mínima (Tm), humedades relativas máxima (HRM) y mínima (HRm) en el campo experimental del INIA-Araure-Portuguesa hasta los 35 días posterior a la inoculación de *Rhizoctonia solani* en arroz del año 2001.

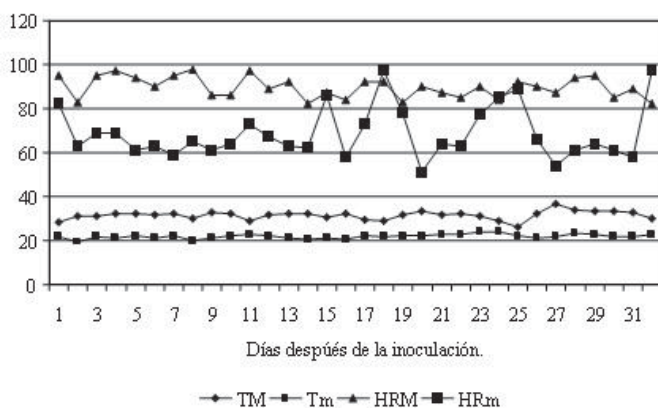


Figura 2. Temperatura máxima (TM) y mínima (Tm), humedad relativa máxima (HRM) y mínima (HRm) en el campo experimental de INIA en Araure, Portuguesa, en el período comprendido entre el 09 de agosto y el 09 de septiembre del año 2002.

reportados por otros autores en inoculaciones realizadas en el invernadero; por ejemplo, Sharma y Teng (19), encontraron que la inoculación de plantas de arroz con esclerocios o con arroz colonizado, fue igualmente eficaz en el desarrollo del

añublo de la vaina, así mismo Prabhu *et al.* (14) concluyeron que la inoculación con granos colonizados resultó más adecuada para la evaluación de la resistencia de cultivares de arroz en el invernadero.

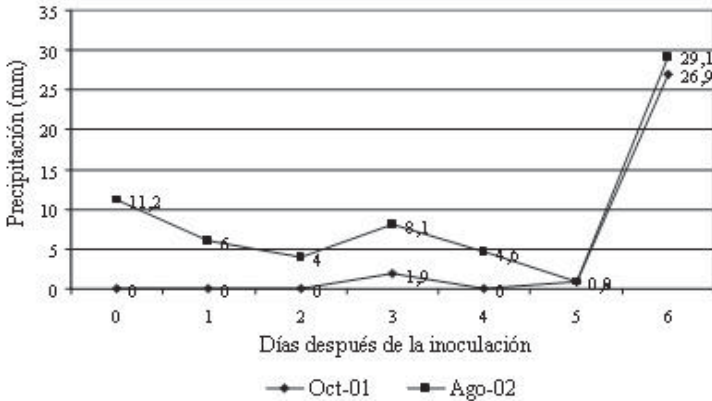


Figura 3. Precipitación (mm) ocurrida, en el campo experimental del INIA-Araure-Portuguesa desde cero hasta seis días después de la inoculación de *Rhizoctonia solani* en arroz del año 2002 (Ago-02).

Conclusiones

La incidencia de la enfermedad en el testigo no inoculado, en ambos años, fue menor que la observada con cualquiera de los métodos de inoculación evaluados, por lo tanto, para realizar la evaluación eficiente de germoplasma de arroz en suelos con una cantidad de inóculo natural similar al utilizado en este estudio, es necesario inocular. La inoculación con granos de arroz colonizados por *R. solani*, a una proporción de 25 g por parcela aplicados al voleo 70 ddi, fue

efectiva durante el año 2001, causando enfermedad en el 100% de las plantas inoculadas al igual que el método de inoculación con esclerocios (98%); sin embargo, durante el año 2002, el primer método fue afectado por la lluvia dando un resultado diferente e inferior al obtenido con los esclerocios. La inoculación con esclerocios se podría recomendar para evaluar líneas avanzadas de arroz, caracterizadas por la homogeneidad del germoplasma, cuando la cantidad de líneas a evaluar

sea manejable e inoculándose una pequeña muestra de individuos de cada una. En la evaluación de poblaciones y familias segregantes, el mejorador necesita conocer la reacción de cada individuo que conforma la población o familia para seleccionar los más resistentes, en estos casos, la inoculación con esclerocios se tornaría impráctica, siendo recomendable la inoculación con arroz colonizado (método 6) teniéndose la precaución de que la inoculación y el período post-inoculación ocurran a salidas de las

lluvias, tal como se hizo en el año 2001; esto reduciría la posibilidad de lavado del inóculo, disminuyéndose la probabilidad de escape a la enfermedad. La inoculación con esclerocios dio resultados repetibles y aunque es menos práctica, resulta más segura y confiable. En estudios posteriores se determinará el tamaño de la muestra apropiado, que permita hacer de la inoculación con esclerocios, un método más fácil de utilizar en el mejoramiento genético del arroz.

Agradecimiento

A los Peritos Agropecuarios Mario Giménez y Nelson Almeida por su valiosa colaboración en la conducción de los ensayos, al Sr. Ismael Peña por la preparación del inóculo y al Sr. Juan M. Carmona por su ayuda en las labores de campo. Al Instituto

Nacional de Investigaciones Agrícolas, el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación y a la Fundación para la Investigación Agrícola Danac por el financiamiento otorgado para la ejecución del proyecto S12000000771.

Literatura citada

1. Agrios, J. N. 1988. Plant Pathology. Third edition. Academic Press Inc. 803 p.
2. Amante, A. D., R. de la Pena, L. A. Sitch, H. Leung y T. W. Mew. 1990. Sheath blight (ShB) resistance in wild rices. International Rice Research Newsletter 15: 3.
3. Amin, K. S. 1975. An improved method for evaluating rice sheath blight. Phytopathology 65: 214-215.
4. Belmar, S. B., R. K. Jones y J. L. Starr. 1987. Influence of crop rotation on inoculum density of *Rhizoctonia solani* and sheath blight incidence in rice. Phytopathology 77:1138-1143.
5. Carling, D. E. y D. R. Summer. 1992. *Rhizoctonia*. En: L. L. Singleton, J. D. Milhail and C. M. Rush (Eds.). Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
6. Cedeño, L., H. Nass, C. Carrero, R. Cardona, H. Rodríguez y L. Alemán. 1998. *Rhizoctonia oryzae-sativae* agente causal de la mancha agregada del arroz en Venezuela. Interciencia 24(4): 248-251.
7. Cu, R. M., T. W. Mew, K. G. Cassman y R. S. Teng. 1996. Effect of sheath blight on yield in tropical, intensive rice production system. Plant Dis. 80:1103-1108.
8. Damicone, J. P., M. V. Patel y W. F. 1993. Density of sclerotia of *Rhizoctonia solani* and incidence of sheath blight on rice fields in Mississippi. Plant Dis. 77:257-260.

9. Graterol, E., O. Borges, H. Nass y A. Salih. 1996. Herencia transgresiva para la resistencia a *Rhizoctonia* spp en poblaciones segregantes de arroz (*Oryza sativa* L.). Investigación Agrícola. www.redpav-polar.info.ve/danac/volumen1/art3/index.html
10. Groth D. E. y E. M. Nowick. 1992. Selection for resistance to rice sheath blight through the number of infection cushions and lesion type. *Plant Dis.* 76: 721-723.
11. Marchetti, M. A. 1991. Quantification of the relationship between sheath blight severity and yield loss in rice. *Plant Dis.* 75:773-775.
12. Marshall, D. S. y M. C. Rush. 1980. Relation between infection by *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* and disease severity in rice. *Phytopathology* 70: 941-946.
13. Meena, B., V. Ramamoorthy, J. G. Banu, R. Thangavelu y M. Muthusamy. 2000. Screening of rice genotypes against sheath blight disease. *J. Écolo.* 12 : 103-109.
14. Prabhu, A. S., M. C. Filipi, G. B. Da Silva y G. R. de Santos. 2002. Resistência de cultivares de arroz a *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia oryzae*. *Pesq. Agropec. Bras.* 37(5): 589-595.
15. Rodríguez, H. A, H. Nass, R. Cardona y L. Alemán. 1999. Alternativas para controlar el añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani* en arroz. *Fitopatol. Venezolana* 12 (1): 18- 21.
16. Rush, M. C. 1983. Rice sheath blight: A major rice disease. *Plant Dis.* 67(7):829-832.
17. Rush, M. C. y F. N. Lee. 1992. Sheath blight. En: Webster, F. y P. Gunnell (Eds.). *Compendium of rice diseases.* APS press, Minnesota, EE.UU. p. 22-23.
18. Savary, S., N. P. Castillas, F. A. Elazegui, C. G. McLaren, M. A. Ynalvez y P. S. Teng. 1995. Direct and indirect effects of nitrogen supply and disease source structure on rice sheath blight spread. *Phytopathology* 85: 959-965.
19. Sharma, N. R. y P. S. Teng. 1990. Effect of rice growth stage on sheath blight (ShB) development and yield loss. *International Rice Research Newsletter* 15(6):20.
20. 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.
21. Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1980. *Principles and procedures of statistics. A biometrical approach.* Second Edition. McGraw-Hill, Inc. New York. 633 p.