

INVESTIGACIONES

Rhizoctonia oryzae-sativae (Sawada) Mordue, AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN O MANCHA AGREGADA DE LA VAINA DEL ARROZ (*Oryza sativa* L.) EN CHILE¹

Rhizoctonia oryzae-sativae (Sawada) Mordue, causal agent of aggregate sheath spot of rice (*Oryza sativa* L.) in Chile¹

Ricardo Madariaga B.², Ximena Morales C.³ y Roberto Alvarado A.²

ABSTRACT

A disease known as "rice sheath aggregate spot" has been recently detected in the Chilean rice producing area. We conducted hyphal and sclerotia studies upon a collection of fungi isolates obtained from rice plants showing disease symptoms at the water level. DNA stains with DAPI revealing the characteristic binucleated stage and positive pathogenicity tests results confirmed the presence of *Rhizoctonia oryzae-sativae*, the causal agent of rice aggregate sheath spot in Chile.

Key words: rice, *Rhizoctonia oryzae-sativae*, sheath blight.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.), se introdujo a fines del siglo pasado (Aguila, 1987), pero se estima que se inició como producción comercial en Chile a fines de la década del 30 (INIA, 1964). Después de un proceso de selección a la cual fue sometido, encontró una buena adaptación a pesar de las temperaturas relativamente frías imperantes en la zona de cultivo (Colchagua a Chillán), especialmente durante su establecimiento.

Se le consideró como un cultivo bastante sano por muchos años, en que su única enfermedad,

de relativa importancia, era la "Mancha Carmelita", causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, bacteria que provoca el manchado de glumas.

En 1985 se informó de la presencia del hongo *Sclerotium hydrophilum* Sacc. causando pudrición del tallo (France y Alvarado, 1985). La enfermedad "Pudrición del tallo y/o vaina" se presenta específicamente en suelos con bajo suministro de potasio, y puede llegar a ser devastadora al momento de la cosecha, momento en el cual causa tendadura severa del cereal (Ortega et al., 1991).

Al examinar plantas afectadas por pudrición del tallo es posible encontrar además de los esclerocios típicos de *S. hydrophilum* (Sh), un segundo tipo de esclerocio más grande, amorfo y de color café claro, que toma la forma de las células del arroz que los contienen. Existen varios hongos que causan enfermedades de las vainas o tallos del arroz y que producen esclerocios. Los

¹Recepción de originales: 25 de mayo de 1998.

Este trabajo recibió financiamiento del Proyecto IAEA N° 8636/RB.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigaciones Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile. E-mail: rmadaria@quilamapu.inia.cl

³Universidad Adventista de Chile, Facultad de Agronomía, Casilla 7-D, Chillán, Chile.

más importantes a nivel mundial son Pudrición del tallo (*Stem rot*) cuyo agente causal en su estado anamórfico (AN) o asexuado recibe varios nombres: *Sclerotium oryzae* = *Nakatea sigmoidea* = *Vakrabeeja sigmoidea* = *Helminthosporium sigmoideum*, y en su teleomorfo (TE) o estado sexuado, se conoce como *Magnaporthe salvinii* = *Lephtosphaeria salvinii*. Este hongo presenta en sus células vegetativas, el estado multinucleado. También se menciona el Manchado de la vaina (*Sheat spot*), el cual es causado por *Rhizoctonia oryzae* (AN) y *Waitea circinata* (TE) y su estado es multinucleado, mientras que el tizón de la vaina (*Sheath blight*) es causado por *Rhizoctonia solani* (AN) y *Thanatephorus cucumeris* = *Pellicularia filamentosa* (TE), y su estado vegetativo también es multinucleado (Inagaki, 1974; Gunell y Webster, 1987; Webster y Gunell, 1992).

En California, donde se cultiva arroz en un ambiente templado a frío y bajo inundación, condiciones similares a las de Chile, predomina la Pudrición del tallo (*Sclerotium oryzae*) y el hongo causante de la mancha agregada de la vaina *Rhizoctonia oryzae-sativae* (*Ros*)(AN)/*Ceratobasidium oryzae-sativae* (TE). Los dos organismos son agentes causales de la pudrición de la vaina/tallo y son claramente distinguibles por el tipo de lesión que causan, por sus esclerocios y por el número de núcleos de sus hifas (Webster y Gunell, 1992).

En Chile se cultivan anualmente alrededor de 30.000 ha con arroz en suelos que llevan las siguientes secuencias : un año sin cultivar y luego arroz; pastos naturales que se utilizan para pastoreo por tres años luego arroz; y por último dependiendo de las expectativas de precio, se estima que hasta un 10% de la superficie establecida se realiza en condiciones de monocultivo. La explotación arrocería intensiva estimula la sobrevivencia de propágulos, como son los esclerocios de hongos del género *Rhizoctonia* spp., los cuales en determinadas circunstancias, como presencia del hongo, baja disponibilidad de potasio en el suelo, fuertes vientos con panoja en madu-

rez de cosecha, desencadenan un grave problema comercial para los productores, con tendadura y pérdidas tanto de rendimiento como calidad industrial de los granos producidos en las sementeras afectadas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los esclerocios detectados en plantas de arroz enfermas de pudrición de la vaina, y realizar las pruebas de patogenicidad destinadas a comprobar la presencia de *Rhizoctonia oryzae-sativae* en Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y purificación de los aislamientos estudiados

En el Laboratorio de Fitopatología de Cereales, del Centro Regional de Investigación Quilmapu, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, se cuenta con una colección de hongos obtenidos de plantas enfermas de arroz, que se han colectado y conservado en almacenaje durante varios años. Para obtener los cultivos puros de estos hongos se utilizaron esclerocios extraídos de tejidos de arroz infectados. Estos cuerpos de resistencia, se trasladaron en condiciones estériles y sin desinfección superficial, a placas de petri de 9 mm con Agar-Agua (15 g de Agar/L) donde a las 48 h de incubación se obtuvo puntas de hifas, las que se sembraron en medio Papa Dextrosa Agar Oxoid CM 139; 39 g/L + 1 cc ácido láctico/L (PDAA pH 5,6), donde se desarrolló un crecimiento abundante de micelio y una nueva cosecha de esclerocios. Para la conservación de los aislamientos en el largo plazo, se transfirieron porciones de crecimiento micelial activo a tubos inclinados de PDA, donde se procedió en forma similar a la anteriormente descrita para las placas, trasladándolos posteriormente a refrigeración, 5 °C en oscuridad. Se procedió en forma rutinaria a renovarlos en medios frescos cada seis meses. En el Cuadro 1 se indican los orígenes de los aislamientos considerados en este estudio.

Cuadro 1. Antecedentes de los aislamientos de *Rhizoctonia oryzae-sativae* obtenidos de arroz afectado por la enfermedad Pudrición de la vaina

Table 1. Antecedents of *Rhizoctonia oryzae-sativae* isolates obtained from rice affected by the aggregated sheath spot disease

Nº	Código aislamiento	Fecha colecta muestra arroz	Lugar de colecta	Variedad	Observaciones
1	Ros 92.2*	27.02.91	Parral	Diamante	Siembra agricultor
2	Ros 96.1	11.03.96	San Carlos	Cinia 677	Ensayo regional de variedades
3	Ros 97.3	10.02.97	Chillán	Diamante	Vivero de arroz, ensayo monocultivo, tratamiento NPK***
4	Ros 97.4	10.02.97	Chillán	Diamante	Vivero de arroz, ensayo monocultivo, tratamiento NK
5	Ros 97.2	10.02.97	Chillán	Diamante	Vivero de arroz, ensayo monocultivo, tratamiento PK
6	Ros 98.1**	06.02.98	Chillán	Diamante	Vivero de arroz, ensayo monocultivo, tratamiento NK

*Aislamiento depositado en International Mycological Institute, Surrey, U.K., con el número IMI 378829.

**Ros: *Rhizoctonia oryzae-sativae*.

***N: Nitrógeno; P: Fósforo; K: Potasio.

Tinción y recuento de núcleos

Se utilizó la técnica DAPI, 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride, Sigma (Sneh *et al.*, 1991) que incluye una serie de pasos. Se inicia el proceso con la inducción de crecimiento del hongo en un portaobjetos recubiertos con Agar-Agua (20 g Agar/L) por tres a cuatro días. Con activo crecimiento micelial, se procede a la fijación de la muestra con solución de formaldehído 3% por 2 min, y luego se enjuaga con agua destilada estéril por 1 min. Se aplica la solución DAPI, 1 mg/mL por 10 min, y posteriormente se enjuaga con agua destilada por 5 min. Se termina con la aplicación de una gota de glicerina, y la observación en microscopía de fluorescencia. Se utilizó como referencia de hongo multinucleado, el aislamiento de *Rhizoctonia solani*, código Rem 98.1, obtenidos de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*).

Pruebas de patogenicidad

Se realizaron dos ensayos de patogenicidad con la variedad de arroz Diamante. Se desinfectaron semillas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 0,4% (Clorinda^{MR} Clorox Chile S.A., 8% de cloro activo como hipoclorito de sodio) por 3 min. Se enjuagaron las semillas tres veces por 1 min en agua destilada estéril, y se colocaron en una placa estéril para inducir la germinación. A las 24 h con el primordio del epicotilo formado se trasladaron a tubos de ensayo.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos (los diferentes aislamientos), y cinco repeticiones. La unidad experimental consistió en un tubo de ensayo de fondo curvo de 60 mL (15 cm alto x 2,5 cm diámetro) al que se les colocó 20 mL de agua destilada. Los tubos previos a la siembra se cubrieron con papel aluminio en su tercio superior, y se

colocaron en autoclave por 20 min a 120 °C y 103.500 Pa. Los tubos con las plántulas se mantuvieron en una gradilla incubándose con luz natural y temperatura de laboratorio de 24 °C.

Para la inoculación se colocaron 10 esclerocios por cada tubo, con plántulas de 5 cm de altura. Se dispusieron los esclerocios en un trozo de agar insertado a la planta al nivel del agua. Las plantas alcanzaron a desarrollar dos hojas y entre 20 y 25 cm de altura al término de los experimentos. Se evaluó largo de plántulas (cm), presencia y tamaño de lesiones (cm) y aparición de nuevos esclerocios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de los aislamientos estudiados

Los esclerocios colectados del campo en diferentes años fueron colocados en Agar-Agua, donde se demoraron cinco días en mostrar primordios blanquecinos de nuevos esclerocios. Solo 24 h después iniciaron un cambio de color a tonalidades café claro a café cobrizo, mas cercano a Ros que a la descripción de *Sclerotium fumigatum*, hongo con el cual puede ser confundido (Gunell y Webster, 1987).

En el medio PDAA el aislamiento Ros 98.1 se demoró siete días, con una tasa de avance de 6 mm diarios, en cubrir completamente la placa, y dos semanas en formar esclerocios grandes, café cobrizos típicos de Ros. Solamente algunos esclerocios produjeron nuevamente los cuerpos de resistencia, lo que indicaría existencia de variabilidad en el hongo para esta característica. Su micelio se mostró hialino a blanco, abundante, fuertemente ramificado, a veces con la estrangulación en la base de la hifa y presencia de los típicos ángulos en 90° del género *Rhizoctonia*. El tamaño promedio de esclerocios de Ros 98.1 extraídos directamente de una planta enferma colectada en el campo fue mayor (n=17, promedio 2,6 x 1,8 mm) que el obtenido en medio de cultivo (Cuadro 2).

Algunas características conspicuas que mostraron los esclerocios de Ros, fueron sus células grandes, de forma globosa pero no esférica; sus células tienden a compactarse a medida que el esclerocio se deshidrata manteniendo su forma, y presentando un apéndice que comunica las células entre ellas, formando una red dentro de los esclerocios, aspectos que diferencian a esta especie de otros hongos productores de esclerocios, que también son descritos como patógenos de arroz (Ou, 1985) (Figura 1).

Cuadro 2. Número de núcleos de las hifas, coloración, forma, superficie y tamaño de los esclerocios producidos por cinco aislamientos de *Rhizoctonia oryzae-sativae* desarrollados en medio de cultivo

Table 2. Hyphal nuclear number, colour, shape, surface and sclerotia size produced by five *Rhizoctonia oryzae-sativae* isolates developed on culture media

Nº	Código	Número núcleos hifas (DAPI en PDAA)	Coloración	Forma	Superficie	Rango de tamaño mm	Promedio tamaño ± D.E.:
1	Ros 92.2	2	Café verdoso	Amorfos	Rugosa	0,49 a 1,50	0,9 ± 0,3
2	Ros 96.1	2	Café claro	Redondos	Rugosa	0,69 a 1,30	0,9 ± 0,2
3	Ros 97.3	2	Café cobrizo	Amorfos	Rugosa	0,49 a 1,09	0,8 ± 0,2
4	Ros 97.4	2	Café cobrizo	Amorfos	Rugosa	0,60 a 1,20	0,8 ± 0,2
5	Ros 98.1	2	Café claro	Amorfos	Rugosa	0,60 a 1,30	0,8 ± 0,2
6	Ros 97.2	2	Café claro	Amorfos	Rugosa	0,40 a 0,80	0,6 ± 0,1

D.E.: Desviación estándar.

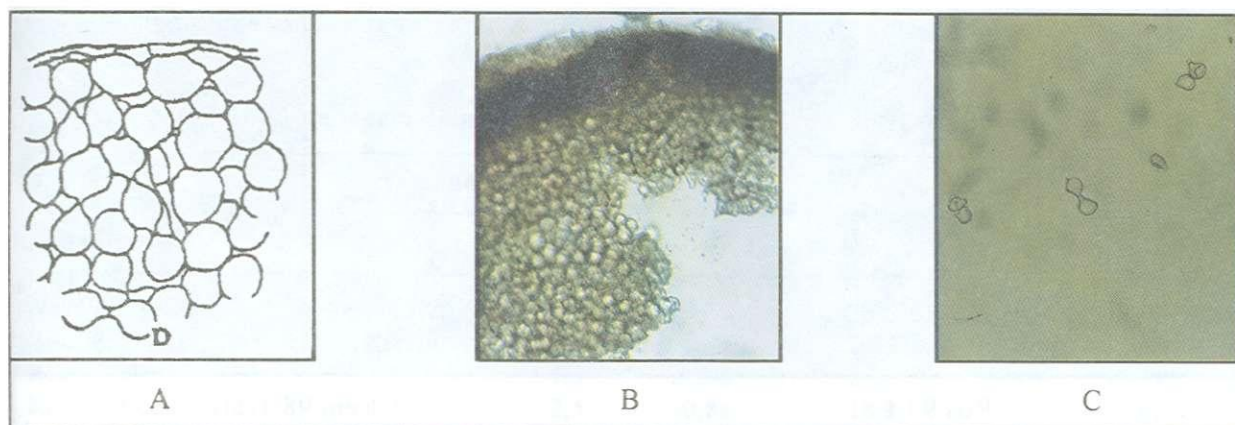


Figura 1. Comparación de las características de las células de esclerocios de *Rhizoctonia oryzae-sativae*, Aislamiento Ros 98.1 con diagrama del género descrito por Ou, 1985. A: diagrama de Ou; B: corte de esclerocio con diferenciación de capas células externas; C: forma de células libres.

Figure 1. Comparison of the characteristics of *Rhizoctonia oryzae-sativae* sclerotial cells, Isolated Ros 98.1 with the diagram of the genus describe by Ou, 1985. A: Ou diagram; B: sclerotial slits with differentiation of the external cell layer; C: free cells shape.

Determinación del número de núcleos

Mediante la técnica de DAPI se procedió a visualizar los núcleos de hifas de los aislamientos. El producto reacciona en forma específica con el ADN (Ácido Dexoxyrribonucleico) de doble hebra, dejando en evidencia los núcleos a la microscopía de fluorescencia. El experimento se repitió tres veces utilizando cinco porta objetos, preparados cada uno a partir de un esclerocio del aislamiento. Se llegó siempre a la misma conclusión: que los aislamientos productores de esclerocios amorfos café a café cobrizo, grandes, corresponden a especies binucleadas, mientras que el aislamiento de referencia, Rem 98.1 extraído de remolacha, correspondió efectivamente a una *Rhizoctonia* multinucleada.

En la Figura 2 se destacan los núcleos de Ros 93.1 comparados con Rem 98.1, confirmandose el carácter binucleado del aislamiento de arroz, y el estado multinucleado (7 a 9 núcleos) del aislamiento obtenido de remolacha. Al aplicar la tinción DAPI a los aislamientos Ros 92.2; Ros 96.1; Ros 97.4 y Ros 98.1, todos se mostraron binucleados. Estos resultados son consistentes con lo informado por Inagaki y Makino (1974) para *Rhizoctonia oryzae-sativae*.

Pruebas de patogenicidad

Los síntomas de la pudrición de la vaina, en condiciones de campo, se detectan cuando el arroz se encuentra en estado de encañado; éstos se acentúan a medida que el cereal avanza en sus estados fenológicos.

La asociación observada entre la baja disponibilidad de potasio en el suelo y la severidad de la enfermedad, definen al proceso infeccioso como altamente dependiente de la debilidad de la caña de la planta, para que el hongo sea capaz de penetrar, diseminarse en los tejidos y establecer una relación patogénica exitosa (Ortega *et al.*, 1991). El modelo seguido en este estudio, de inocular plántulas de arroz en condiciones estériles, con cinco días de edad, si bien proporcionó información de que los aislamientos fueron capaces de causar lesiones, en algunos casos pueden reducir el desarrollo de las plántulas (Ros 97.4), y en otros casos matarlas. El método hace abstracción de lo que ocurriría en condiciones de campo, donde por un lado Ros tiene que competir con los otros organismos pertenecientes al hábitat del arroz, y por otro sobreponerse a la respuesta (resistencia) que sea capaz de darle la planta a la infección en condiciones naturales.

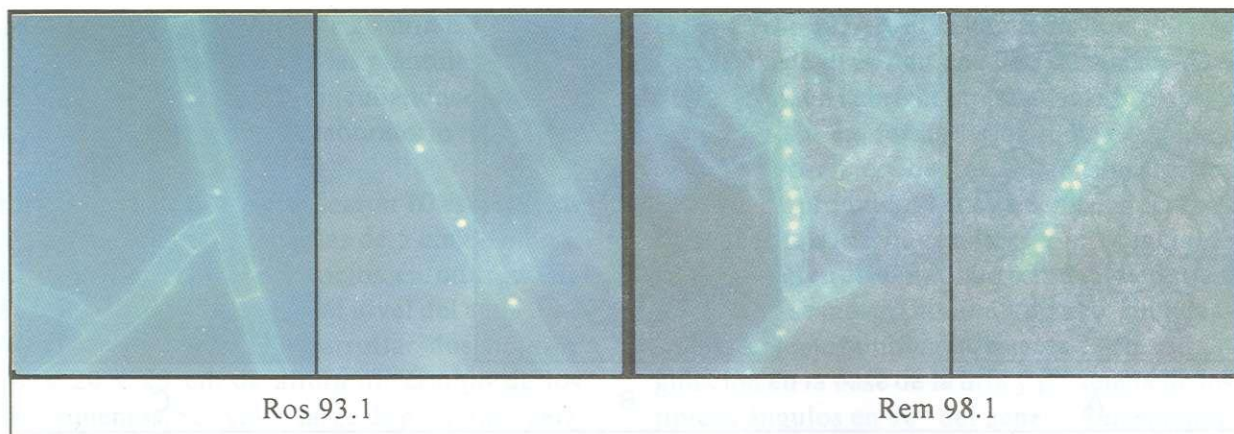


Figura 2. Comparación del estado binucleado de las hifas de *Rhizoctonia oryzae-sativae* aislamiento Ros 93.1 con el estado multinucleado de *Rhizoctonia* sp. aislamiento Rem 98.1 obtenido de *Beta vulgaris*.

Figure 2. Comparison of the binucleated stage of *Rhizoctonia oryzae-sativae* hyphae isolate Ros 93.1 with the multinucleated stage of *Rhizoctonia* sp. isolated Rem 98.1 obtained from *Beta vulgaris*.

En la mayoría de los aislamientos inoculados fue posible inducir formación de lesiones, con y sin herida artificial, siendo mayor el avance del hongo cuando se dispuso los esclerocios en un trozo de agar adherido al tallo de las plántulas. A los 11 días de colocados los esclerocios en contacto con las plántulas, fue posible observar lesiones, y a los 14 días muerte de algunas de ellas. En algunos casos, se observó la formación de nuevos esclerocios sobre los tejidos dañados, mientras que las medidas de altura de plántula no reflejaron diferencias significativas con las plantas no inoculadas (Cuadro 3).

Una segunda prueba de patogenicidad conducida con los aislamientos Ros 97.2 y Ros 98.1 también resultó positiva, apareciendo este último aislamiento con mayor habilidad en la formación de micelio y de nuevos esclerocios. Causó la muerte de todas las plantas tratadas 21 días después de la inoculación. Este aislamiento fue confirmado como *Rhizoctonia oryzae-sativae* por el International Mycological Institute (IMI), Surrey, United Kingdom, y quedó depositada con el número IMI 378829.

Si bien los aislamientos utilizados en este estudio procedían de Parral, San Carlos y Chillán, todas

localidades de la VIII Región, se cuenta además en la colección de aislamientos, con otros que han sido obtenidos de plantas enfermas colectadas en Talca y Linares, y que son morfológicamente indistinguibles de los que fueron utilizados en el presente estudio. Esta similitud nos hace proponer que el hongo causante de la pudrición de la vaina se encontraría también presente en otras áreas productoras de arroz de Chile.

CONCLUSIONES

La técnica DAPI, para la tinción de núcleos, es altamente eficiente para la observación del estado nuclear de la especie *Rhizoctonia oryzae-sativae* de arroz.

Mediante la incubación de plántulas de arroz en contacto con esclerocios de *Rhizoctonia oryzae-sativae*, es posible reproducir síntomas y signos asociados a la enfermedad Pudrición de la Vaina, o Mancha Agregada de la Vaina del arroz.

Esta es la primera determinación de la especie *Rhizoctonia oryzae-sativae* (Sawada), Mordue en Chile.

Cuadro 3. Efecto de la inoculación de cuatro aislamientos de *Rhizoctonia oryzae-sativae* en plántulas de arroz**Table 3. Effect of the inoculation of four isolates of *Rhizoctonia oryzae-sativae* in rice seedlings**

Aislamiento	Tamaño lesiones (mm) 14 DDI ¹			Largo plántula (cm) 14 DDI ¹		
	Máx.	Mín.	Promedio	Máx.	Mín.	Promedio
Ros 92.2	15,0	0,0	5,7a	20,5	17,3	18,9a
Ros 96.1	23,0	4,0	12,0a	24,8	5,8	17,9a
Ros 97.3	23,0	1,5	11,6a	27,0	11,8	19,2a
Ros 97.4 con herida	16,5	2,5	10,8a	18,9	11,3	14,9a
Control sin inocular	0,0	0,0	0,0b	20,5	17,2	18,5a
Prom. aislamientos	19,4	2,0	10,0	24,8	5,8	17,7
Valor F Anova			2,74 Sig.			0,78 No sig.

¹DDI: Días después de la inoculación. Valores promedio de 5 plántulas. Las lesiones fueron detectables a los 11 DDI. Ros 96.1 causó muerte de plántulas a los 11 DDI. Ros 96.1 y Ros 97.3 produjeron esclerocios nuevos sobre tejidos infectados. Valores seguidos por la misma letra no difieren entre sí, Duncan P < 0,05.

RESUMEN

La enfermedad conocida como "pudrición de la vaina del arroz" se ha detectado en los últimos años en el área arrocería de Chile; con el objetivo de identificar los agentes causales se realizó el presente estudio, de células de hifas y esclerocios de la colección de aislamientos de hongos, obtenidos de plantas de arroz con lesiones y pudrición del cuello en el nivel de inundación del agua, colectados en la zona arrocería. La tinción de ADN nuclear mediante la técnica DAPI mostró el característico estado binucleado, y las pruebas de patogenicidad positivas confir-

maron la presencia en Chile de *Rhizoctonia oryzae - sativae*, agente causal de la Pudrición de la vaina del arroz (Aggregate Sheath Spot).

Palabras claves: arroz, *Rhizoctonia oryzae-sativae*, enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa y entusiasta colaboración de la ayudante de investigación Sra. Sylvia Bustamante G.

LITERATURA CITADA

- AGUILA, H. 1987 Agricultura General y Especial. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. p. 174.
- FRANCE I., A. Y ALVARADO A., R. 1985 Determinación de *Sclerotium hydrophilum* Sacc. en arroz (*Oryza sativa* L.). Agricultura Técnica (Chile) 45(2): 163-165.
- GUNELL, P.S. AND WEBSTER, R.K. 1984. Aggregate sheath spot of rice in California. Plant Disease 68: 429-531
- GUNELL, P.S. AND WEBSTER, R.K. 1987. *Ceratobasidium oryzae sativae* sp. nov., the teleomorph of *Rhizoctonia oryzae-sativae* and *Ceratobasidium setariae* comb. Nov., the probable teleomorph of *Rhizoctonia fumigata* comb. Nov. Mycologia 79: 731-736.

- INAGAKI, K. AND MAKINO, M. 1974. Karyological characters of the fungi causing rice sclerotiosis. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 40: 368-371.
- INIA. 1970. Investigación Agropecuaria. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental La Platina. Santiago, Chile. p. 19.
- ORTEGA B., R.; MADARIAGA B., R.; ALVARADO A., R. Y BELMAR N., C. 1991. Pudrición del tallo en arroz: fertilización potásica. *Investigación y Progreso Agropecuario Quilamapu* Nº 49. p. 19-24.
- OU, S.H. 1985. *Rice Diseases*. CAB. Commonwealth Mycological Institute. Surrey, UK. 380 p.
- SNEH, B.; BURPEE, L. AND OGOSHI, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 133 p.
- WEBSTER, R.K. AND GUNELL, P.S. 1992. *Compendium of Rice Diseases*. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. 62 p.