
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACION DE VIRULENCIA

EN AISLAMIENTOS DE *Rhizoctonia solani* KÜHN, CAUSANTE

DE LA MANCHA BANDEADA EN MAÍZ

Rosaura Perdomo, Alexander Hernández, Alex González, Juan Pineda y Jesús Alezones

RESUMEN

En Venezuela la mancha bandeada del maíz, causada por *Rhizoctonia solani* Kühn, tiene una alta incidencia y distribución en las principales zonas maiceras, causando disminución de los rendimientos. En 2004 se condujeron ensayos con el objetivo de caracterizar y evaluar la virulencia de 25 aislamientos de *R. solani*. Para la caracterización se realizaron evaluaciones culturales, microscópicas y moleculares, estas últimas utilizando una secuencia de amplificación específica de la transcrita región espaciadora interna del ADN ribosomal (rADN-ITS). Para la evaluación de la virulencia se realizaron pruebas de inoculación en las líneas de maíz CML-254 y L-82201-22-1-1, tanto en laboratorio, usando una solución de cinetina (6-furfuril-amino-purina), como en invernadero, inoculando plántulas. Las pruebas de caracterización

demonstraron que los aislamientos efectivamente correspondían a *R. solani*, aun cuando hubo diferencias en el color de las colonias, crecimiento micelial y tamaño de esclerocios, entre otras. El análisis molecular demostró que los aislamientos pertenecen al grupo de anastomosis AGI-IA. En la prueba de inoculación en laboratorio los aislamientos GISOM1 y P2TUR3 tuvieron mayor índice de virulencia. En invernadero los aislamientos más virulentos fueron BITOR1, P2TUR6 y B2SAB1. La línea CML-254 mostró el mayor nivel de resistencia a la enfermedad en ambas pruebas de virulencia. Los resultados permitieron identificar y caracterizar aislamientos que pueden ser utilizados en programas de mejoramiento genético para la identificación de posibles fuentes de resistencia y en la evaluación del germoplasma mejorado.

SUMMARY

In Venezuela, banded leaf spot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn is a widely distributed disease in the most important maize growing areas, causing important yield losses. In 2004, experiments were conducted with the purpose of characterizing and evaluating the virulence of 25 isolates of *R. solani*. Characterization tests were performed throughout cultural, microscopic, and molecular evaluations, the latter using a specific ribosomal internal transcribed spacer region (rADN-ITS). Virulence tests were performed on the maize inbred lines CML-254 y L-82201-22-1-1, both in the laboratory using KIN solution (6-furfurilaminopurine), and in a greenhouse inoculating seedlings. Cha-

racterization tests demonstrated that all isolates belong to *R. solani*, although differences were observed in colony color, mycelial growth and sclerotia size, among others. Molecular analysis classified all isolates within the *R. solani* anastomosis group AGI-IA. Virulence tests performed in the laboratory showed that the isolates GISOM1 and P2TUR3 had the highest virulence index. In greenhouse tests BITOR1, P2TUR6, and B2SAB1 resulted more virulent. In both virulence tests, the line CML-254 showed the highest level of resistance to disease. The isolates identified and characterized in this study may be used by maize breeding programs looking for resistant sources and improved cultivars.

Introducción

En el ámbito mundial el cultivo de maíz ocupa el tercer lugar de producción después del arroz y el trigo. En Venezuela el maíz se encuentra ubicado en segundo lugar después del arroz y, debido a su alto valor nutritivo y el gran impacto socioeconómico, es considerado de gran

importancia como alimento estratégico en la población y como subproducto en la elaboración de alimentos concentrados para animales (Bastidas, 2003).

La planta de maíz, aunque de reconocida adaptabilidad, frecuentemente sufre enfermedades que alteran su funcionamiento normal, modificando su desarrollo y reduciendo

o anulando su producción (Fontana y González, 2000). Durante los últimos años se han agudizado los problemas ocasionados por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn en plantaciones de maíz, provocando reducciones importantes en los niveles de productividad. En Venezuela la enfermedad se ha señalado desde el año 1995, afectando severamente

hojas, tallos y mazorcas en estado de madurez en siembras de maíz en la colonia agrícola de Turén, estado Portuguesa (Cardona *et al.*, 1999).

Este problema ha ganado la atención de investigadores en diferentes áreas del cultivo, así como también de los productores, quienes demandan una respuesta rápida para superarlo, llegando

PALABRAS CLAVE / Grupo de Anastomosis / Maíz / Mancha Bandeada / *Rhizoctonia solana* / Virulencia / *Zea mays* /

Recibido: 03/10/2005. Modificado: 13/12/2006. Aceptado: 14/12/2006.

Rosaura D. Perdomo R. Ingeniero Agrónomo, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Venezuela. Asistente de Investigación, Fundación Agrícola Danac (DANAC), Venezuela.

Alexander J. Hernández J. Ingeniero Agrónomo, Universidad

de Oriente (UDO), Venezuela. M.Sc. en Mejoramiento Genético de Plantas, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesor, UCLA, Venezuela, e Investigador, DANAC, Venezuela. Dirección: Post-grado de Fitopatología. Decanato de Agronomía, UCLA. Cabudare,

Lara, Venezuela. e-mail: alexander.hernandez@danac.org.ve

Juan Bautista Pineda P. Ingeniero Agrónomo y M.Sc. en Fitopatología, UCLA, Venezuela. Profesor, UCLA, Venezuela.

Alex D. González V. M.Sc. en Agronomía y Estudiante de

Doctorado, UCV, Venezuela. Investigador, DANAC, Venezuela.

Jesús M. Alezones G. Ingeniero Agrónomo y Estudiante de Maestría, UCV, Venezuela. Investigador, DANAC, Venezuela.

Na Venezuela a mancha bandeada do milho, causada por *Rhizoctonia solani* Kühn, tem uma alta incidência e distribuição nas principais áreas de plantio de milho, causando diminuição do rendimento. Em 2004 foram conduzidos ensaios com o objetivo de caracterizar e avaliar a virulência de 25 isolamentos de *R. solani*. Para a caracterização se realizaram avaliações culturais, microscópicas e moleculares, estas últimas utilizando uma seqüência de amplificação específica da região espaçadora transcrita interna do DNA ribossomal (rDNA-ITS). Para a avaliação da virulência se realizaram provas de inoculação nas linhas de milho CML-254 e L-82201-22-1-1, tanto em laboratório, usando uma solução de cinetina (6-furfuril-amino-purina), como em estufa, inoculando plântulas. As provas de caracterização demonstra-

ram que os isolamentos efetivamente correspondiam a *R. solani*, ainda quando houve diferenças na cor das colônias, crescimento micelial e tamanho de esclerócios, entre outras. A análise molecular demonstrou que os isolamentos pertencem ao grupo de anastomosis AG1-IA. Na prova de inoculação em laboratório os isolamentos GISOM1 e P2TUR3 tiveram maior índice de virulência. Em estufa, os isolamentos mais virulentos foram BITOR1, P2TUR6 e B2SAB1. A linha CML-254 mostrou o maior nível de resistência à enfermidade em ambas provas de virulência. Os resultados permitiram identificar e caracterizar isolamentos que podem ser utilizados em programas de melhoramento genético para a identificação de possíveis fontes de resistência e na avaliação do germoplasma melhorado.

incluso a considerarse potencialmente más importante que las limitantes abióticas y de manejo agronómico, por la dificultad en encontrar a corto plazo medidas culturales, controles químicos o resistencia genética para combatir el patógeno (Cabre-ra y García, 2000).

R. solani, estado anamorfó de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk., es un usual habitante del suelo con un amplio rango de hospedantes, características que lo convierten en un enemigo peligroso y difícil de controlar, porque además sobrevive como saprófito y año tras año su presencia se incrementa (Cabrera, 2002; Bastidas, 2003). Se ha establecido que las cepas de *R. solani* que afectan al maíz, pertenecen al grupo de anastomosis AG1-IA (Hernández *et al.*, 2003a).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar y evaluar la virulencia de 25 aislamientos de *R. solani* AG1-IA, obtenidos de plantaciones de maíz en diferentes localidades de Venezuela, a fin de identificar los aislamientos más virulentos para posteriormente orientar programas de mejoramiento dirigidos hacia la búsqueda de cultivares de maíz resistentes al patógeno.

Materiales y Métodos

Origen de los aislamientos. Los 25 aislamientos de *R. solani* fueron obtenidos de una selección de esclerócios tomados de materiales infectados que fueron colectados durante

los años 2002 y 2003 por investigadores de la Fundación Agrícola DANAC, en diferentes localidades de los estados venezolanos de Portuguesa, Guárico, Yaracuy y Barinas (Tabla I). El cultivo patrón del grupo de anastomosis AG1-IA de *R. solani* fue donado por Nelly Delgado, del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Portuguesa, Venezuela.

Obtención de los aislamientos. Para la desinfección de los esclerócios, éstos fueron sumergidos por 3min en so-

lución de cloro al 1%; luego fueron lavados con agua destilada estéril, secados en papel absorbente, sembrados asépticamente en placas con agar-agua (AA) y colocados en condiciones de laboratorio (22-24°C). Cada aislado se purificó por transferencia de ápices hifales a placas de Petri con agar-papa-dextrosa (PDA). Los aislamientos fueron caracterizados en función de la morfología hifal y la condición nuclear. Los inóculos utilizados en todas las pruebas fueron discos de agar-micelio (6mm diámetro)

extraídos del margen de cultivos de 4-5 días en placas con PDA incubadas en condiciones de laboratorio.

Caracterización nuclear. Se utilizaron cultivos producidos durante 4-5 días en placas de Petri que contenían 15ml de AA, bajo condiciones de laboratorio. Se extrajeron círculos delgados de agar-micelio (12mm diámetro) que fueron colocados sobre portaobjetos y teñidos con safranina O y azul de anilina al 0,5%, para contabilizar el número de núcleos por célula y medir el

TABLA I
PROCEDENCIA Y CÓDIGO DE AISLAMIENTOS DE *R. solani* COLECTADOS
EN ZONAS MAICERAS DE VENEZUELA

Nº	Aislamiento	Localidad	Código
1	INIA Barinas	Sector Torunos, Barinas	BITOR1
2	Sabaneta – Barinas	Sabaneta, Barinas	B2SAB1
3	D-2002 (Guacamaya)	El Sombrero, Guárico	G1SOM1
4	QPM-1 Las Guacamayas	El Sombrero, Guárico	G1SOM2
5	C- 580 Las Guacamayas	El Sombrero, Guárico	G1SOM3
6	QPM-1 Las Guacamayas	El Sombrero, Guárico	G1SOM4
7	Sefloarca (Santa Lucía)	San José de Tiznado, Guárico	G2T1Z2
8	Pioner 30R92	San José de Tiznado, Guárico	G2T1Z1
9	Sefloarca 108	San José de Tiznado, Guárico	G2T1Z3
10	D-QPM-1 (Aguilar)	Vía el Playón Portuguesa	P1VP1
11	D-QPM-1 (Aguilar)	Vía el Playón Portuguesa	P1VP2
12	DK- 491(Aguilar)	Vía el Playón Portuguesa	P1VP3
13	Chicho Landini	El Playón, Portuguesa	P1VP4
14	Chicho Landini	El Playón, Portuguesa	P1VP5
15	INIA Agua Blanca 1	Agua Blanca, Portuguesa	P2AB1
16	INIA Agua Blanca 2	Agua Blanca, Portuguesa	P2AB2
17	Colonia – El Playón	Colonia Agrícola Turén, Portuguesa	P2TUR1
18	Parcela 197 UEN-P	Colonia Agrícola Turén, Portuguesa	P2TUR2
19	Parcela 197 UEN-P	Colonia Agrícola Turén, Portuguesa	P2TUR3
20	INIA	Colonia Agrícola Turén, Portuguesa	P2TUR4
21	Parcela 197 UEN-P	Colonia Agrícola Turén, Portuguesa	P2TUR5
22	Parcela 197 UEN-P	Colonia Agrícola Turén, Portuguesa	P2TUR6
23	INIA- Turén	Colonia Agrícola Turén, Portuguesa	P2TUR7
24	DANAC San Javier	San Javier, Yaracuy	Y1SJ1
25	Pulido	Sabana de Parra, Yaracuy	Y2SP1

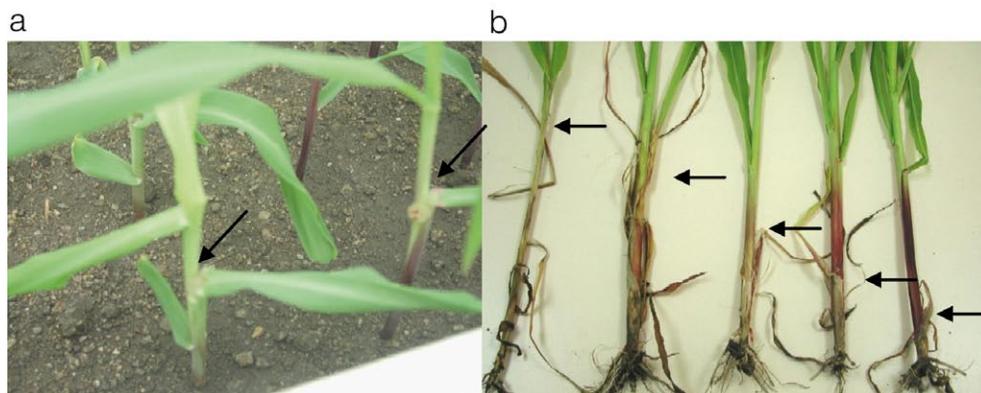


Figura 1. Plántulas inoculadas en invernadero. A: Punto de inoculación. b: Síntomas causados por el hongo, en las diferentes escalas de severidad de la enfermedad, del 5 al 1 (de izquierda a derecha)

grosor de las hifas (Johansen, 1940).

Crecimiento y caracterización hifal. Los aislamientos fueron subcultivados en placas con PDA y mantenidos incubados en condiciones de laboratorio. Por cada tratamiento (25 cepas) se usaron tres repeticiones en un diseño aleatorio. Se midió el crecimiento micelial en cm^2 a las 48h. La caracterización se hizo durante cuatro semanas, sobre la base del color de la colonia, características del micelio e inicio de la formación, maduración, color y tamaño de los esclerocios.

Evaluación de Virulencia. Se realizaron dos pruebas, una a nivel de laboratorio utilizando placas Petri con solución de cinetina y otra en invernadero. Los análisis de la variancia y la discriminación de las medias, en ambos ensayos, fueron realizados empleando el programa SAS JMP 5.012.

Ensayo de virulencia en solución de cinetina. Dos líneas de maíz (CML-254 y L-82201-22-1-1) del banco de germoplasma de la Fundación DANAC fueron sembradas y mantenidas en invernadero. Para tales propósitos se usaron envases plásticos con 2kg de sustrato previamente esterilizado. Los 25 aislamientos de *R. solani* se multiplicaron sobre granos de arroz esterilizados en autoclave a 121°C y

15lb durante 15min. De plantas de maíz con 30-35 días de edad, se cortaron hojas completas y se dividieron en segmentos de 8cm de largo que fueron lavados con agua y colocados en capsulas de Petri que contenían 8ml de solución de cinetina (6-furfuril-amino-purina) a 2ppm. Los segmentos foliares fueron inoculados aplicando en la superficie adaxial un grano de arroz colonizado por el correspondiente aislamiento. Seguidamente, las placas se incubaron a 22-24°C por tres días.

El desarrollo de la enfermedad se evaluó a las 24h de inoculación, utilizando la escala de Ahuja y Payak (1981), que consiste de grados de 0 a 5 según el porcentaje de área afectada de la hoja, a saber 1: 3,4%; 1.5: 10,8%; 2: 11,4%; 2.5: 23,6%; 3: 32,0%; 3.5: 38,0%; 4: 39,2%; 4.5: 45,0%; y 5: 53,4% de área afectada. La prueba se estableció en un diseño completamente aleatorio con 3 repeticiones y en arreglo factorial con los siguientes factores: horas, cepa, genotipo y sus interacciones.

Ensayo de virulencia en invernadero. De las líneas CML-254 y L-82201-22-1-1 se sembró una semilla por punto sobre tierra esterilizada. Se emplearon 13 mesones de 60x120cm y 20cm de espesor. Cada mesón fue dividido en dos partes iguales, para utilizar un total de 25. Cada mitad tenía 14 hileras con 12

plantas, repartidas entre los dos genotipos, donde cada hilera representa una repetición. Cada parte fue inoculada con un aislamiento, para lo cual se colocó un círculo de PDA colonizado de cada uno de los aislamientos en la primera hoja verdadera entre la vaina y el tallo de la planta a los 12 días de edad (dde; Figura 1a). La evaluación se realizó 7 días después de la inoculación (ddi), utilizando para ello una escala de cinco pasos, basada en la altura relativa o avance de la lesión, a saber 1: <5% de la altura de la planta, 2: 5-15%, 3: 16-35%, 4: 36-65%; y 5: >66% de la altura de la planta y muerte de las mismas (Figura 1b).

El experimento se estableció mediante un diseño completamente aleatorio, con un arreglo factorial y siete repeticiones. El factor genotipo se analizó en dos niveles, susceptible y resistente, y el factor cepa en 25 niveles correspondientes a los diferentes aislamientos.

Identificación del grupo de anastomosis mediante rADN-ITS. Este método permite la identificación de manera precisa y rápida de los grupos de anastomosis de los aislamientos (Hernández *et al.*, 2003a). Para la extracción de ADN de cada aislamiento y del patrón AG1-1A usado como control, se utilizaron cultivos puros multiplicados en medio líquido. El micelio fue filtrado y lavado con agua

estéril para la obtención de la masa que fue macerada en N_2 líquido y luego se le agregó buffer de extracción (CETAB 2%, 750 μl ; Mercaptoetanol, 15 μl). El extracto con ADN fue transferido a tubos de microcentrífuga e incubados por 30min a 65°C, mezclando por inversión cada 8min. Se agregó 300 μl de acetato de potasio 3M (pH 4,8) e inmediatamente fue incubado en hielo por 15min y luego centrifugado a 12000rpm por 9min. El sobrenadante fue transferido a tubos de microcentrífuga y se le agregó 200 μl de clorofórmico isoamílico (24:1), mezclando por inversión; después fue centrifugado a 12000rpm por 9min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a tubos de microcentrífuga donde se añadió 750 μl de etanol 100%, se incubó sobre hielo por 10min y se centrifugó a 18000rpm por 9min. Tras descartar el sobrenadante, se lavó 2 veces con 500 μl de etanol 70%, para luego centrifugar a 9000rpm por 9min por cada lavado. El sobrenadante fue desechado y se dejó secar en papel de filtro. El precipitado fue resuspendido en 100 μl de tampón TE y almacenado a 4°C.

La amplificación rDNA-ITS fue realizada usando los primers ITS1 (5'-TCCGTA-GGTGAACCTGCGG-3') y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'). Cada 30 μl de reacción de PCR tuvo 2,0 μl de ADN, 3 μl de buffer 10X, 19 μl de agua destilada, 0,6 μl de dNTP'S 10mM, 1,8 μl de Mg^{+2} 25mM, 3 μl de primers (10X) y 0,6 μl de Taq DNA polimerasa. Se amplificó durante 35 ciclos a una temperatura de alineación de 58°C. El producto de amplificación fue digerido con la mezcla de las enzimas AluI y HaeIII, en donde 6 μl del producto del PCR fue mezclado con 1,5 μl de tampón-2, 5,5 μl de agua destilada y 1 μl de cada enzima y se incubó a 37°C por 3h. Se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (PAGE), para luego realizar la tinción con plata al 0,2%. Posteriormente se analizó el patrón de bandas.

TABLA II
VALORES MEDIOS PARA LA CARACTERÍSTICA
GROSOR DE HIFAS (μm) DE LOS 25 AISLAMIENTOS
DE *R. solani*

Aislamientos	Media	Desviación	Máximo	Mínimo
P2TUR4	8,0	3,3	12,5	2,5
P2TUR7	8,5	1,3	10,0	7,5
Y1SJ1	8,9	1,9	12,5	6,3
B2SAB1	8,9	1,9	12,5	6,3
P2AB2	9,0	1,7	12,5	7,5
P1VP2	9,0	1,3	10,0	7,5
G1SOM4	9,0	1,7	12,5	7,5
Y2SP1	9,0	1,3	10,0	7,5
P1VP4	9,0	1,7	12,5	7,5
G2TIZ3	9,3	1,7	12,5	7,5
P2TUR1	9,3	1,7	12,5	7,5
P1VP5	9,5	1,6	12,5	7,5
G2TIZ2	9,8	1,8	12,5	7,5
G1SOM2	9,8	1,8	12,5	7,5
P2TUR2	9,8	1,4	12,5	7,5
P2TUR6	9,8	1,8	12,5	7,5
BITOR1	9,8	2,2	12,5	7,5
P2AB1	10,0	1,7	12,5	7,5
G2TIZ1	10,0	2,0	12,5	7,5
P2TUR5	10,0	1,2	12,5	7,5
G1SOM3	10,3	0,8	12,5	10,0
P1VP3	10,5	1,6	12,5	7,5
P2TUR3	10,5	1,1	12,5	10,0
G1SOM1	10,8	2,1	12,5	7,5
P1VP1	12,5	1,7	15,0	10,0

TABLA III
PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS (TUKEY HSD)
PARA DIFERENTES CARACTERÍSTICAS DE
ESCLEROCIOS EN LOS 25 AISLAMIENTOS DE *R. solani*

Aislamientos	Grosor (mm)	Formación (Días)	Maduración (Días)
G1SOM1	4,68 a	3,67 g	9,33 d
BITOR1	4,50 a	6,00 gg	7,67 d
Y2SP1	3,81 b	6,00 gg	9,33 d
P1VP4	3,31 b	5,33 gg	7,67 d
P2TUR7	3,28 b	13,33 a	13,33 d
P2TUR6	3,22 b	9,00 f	10,00 d
P1VP2	3,01 b	4,00 g	8,33 d
G1SOM2	2,82 c	4,00 gg	10,00 d
P1VP1	2,71 c	3,67 gg	8,33 d
P2TUR2	2,62 c	12,00 b	14,00 c
P2TUR3	2,60 c	9,33 f	12,33 d
P2TUR4	2,50 c	11,33 c	13,67 d
P1VP5	2,43 c	4,00 g	9,33 d
P2AB2	2,38 c	14,00 a	18,33 a
G2TIZ3	2,37 c	4,67 gg	10,00 d
B2SAB1	2,33 c	10,00 e	14,33 c
Y1SJ1	2,29 c	6,33 gg	11,67 d
G2TIZ2	2,19 c	4,67 gg	8,67 d
G1SOM4	2,18 c	11,00 d	14,00 c
G1SOM3	2,18 c	9,33 f	15,00 b
G2TIZ1	1,92 c	3,33 gg	6,67 e
P1VP3	1,82 c	4,00 gg	8,67 d
P2AB1	1,81 c	5,00 gg	9,33 d
P2TUR1	0,00 d	0,00 gg	0,00 e
P2TUR5	0,00 d	0,00 gg	0,00 e

*Promedios con las mismas letras son estadísticamente iguales al 5% de probabilidad

Resultados y Discusión

Caracterización microscópica de los aislamientos

En todos los materiales examinados se observaron hifas formando ángulos rectos, constricciones en el punto de origen de las ramificaciones e inmediatamente por encima de este sitio presentaban un septo. La caracterización nuclear de los aislamientos teñidos con azul de anilina permitió la observación de células somáticas con 3-6 núcleos. Para la caracterización del género *Rhizoctonia* es necesario determinar el número de núcleos que presentan las células vegetativas y en función de ello se pueden diferenciar *Rhizoctonia* binucleadas o multinucleadas (Parmeter y Whitney, 1970).

Entre las observaciones microscópicas realizadas (Tabla II) se puede señalar que el grosor de hifas estuvo comprendido entre valores promedio de 8,0 y 12,5 μm . Los aislamientos P1VP1, G1SOM1, P2TUR3 y P1VP3 mostraron un mayor grosor de hifas, con valores de 12,5; 10,8; 10,5 y 10,5 μm , respectivamente; mientras que el menor grosor de hifas correspondió al aislamiento P2TUR4, con 8,0 μm . Los aislamientos restantes mostraron valores intermedios.

La evaluación morfológica de las colonias producidas en PDA de cada uno de los aislamientos, permitió también la caracterización cualitativa de este patógeno. Las características más resaltantes fueron: a) micelio blanco en colonias jóvenes, tornándose posteriormente amarillentas a marrón en todo el plato; b) formación de esclerocios, al principio de color blanco y posteriormente se tornan de color marrón y sin forma definida, apreciándose esclerocios semiesféricos, globosos o sencillamente de forma irregular con base aplanada; c) esclerocios de diferentes tamaños, y en ciertas ocasiones aparecieron como masas de mayor tamaño; d) ocasionalmente se observó un exudado color ámbar so-

TABLA IV
PRUEBA DE
COMPARACIÓN DE
MEDIAS (TUKEY-KRAMER)
PARA EL DESARROLLO
MICELIAL (cm^2) DE 25
AISLADOS DE *R. solani*

Aislamientos	Crecimiento ($\text{cm}^2/48\text{h}$)
P2TUR4	63,62 a
P1VP1	63,62 a
P1VP2	61,05 a
P2TUR2	60,61 a
P1VP3	59,73 ab
G2TIZ3	55,24 ab
P2AB2	45,57 b
G2TIZ2	39,99 c
P2AB1	39,41 c
G1SOM4	34,07 cd
P2TUR6	21,12 de
G2TIZ1	19,70 def
P2TUR7	19,65 def
G1SOM1	16,17 efg
BITOR1	14,19 efgh
P1VP5	13,90 efgh
P2TUR1	12,51 efgh
G1SOM2	11,23 efgh
P2TUR3	9,95 efgh
B2SAB1	8,25 efgh
Y1SJ1	7,79 efgh
P2TUR5	7,02 efgh
G1SOM3	5,40 fgh
Y2SP1	2,37 gh
P1VP4	1,07 h

*Promedios con las mismas letras son estadísticamente iguales al 5% de probabilidad.

bre los esclerocios. Todas las características descritas coinciden con las reportadas por otros investigadores (Carling y Summer, 1992; Cedeño *et al.*, 1996; Cardona *et al.*, 1999; Da Silveira *et al.*, 2000).

El análisis de varianza aplicado a las variables morfológicas evaluadas (grosor, días de aparición y días de maduración de los esclerocios) detectó diferencias altamente significativas entre los aislamientos (Tabla III). La prueba de comparación de medias realizada para la variable grosor de esclerocios, permitió separar cuatro grupos que presentaron valores estadísticamente similares. Los aislamientos G1SOM1 y BITOR1 presentaron un mayor grosor, con valores de 4,68 y 4,50mm respectivamente. La mayoría presentó esclerocios de tamaño intermedio, con va-

TABLA V
ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD
EN INVERNADERO (a) Y MEDIANTE EL USO DE CINETINA (b)

a				b			
Fuente	GL	SC	F	Fuente	GL	SC	F
Modelo	49	358,2	58,1**	Modelo	149	1002,7	28,7**
Error	299	37,6		Error	300	70,1	
Total	348	395,8		Total	449	1072,8	
			R ² = 0,9				R ² = 0,9
CEPA	24	332,7	110,2**	HORA	2	891,3	1905,4**
LINEA	1	9,2	72,7**	CEPA	24	47,6	8,4**
C×L	24	15,5	5,2**	LINEA	1	1,9	8,3**
			CV(%) 3,5	H×C	48	18,8	1,7*
				H×L	2	1,2	2,7ns
				C×L	24	29,8	5,3**
				H×C×L	48	11,8	1,0ns
							CV(%) 11,0

lores que oscilaron entre 3,80 y 1,80mm. Para los aislamientos P2TUR1 y P2TUR5 no se presentan valores porque no desarrollaron esclerocios.

En relación al tiempo de formación de esclerocios, la prueba permitió separar siete grupos. Aislamientos con valores entre 3,33 y 6,33 días, fueron los que desarrollaron esclerocios en un menor tiempo, y entre éstos se destacaron G2TIZ1 con valor promedio de 3,33 días, y P1VP1 y G1SOM1 con 3,67 días. El aislamiento P2AB2 fue el que tardó más en formar esclerocios (14 días). Con respecto al tiempo de maduración, existe una relación directamente proporcional a la formación de esclerocios. El estudio de las características de los esclerocios se realizó con el fin de evaluar el comportamiento de los 25 aislamientos de *R. solani* en búsqueda de diferencias que permitan relacionar la capacidad de la cepa para desarrollar la enfermedad y colonizar áreas (suelos o plantas) en forma agresiva o severa, dependiendo del caso. En tal sentido, las cepas que producen esclerocios maduros en menor tiempo, tienen mayor posibilidad de escapar a cualquier medida de control, de incrementar ciclo tras ciclo la cantidad de inóculo y una mayor probabilidad de disseminación.

En lo que respecta al desarrollo micelial, los resultados mostraron diferencias altamente significativas entre los aislamientos probados (Tabla IV). Los aislamientos con mayor desarrollo micelial a las

48h fueron P2TUR4, P1VP1, P1VP2, P2TUR2, P1VP3, G2TIZ3, con valores promedios entre 63,62 y 55,24cm²; grupos de desarrollo micelial intermedios, con intervalos entre 45,57 y 16,17cm², y el grupo con menor desarrollo, entre 14,18 y 1,07cm², estuvo conformado por Y2SP1 y P1VP4. La mayor capacidad de crecimiento micelial pudiera relacionarse con la virulencia, es decir, con la capacidad de causar más daño sobre el hospedante.

Evaluación de la Virulencia

Los modelos utilizados para el análisis de los datos correspondientes a las pruebas de virulencia en invernadero y en solución de cinetina, están registrados en la Tabla V, donde se aprecia un alto grado de confiabilidad y de significación, detectando diferencias para todas las fuentes estudiadas, excepto para las interacciones hora×línea y horas×cepas×líneas. En ambas pruebas, el comportamiento de la virulencia de las cepas fue variable, al igual que el de las líneas de maíz. Hubo diferencias en agresividad entre las cepas, por cuanto la interacción cepa×hora fue significativa y, además, se observó que no todas las cepas causan el mismo grado de daño en igual tiempo.

Virulencia en solución de cinetina

Las observaciones realizadas permiten señalar que los

aislamientos de *R. solani* comienzan su crecimiento sobre el tejido foliar de manera casi inmediata y al término de 12h ya es posible apreciar síntomas de infección. La línea CML-254 fue significativamente menos afectada por los aislamientos que la L-82201-22-1-1.

Los resultados indican diferencias altamente significativas en la virulencia o nivel de daño de los aislamientos (Tabla VI). Los más virulentos fueron G1SOM1, P2TUR3, Y2SP1, P2TUR2 y P2TUR5, con valores en la escala de Ahuja y Payak (1981) de 2,78; 2,69; 2,58; 2,47; y 2,47, respectivamente, mientras que los menos virulentos fueron G2TIZ2, P2TUR7 y P1VP2, con medias de 1,69; 1,69 y 1,64, respectivamente. Los aislamientos restantes tuvieron valores intermedios.

La alta significación estadística observada en la interacción cepas×líneas indica que cada cepa se comporta de manera diferente dependiendo de la línea, lo que dificulta aun más el estudio de los aislamientos (Figura 2).

TABLA VI
COMPARACIÓN DE MEDIAS DE SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD (TUKEY HSD) PARA EL FACTOR CEPA DE LA PRUEBA EN INVERNADERO Y EN CINETINA INDEPENDIENTE DE LA LÍNEA EVALUADA

Aislamientos	Índice de infección ¹	
	Solución de cinetina*	Invernadero**
BITOR1	2,25 defg	4,93 a
P2TUR6	2,03 fghij	4,88 a
B2SAB1	1,94 ghijk	4,86 a
Y2SP1	2,58 abc	4,83 a
G2TIZ3	1,78 ijk	4,71 ab
P2AB2	1,86 ijk	4,68 abc
G1SOM3	2,39 bcde	4,48 abc
Y1SJ1	2,19 defgh	4,44 abc
P1VP4	1,81 ijk	4,26 bc
P1VP1	2,28 cdef	4,19 cd
P2AB1	2,19 defgh	3,72 d
G2TIZ2	1,69 k	3,14 e
G2TIZ1	1,78 ijk	3,13 ef
P1VP2	1,64 k	3,10 ef
P1VP3	1,92 hijk	3,05 ef
P2TUR5	2,47 abcd	2,99 ef
G1SOM1	2,78 a	2,97 ef
G1SOM4	2,22 defgh	2,77 efg
P1VP5	2,39 bcde	2,71 efg
P2TUR3	2,69 ab	2,64 fg
P2TUR7	1,69 k	2,45 gh
P2TUR1	2,08 efghi	2,41 gh
P2TUR4	2,08 efghi	2,38 gh
G1SOM2	1,75 jk	2,14 h
P2TUR2	2,47 abcd	2,08 h

1. Promedios con las mismas letras son estadísticamente iguales al 5% de probabilidad.

* Índice de infección (Ahuja y Payak, 1981) evaluado en escala que se indica en la descripción del ensayo de virulencia en solución de cinetina.

**Índice de infección evaluado en escala que se indica en la descripción del ensayo de virulencia en invernadero.

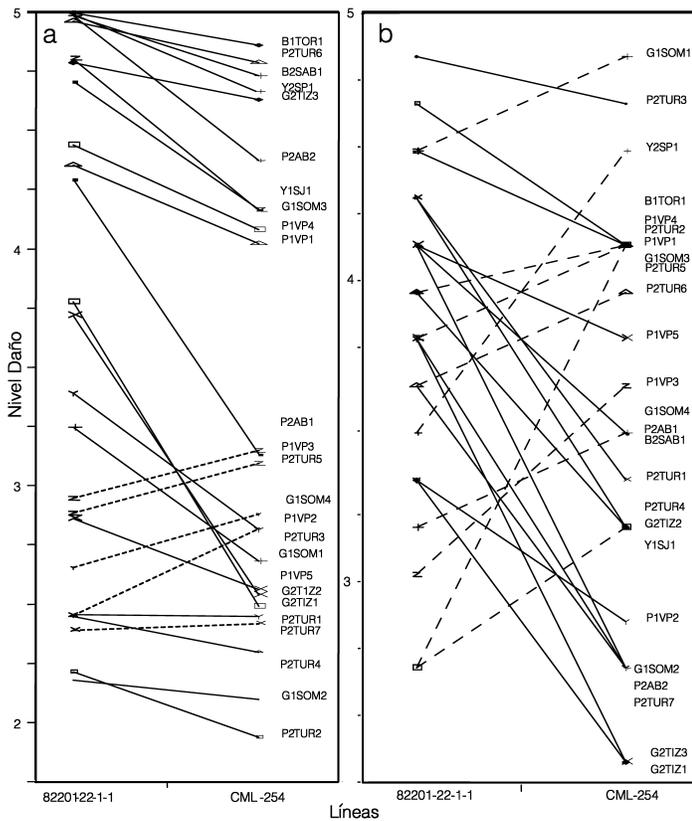


Figura 2. Interacción cepa×línea en los ensayos para evaluar la virulencia (grado de daño) en invernadero (a) y mediante el uso de la solución de cinetina (b). Las líneas interrumpidas indican cambio en la tendencia del nivel de daño de algunos aislamientos sobre la línea resistente CML-254.

Al examinar la interacción existente entre cepas y líneas (Figura 2b) se observó que 16 cepas mostraron mayor grado de virulencia sobre la línea L-82201-22-1-1 en comparación con los daños causados sobre la línea CML-254. Los 9 aislamientos restantes (líneas discontinuas) mostraron una tendencia contraria.

Para *R. solani*, la formación del cojín de infección es de gran importancia para la invasión y posterior in-

fección del tejido y la opinión más común es que los exudados de la planta estimulan la formación de esas estructuras. Las diferencias en formación posiblemente determinaron el nivel de virulencia y el comportamiento diferencial entre los aislamientos (Armentrout *et al.*, 1987). La severidad de las enfermedades está directamente relacionada con la formación de estructuras de infección y esta habilidad es

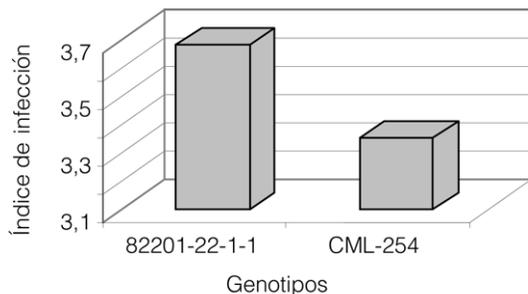


Figura 3. Comportamiento de los genotipos empleados ante los aislamientos evaluados en el ensayo de virulencia en condiciones de invernadero mediante el índice de infección, evaluado como se indica en la descripción del ensayo de virulencia en invernadero.

estimulada por el hospedante (Marchall y Rush, 1980).

Los diferentes modos de penetración empleados por los hongos fitopatógenos dependen del aislamiento, del grupo de anastomosis, las especies de plantas y la parte afectada de la planta (Dodman *et al.*, 1968a, b). Es por eso que las respuestas de virulencia difieren, en algunos casos, cuando se compara el ensayo de invernadero y el de la solución de cinetina; en uno el daño es a nivel del tallo y en el otro en el tejido foliar, tratándose de dos mecanismos de penetración.

Virulencia en condiciones de invernadero

El síntoma inicial pudo ser apreciado en el punto de inoculación; al comienzo se observó una decoloración del tejido, que se tornó color crema y posteriormente marrón. Con el desarrollo de la enfermedad, las lesiones se hicieron de mayor tamaño hasta cubrir, en la mayoría de los casos, todo el perímetro del tallo, alcanzando posteriormente la vaina y la lámina foliar. Esta sintomatología es similar a la descrita por otros investigadores (Ahuja y Payak, 1978; Bastidas, 2003; Cabrera y García, 2000; De León, 1995).

Al igual que el ensayo anterior, se detectó diferencias altamente significativas entre los aislamientos (Cuadro VI), siendo los más virulentos BITOR1, P2TUR6, B2SAB1 y Y2SP1, con valores promedio del índice de infección de 4,93; 4,88; 4,86 y 4,83, respectivamente, seguidos de los grupos de virulencia intermedia, con medias entre 4,71 y 2,38. De igual manera se pudo apreciar que solamente dos aislamientos GISOM2 y P2TUR2 presentaron los promedios de virulencia menores, con índices de 2,14 y 2,08, respectivamente. La línea CML-254 se mostró significativamente menos afectada que L-82201-22-1-1, coincidiendo estos resultados con los del ensayo anterior (Figura 3).

Según los resultados obtenidos en este ensayo, aislamientos pertenecientes a los estados Barinas, Portuguesa y Yaracuy, cuyas siglas comienzan por la respectiva inicial, presentaron un alto nivel de virulencia, lo que sugiere que *R. solani* AGI-IA posee habilidad para adaptarse a diferentes condiciones agroecológicas. En Portuguesa, uno de los principales productores de maíz, posiblemente el patógeno se ve obligado a cambiar frecuentemente su composición genética a causa de la presión de selección generada por siembras consecutivas y cambios en los cultivares comerciales utilizados, convirtiéndolo en un enemigo potencialmente peligroso, capaz de distribuirse en parcelas comerciales de manera rápida y fácil y manifestándose en intensidades considerables.

R. solani es una especie heterogénea conformada por numerosas cepas que difieren en las características de crecimiento *in vitro* y en patogenicidad (Ogoshi, 1987). Se ha determinado que la capacidad parasítica y saprofítica es diferente para cada aislamiento de *R. solani* (Papavizas, 1970). En relación con la expresión del síntoma de la enfermedad, se ha determinado que el hongo posee una toxina específica, un carbohidrato que contiene glucosa, manosa y N-acetylgalactosamina, la cual es producida en mayor cantidad por aislamientos altamente virulentos (Vidhasekaran *et al.*, 1997).

Evaluaciones de cultivares comerciales en Venezuela indican que todos los materiales evaluados fueron susceptibles a *R. solani* (Cabrera y García, 2000; Bastidas, 2003). Adicionalmente, debido a las características de este patógeno de ser polífago y con un amplio rango de hospedantes, se hace difícil encontrar genotipos con características de resistencia a la enfermedad (Zambrano *et al.*, 2002). El hongo posee gran capacidad de sobrevivencia y adaptación a diferentes

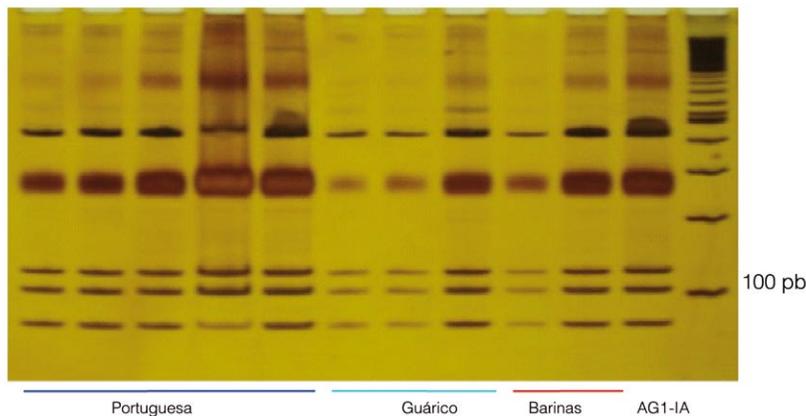


Figura 4. Patrones de bandas del producto de la amplificación específica del espaciador Ribosomal (ITS), en 10 diferentes aislamientos de *Rhizoctonia solani* en maíz de la colecta 2003.

ambientes agroecológicos, lo que implica serias dificultades en el establecimiento de estrategias para su combate, particularmente mediante variedades resistentes (Nass y Rodríguez, 1994).

Entre los factores involucrados en la respuesta de resistencia y/o susceptibilidad a *R. solani* se encuentra el potencial de inóculo y los factores edáficos. Cabe destacar que en la búsqueda de materiales de maíz que presenten algún grado de resistencia a *R. solani* es necesario disponer de aislamientos que presenten un grado de virulencia media-alta, con el objeto de determinar el comportamiento de estos materiales ante el patógeno. En tal sentido se recomienda utilizar primero, en los programas de mejoramiento, las pruebas de cinetina con aislamientos de grado 2 a 2,5 que representan entre un 11,4 hasta 23,6% de daño. Aquellos que resultasen promisorios en estas evaluaciones pasarían a ser evaluados en invernadero, utilizando aislamientos que tengan grado 4 de avance de la enfermedad, entre 36 y 60% de avance. Utilizar aislamientos más virulentos cuando se inicia la búsqueda de materiales promisorios puede enmascarar posibles candidatos fuentes de resistencia por la utilización de una alta presión de selección. Se podría utilizar grandes cantidades de materiales a

evaluar utilizando la prueba de cinetina para luego proceder a evaluar en invernadero. Los seleccionados con estas pruebas pasarían a ser evaluados en campo. Esto permite avanzar más eficazmente, al ahorrar recursos y evaluar mayor cantidad de materiales en la búsqueda de la fuente de resistencia.

Identificación del grupo de anastomosis de aislamientos

La amplificación efectuada originó un producto de 700pb. La digestión conjunta de las enzimas de restricción AluI y HaeIII dió como resultado un patrón de bandas que fueron visualizadas en PAGE (Figura 4). La comparación del patrón de bandas de la cepa AGI-1A utilizada como probador, con el mostrado por los diferentes aislados además de las pruebas de anastomosis, permitió la identificación de éstos. Los 10 aislamientos provenientes de la colecta 2003 mostraron similitud de bandas entre ellos y con el probador del grupo AGI-1A. Igual comportamiento fue descrito por Hernández *et al.* (2003b) al realizar el mismo análisis en 15 de los aislamientos utilizados en este estudio, provenientes de zonas productoras de maíz en la colecta 2002 y utilizando diferentes probadores, como testigos, de 9 grupos de anastomosis. El análisis en conjunto de las dos colec-

tas realizadas confirma que el grupo de anastomosis que está afectando la producción de maíz en Venezuela, es del grupo intraespecífico AGI-1A.

Conclusiones

Las características descritas para cada uno de los aislamientos evaluados se corresponden con las de la especie *Rhizoctonia solani*, encontrándose ran-

gos variables entre los diferentes aislamientos.

El método de amplificación específica del espaciador interno ribosomal (rADN-ITS), permitió verificar que los aislamientos de *R. solani* evaluados pertenecen al grupo de anastomosis AGI-1A

En la prueba de virulencia en cinetina, los niveles de virulencia de los aislamientos fueron variables, encontrándose dentro del grupo de mayor virulencia las cepas G1SOM1, P2TUR3, Y2SP1, P2TUR2 y P2TUR5.

La evaluación de virulencia en condiciones de invernadero mostró que los niveles de virulencia de los aislamientos fueron variables, encontrándose dentro del grupo de mayor virulencia las cepas BITOR1, P2TUR6, B2SAB1 y Y2SP1.

El comportamiento diferencial existente entre los aislamientos de *R. solani* y las dos líneas de maíz, indica que cada aislamiento tiene un comportamiento particular de virulencia, el cual se corresponde con la variabilidad mostrada en las características estudiadas en cada uno de los 25 aislamientos.

REFERENCIAS

- Ahuja S, Payak M (1978) A field inoculation technique for evaluating maize germplasm to banded leaf and sheath blight. *Indian Phytopathol.* 31: 517-520
- Ahuja S, Payak M (1981) A labo-

ratory method for evaluating maize germplasm to banded leaf and sheath blight. *Indian Phytopathol.* 34: 34-37.

- Armentrout V, Downer A, Grasmick D, Weinhold A (1987) Factors affecting infection cushion development by *Rhizoctonia solani* on cotton. *Phytopathology* 77: 623-630.
- Bastidas RO (2003) Comportamiento de cincuenta líneas de maíz (*Zea mays L.*) ante la incidencia de *Rhizoctonia solani* Kühn, en las condiciones de Agua Blanca, estado Portuguesa. Tesis. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Venezuela.
- Cabrera S (2002) *Prácticas de manejo para el control de la mancha bandeada de la hoja (Rhizoctonia solani). Determinación de los niveles de incidencia, severidad y efecto sobre el peso de la mazorca en siembras comerciales de maíz.* INIA-CIAE. Portuguesa, Venezuela. 315 pp.
- Cabrera S, García P (2000) Incidencia, severidad y efecto sobre el peso de la mazorca de maíz (*Zea mays L.*) de la mancha bandeada *Rhizoctonia solani*, en siembras comerciales en el estado Portuguesa. *V Jornadas Científicas Nacional del Maíz.* Guanare, Venezuela. p. 101.
- Cardona R, Rodríguez H, Nass H (1999) Manchas bandeadas en maíz causadas por *Rhizoctonia solani* en Portuguesa, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 12: 32-33.
- Carling D, Summer D (1992) *Rhizoctonia*. En Singleton LL, Mihail JD, Rush CM (Eds.) *Methods for research on soil-borne phytopathogenic fungi.* The American Phytopathological Society. St. Paul, MN, EEUU. pp. 155-165.
- Cedeño L, Nass H, Carrero CH, Cardona R, Rodríguez H, Alemán L (1996) *Rhizoctonia solani* AGI-1A, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 9: 6-9.
- Da Silveira SF, Alfenas AC, Ferreira FA, Sutton JC (2000) Characterization of *Rhizoctonia* species associates with foliar necrosis and leaf scorch of clonally-propagated eucalyptus in Brazil. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 27-36
- De León C (1995) Banded leaf and sheath blight of maize. The situation in Asia. *FLCGNET Newsletter* 33: 5-6.
- Dodman R, Barker K, Walker J (1968a) Modes of penetration by different isolates of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol-*

- ogy 58: 31-33.
- Dodman R, Barker K, Walker J (1968b) A detailed study of the different modes of penetration by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 58: 1271-1276.
- Fontana H, González C (2000) El cultivo de maíz en Venezuela. 1ª ed. Fundación Polar. Caracas, Venezuela. 530 pp.
- Hernández A, Galindo I, Sánchez B, Pineda J, Barrientos V, González A, Gil E (2003a) Amplificación de rADN y posterior análisis del producto de digestión como un método de identificación de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*. I Cong. Venez. Mejoramiento y Biotecnología Agrícola. Maracay, Venezuela.
- Hernández A, Galindo I, Sánchez B, Pineda J, González A, Gil E (2003b) Identificación de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* mediante rDNA, ITS en diferentes aislados provenientes de las zonas productoras de maíz en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 16: 57.
- Johansen D (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill. Londres, RU. 523 pp.
- Marchall D, Rush M (1980) Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 947-950.
- Nass H, Rodríguez H (1994) Efecto de la lamina de agua y la densidad de siembra sobre el desarrollo de *Rhizoctonia solani* en arroz. *Bioagro* 6: 31-34.
- Ogoshi A (1987) Ecology and pathogenicity of anastomosis intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 125-143.
- Papavizas G (1970) Colonization and growth of *Rhizoctonia solani* in soil. En Parmeter J Jr (Ed.) *Rhizoctonia solani Biology and Pathology*. University of California Press. Berkeley, CA, EEUU. pp. 108-121.
- Parmeter J, Whitney H (1970) Taxonomy and nomenclature of the perfect stage. En Parmeter J Jr (Ed.) *Rhizoctonia solani Biology and Pathology*. University of California Press. Berkeley, CA, EEUU. pp. 7-19.
- Vidhasekaran P, Ponmalar R, Samiyappan T, Velazhahan R, Vimala R, Ramanathan V, Muthukrishnan S (1997) Host-specific toxin production by *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Phytopathology* 87: 1258-1263.
- Zambrano C, Molina N, Cabrera S (2002) *Manejo integrado de la mancha bandeada (Rhizoctonia solani Kühn) de la hoja del maíz*. INIA-CIAE Portuguesa, Venezuela.