



**Tesis para optar el título de Doctor de la Universidad Nacional del
Nordeste, Area Recursos Naturales**

**Monitoreo de enfermedades en semillas de arroz: detección,
cuantificación y transmisión de
Alternaria padwickii y *Microdochium oryzae***

Ing. Agr. Susana Alejandra Gutiérrez

Director: Ing. Agr., M. Sc., Ph.D. Erlei Melo Reis
Facultade de Agronomía y Veterinaria, Universidade de Passo
Fundo, Passo Fundo-Brasil

Co-director: Ing. Agr. M. Sc., Marcelo Aníbal Carmona
Facultad de Agronomia, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires

AÑO 2010

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de la Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, lugar donde se desarrolló el presente trabajo de tesis y a todo su personal docente.

Al profesor Erlei, por su atención y dedicación.

Al Ing. Agr. Marcelo Carmona por sus aportes y enseñanzas.

A todo el personal del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Passo Fundo (PF, Brasil) por su apoyo y colaboración desinteresada en la realización de parte del trabajo de tesis y en especial a la Bióloga Cinara Cardoso Andrade.

A mi familia.

ABREVIATURAS

ACPA Asociación Correntina de Plantadores de Arroz
APD Agar papa dextrosado
APG Agar papa glucosado
AEM Agar extracto de malta
AP Agar poroto
cc Centímetros cúbicos
cm Centímetros
CT Control térmico
DDS Días después de la siembra
ET Eficiencia de transmisión
FS Suspensión – Terápico para semillas
g Gramos
i.a. Principio activo
ISTA International Seed Testing Association
ha Hectárea
h Horas
kg Kilogramos
mL Mililitros
m μ Micras
PG Poder germinativo
PF Papel de filtro
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
ppm Partes por millón
R4 Embuchamiento (estado de desarrollo de la planta de arroz)
SC Suspensión concentrada
UV Ultravioleta
v Vigor
tn Toneladas
TQ Tratamiento químico
TT Tratamiento térmico
TTQ Tratamiento térmico químico

INDICE

	PAGINAS
LISTA DE CUADROS	7
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	15
CAPITULO 1. INTRODUCCION	18
1.1. El arroz (<i>Oryza sativa</i>)	18
1.2. El cultivo de arroz en Argentina	18
1.3. Enfermedades del cultivo de arroz	21
1.4. Sanidad de la semilla de arroz	23
1.5. Detección de patógenos en semillas de arroz	27
1.6. Transmisión de patógenos desde la semilla de arroz a los órganos aéreos	29
1.7. Control de patógenos en semillas	32
1.7.1. Tratamiento de semillas	33
1.7.2. Tratamiento químico	34
1.7.3. Tratamiento físico (termoterapia)	35
1.7.4. Control químico de patógenos en semillas de arroz	36
1.8. OBJETIVOS	38
1.9. HIPOTESIS	39
CAPITULO 2. REVISION DE BIBLIOGRAFIA DE LA ALTERNARIOSIS DEL ARROZ (<i>Alternaria padwickii</i>)	42
2.1. Antecedentes y ocurrencia	42
2.2. Antecedentes en Argentina	43
2.3. Sintomatología	43
2.3.1. Síntomas	43
2.3.2. Etiología	44
2.4. Supervivencia y fuentes de inóculo primario	45
2.5. Condiciones ambientales	45
2.6. Transmisión	46
2.7. Control	46
CAPITULO 3. DETECCIÓN DE <i>Alternaria padwickii</i> EN SEMILLAS DE ARROZ	50
3.1. Introducción	50
3.2. Materiales y métodos	51
3.3. Resultados y discusión	52
3.4. Conclusiones	54
CAPITULO 4. TRANSMISIÓN DE <i>Alternaria padwickii</i>	60
4.1. Introducción	60
4.2. Materiales y métodos	61
4.3. Resultados y discusión	62
4.4. Conclusiones	67
CAPITULO 5. METODOS PARA EL CONTROL DE <i>Alternaria padwickii</i> EN SEMILLAS DE ARROZ	68

5.1. Introducción	69
5.2. Materiales y métodos	70
5.2.1. Experimento 1. Tratamiento químico de semillas	70
5.2.2. Experimento 2 a) Tratamiento de semillas con termoterapia y b) Tratamiento de semillas con fungicida asociado a termoterapia	71
5.3. Resultados y discusión	72
5.3.1. Experimento 1. Tratamiento químico de semillas	72
5.3.2. Experimento 2. a) Tratamiento de semillas con termoterapia y b) Tratamiento de semillas con fungicida asociado a termoterapia	75
5.4. Conclusiones	80
CAPITULO 6. REVISION DE BIBLIOGRAFIA DE LA ESCALDADURA DE LA HOJA DEL ARROZ (<i>Microdochium oryzae</i>)	81
6.1. Antecedentes y ocurrencia	81
6.2. Antecedentes en Argentina	82
6.3. Sintomatología	82
6.3.1. Síntomas	82
6.3.2. Etiología	84
6.4. Penetración y germinación	86
6.5. Supervivencia y fuentes de inóculo primario	87
6.6. Condiciones ambientales	87
6.7. Transmisión	88
6.8. Control	88
CAPITULO 7. DETECCION DE <i>Microdochium oryzae</i> EN SEMILLAS DE ARROZ	90
7.1. Introducción	90
7.2. Materiales y métodos	91
7.3. Resultados y discusión	92
7.4. Conclusiones	95
CAPITULO 8. TRANSMISION DE <i>Microdochium oryzae</i>	100
8.1. Introducción	100
8.2. Materiales y métodos	101
8.3. Resultados y discusión	101
8.4. Conclusiones	103
CAPITULO 9. METODOS PARA EL CONTROL DE <i>Microdochium oryzae</i> EN SEMILLAS DE ARROZ	105
9.1. Introducción	105
9.2. Materiales y métodos	106
9.2.1. Experimento 1. Tratamiento químico de semillas de dos variedades de arroz	106
9.2.2. Experimento 2 a) Tratamiento de semillas con termoterapia y b) Tratamiento de semillas con fungicida asociado a termoterapia	107
9.3. Resultados y discusión	108
9.3.1. Experimento 1. Tratamiento químico de semillas de dos variedades de arroz.	108
9.3.2. Experimento 2 a) Tratamiento de semillas con termoterapia y b)	111

Tratamiento de semillas con fungicida asociado a termoterapia
9.4. Conclusiones

CAPITULO 10. DISCUSIÓN GENERAL	116
BIBLIOGRAFIA	124

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
	CAPITULO 1	
1	Enfermedades fúngicas determinadas en la región del nordeste argentino (Mazzanti de Castañón y Gutiérrez de Arriola, 2001, Rigonatto y Cúndom, 2006)	40
2	Porcentaje de hongos detectados en semillas de arroz, analizadas durante el periodo comprendido entre 1998-2002..	41

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
	CAPITULO 1	
1	Detalle de la producción arroceras en toneladas y en porcentaje por provincias productoras argentinas (estimado al 11/06/09).	19
	CAPITULO 2	
1	Síntomas de la alternariosis en hoja de arroz desarrollados en condiciones de infección natural en cultivos de la provincia de Corrientes. Desarrollo de esclerocios sobre la lesión.	47
2	Síntomas (manchas) y signos (esclerocios) de alternariosis en láminas foliares de cultivos de arroz de la provincia de Corrientes, próximos a maduración, causados por <i>Alternaria padwickii</i> .	47
3	Esclerocios de <i>Alternaria padwickii</i> en láminas foliares de arroz, variedad Taim, en cultivos de la provincia de Corrientes.	48
4	Síntomas en glumas de granos de arroz procedentes de cultivos de arroz de la provincia de Corrientes, causados por <i>Alternaria padwickii</i> .	48
5	Conidios, conidióforos y esclerocio de <i>Alternaria padwickii</i> (Ellis, 1971, Ellis & Holliday, 1972).	49
	CAPITULO 3	
1	Desarrollo de micelio y esclerocios de <i>Alternaria padwickii</i> sobre plántula enferma de arroz.	55
2	Desarrollo de micelio y esclerocios de <i>Alternaria padwickii</i> sobre plántula enferma de arroz.	55
3	Esclerocios y micelio de <i>Alternaria padwickii</i> en coleóptilo de plántula de arroz.	56
4	Semilla de arroz sin germinar con desarrollo de micelio y esclerocios de <i>Alternaria padwickii</i> .	56
5	Conidios de <i>Alternaria padwickii</i> .	57
6	Conidióforos de <i>Alternaria padwickii</i> .	57
7	Esclerocios de <i>Alternaria padwickii</i> en raicillas de plántula de arroz.	57
8	Colonias de <i>Alternaria padwickii</i> en medio de agar papa glucosado.	58
9	Desarrollo de colonias de <i>Alternaria padwickii</i> en semillas de arroz de la variedad Fortuna, procedente de la localidad de	58

Perugorría, sembradas en medio de agar poroto

CAPITULO 4

- 1 Plántulas procedentes de semillas de arroz de la variedad Supremo 13 (con 29.5 % de infección de *Alternaria padwickii*), sembradas en sustrato compuesto por suelo: arena:turba. 67
- 2 Plántulas enfermas de arroz de la variedad Supremo 1 procedentes de semillas sembradas en sustrato con arena, con desarrollo de síntomas y signos causados por *Alternaria padwickii*. 67
- 3 Secciones de plántulas de arroz de la variedad Supremo 1, recuperadas a los 7 DDS, con desarrollo de síntomas. 68
- 4 Desarrollo de colonias de *Alternaria padwickii* en trozos de tejidos de plántulas de arroz, sembrados en medio con agar poroto. 68

CAPITULO 5

- 1 Tratamiento de semillas de arroz con termoterapia, 40, 50 y 60°C, 0 hora de inmersión, observándose menor infección del patógeno a 60°C. 76
- 2 Efectos de diferentes temperaturas (y) y tiempos de inmersión (x) en la incidencia (z) de *Alternaria padwickii* en semillas de arroz, expresado como superficie de respuesta. 77
- 3 Efecto del tratamiento de semillas con el fungicida iprodione (100cc. 100⁻¹ kg de semillas) sometido a diferentes temperaturas (y) y tiempos de inmersión (x) en la incidencia (z) de *Alternaria padwickii*, expresada como superficie de respuesta. 79
- 4 Tratamiento combinado de fungicida (iprodione) y termoterapia, 40° C (0, 1 y 2 horas de inmersión) en semillas de arroz, para evaluar el control de *Alternaria padwickii*. 79
- 5 Tratamiento combinado de fungicida (iprodione) y termoterapia, 50° C (0, 1 y 2 horas de inmersión) en semillas de arroz, para evaluar el control de *Alternaria padwickii*. 80
- 6 Tratamiento combinado de fungicida (iprodione) y termoterapia, 60° C (0, 1 y 2 de horas de inmersión) en semillas de arroz, para evaluar el control de *Alternaria padwickii*. 80

CAPITULO 6

- 1 Síntomas de la escaldadura de la hoja en cultivos de arroz de la provincia de Corrientes, observados en condiciones de infección natural. 84
- 2 Hifas, células conidiógenas y conidios de *Microdochium oryzae* (Sivanesan, 1982). 86

CAPITULO 7

- 1 Muerte de raicilla y coleóptilo de semilla de arroz, causado por *Microdochium oryzae*. 96
- 2 Síntomas en semillas de arroz sembradas en medio de agar poroto, causados por *Microdochium oryzae*. 97
- 3a Desarrollo de esporodoquios de *Microdochium oryzae* sobre semilla de arroz de la variedad Fortuna. 97
- 3b Desarrollo de esporodoquios y micelio de *Microdochium oryzae* sobre semillas de arroz. 97
- 4 Desarrollo de colonias de *Microdochium oryzae* en semillas de 98

	arroz, sembradas en agar poroto.	
5	Colonias de <i>Microdochium oryzae</i> en medio de agar papa glucosa.	98
6	Conidios de <i>Microdochium oryzae</i> .	98
7	Peritecios de <i>Monographella albescens</i> en láminas foliares de arroz.	99
8	Ascosporas de <i>Monographella albescens</i> .	99
	CAPITULO 8	
1	Trozo de tejido de coleoptilo de arroz sembrado en medio de agar poroto, colonizado por <i>Microdochium oryzae</i> (desarrollo de micelio y esporodoquios).	103
	Esporodoquios de <i>Microdochium oryzae</i> sobre ápice foliar de plántulas de arroz inoculadas y sembrada en medio de AP.	104
	Síntomas de escaldadura de la hoja en plántulas de arroz, inoculadas con <i>Microdochium oryzae</i> .	104
	CAPITULO 9	
1	Efecto de diferentes temperaturas (y) y tiempo de inmersión (x) en la incidencia (z) de <i>Microdochium oryzae</i> en semilla de arroz.	113
2	Efecto del tratamiento de semillas con el fungicida iprodione sometido a diferentes temperaturas (y) y tiempos de inmersión (x) en la incidencia (z) de <i>Microdochium oryzae</i> , expresado como superficie de respuesta.	114

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
	CAPITULO 3	
1	Sensibilidad de distintos métodos en el porcentaje de incidencia de <i>Alternaria padwickii</i> en semillas de variedades de arroz de diferentes localidades de la provincia de Corrientes.	59
	CAPITULO 4	
1	Porcentaje de transmisión de <i>Alternaria padwickii</i> desde semillas a plántulas de arroz en suelo:arena:turba en base a sintomatología y recuperación del patógeno desde tejido asintomático.	63
2	Porcentaje de transmisión de <i>Alternaria padwickii</i> desde semillas a plántulas de arroz en arena en base a sintomatología y recuperación del patógeno desde tejido sintomático.	64
	CAPITULO 5	
1	Efecto de fungicidas en el control de <i>Alternaria padwickii</i> en semillas de arroz de la variedad Supremo 1.	
2	Efecto del tratamiento de semillas de arroz, con diferentes temperaturas (°C) y tiempos de inmersión (horas), en la incidencia expresada en porcentaje de <i>Alternaria padwickii</i> .	75
3	Efecto del tratamiento en porcentaje de semillas de arroz con iprodione (100cc.100 ⁻¹ kg de semillas) combinado con diferentes temperaturas (°C) y tiempos de inmersión (horas),	76

sobre la incidencia de *Altenaria padwickii*.

CAPITULO 7

- | | | |
|---|---|----|
| 1 | Incidencia de <i>Microdochium oryzae</i> en semillas de arroz, variedad Fortuna, con diferentes métodos de aislamiento. | 94 |
| 2 | Incidencia (%) de <i>Microdochium oryzae</i> en semillas de arroz de diferentes variedades y localidades, analizadas mediante el método de agar poroto. | 96 |

CAPITULO 9

- | | | |
|---|---|-----|
| 1 | Efecto de fungicidas en el control de <i>Microdochium oryzae</i> en semillas de arroz de la variedad Taim, con 5% de incidencia. | 109 |
| 2 | Efecto de fungicidas en el control de <i>Microdochium oryzae</i> en semillas de arroz de la variedad Supremo 13, con 22% de incidencia. | 111 |
| 3 | Efectos del tratamiento a diferentes temperaturas (°C) y tiempos de de inmersión (horas) sobre la incidencia de <i>Microdochium oryzae</i> . | 113 |
| 4 | Efectos del tratamiento en por ciento de semillas con iprodione (100cc.100 ⁻¹ Kg/semillas) a diferentes temperaturas (°C) y tiempos de inmersión (horas) sobre la incidencia de <i>Microdochium oryzae</i> . | 114 |

RESUMEN

MONITOREO DE ENFERMEDADES EN SEMILLAS DE ARROZ: DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y TRANSMISIÓN DE *Alternaria padwickii* Y *Microdochium oryzae*

La semilla de arroz procedente de la provincia de Corrientes, Argentina, es portadora de hongos patógenos que producen enfermedades de importancia en la región. Entre estos patógenos se destacan *Alternaria padwickii* (D. Ganguly) M.B. Ellis (Dematiaceae) y *Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) Samuels & Hallet (Insertae Sedis). El hongo *A. padwickii* es el agente causal de la alternariosis o mancha foliar del arroz y puede afectar semillas, hojas y panojas de arroz. *M. oryzae* es causante de la escaldadura de la hoja del arroz y ocasiona síntomas en hojas, vainas foliares y granos de arroz. Los dos patógenos son hongos necrotróficos y sobreviven en semillas y rastrojos del cultivo. Considerando la importancia creciente que han adquirido las dos enfermedades en los últimos años, los objetivos de esta investigación fueron comparar métodos para la detección de *A. padwickii* y *M. oryzae* en las semillas de arroz, cuantificar su transmisión desde las semillas hacia plántulas de arroz y evaluar el tratamiento químico, térmico y térmico-químico aplicado a las semillas, a fin de lograr la erradicación de los dos patógenos. En ensayos conducidos en laboratorio, se compararon cuatro métodos de detección a fin de seleccionar uno que permita su rápida identificación en semillas: a) Papel de filtro, b) Agar papa glucosado (APG), c) Agar poroto (AP) y d) Agar extracto de malta (AEM). Para la detección de *A. padwickii* se utilizaron 20 muestras de semillas de diferentes variedades de arroz procedentes de la provincia de Corrientes. Con respecto a *M. oryzae*, la comparación de métodos se realizó con una sola variedad de arroz; posteriormente se utilizó el método que resultó de mayor sensibilidad, para realizar un relevamiento sanitario de semillas, analizando 18 muestras de diferentes variedades de arroz, naturalmente infectadas con *M. oryzae*. Los datos de porcentajes de incidencias obtenidos, fueron sometidos al análisis de la varianza y las medias comparadas por el test de Tukey. Para los estudios de transmisión de *A. padwickii* desde las semillas hacia plántulas de arroz se realizaron dos experimentos, utilizando semillas con infección natural: a) siembra de semillas en macetas con una mezcla de suelo:arena:turba (1:1:1) esterilizado (mantenidas en invernáculo a 25-30°C) (variedades Supremo 13 y CT 6919); y b) siembra en bandejas plásticas con arena esterilizada (en laboratorio, 12 h luz 12 h

oscuridad) (variedades Supremo 1 y Fortuna). La evaluación de plántulas enfermas y la eficiencia de transmisión (ET) del hongo, fueron realizadas a los 7, 11, 20 y 30 días después de la siembra (DDS). En cada momento se recolectaron al azar 200 plántulas, las cuales fueron lavadas en agua de canilla y posteriormente se cortaron trozos de tejidos para ser sembrados en medio de AP. La transmisión de *M. oryzae* se cuantificó en plántulas a los 15 y 30 DDS, desarrolladas en sustrato suelo:arena:turba en condiciones de invernáculo, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Para evaluar medidas de control, se realizaron los siguientes tratamientos en semillas de arroz: a) tratamiento químico (TQ), cuyos fungicidas y dosis utilizadas en g i.a.100 kg⁻¹ de semilla fueron: carbendazim (100 y 200 cc), carbendazim + tiram (150 y 300 cc), carboxin + tiram (250 cc), iprodione (100 cc), iprodione + triticonazole (100 + 25 cc) y tebuconazole (42 cc); b) tratamiento térmico (TT) (40, 50 y 60°C, con 0, 1 y 2 h de inmersión), y c) una combinación de tratamiento térmico (40, 50 y 60°C, con 0, 1 y 2 horas de inmersión) y químico (iprodione 100 cc) (TTQ). En todos los tratamientos se determinó la incidencia del patógeno y el porcentaje de control; en los TT y TTQ se determinó además, el poder germinativo (PG) y vigor (V) de las semillas. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de la varianza y prueba de Tuckey al 5% de probabilidad. El medio con AP resultó ser el más sensible para la detección de *A. padwickii*, registrándose valores de 3.6 a 76% de incidencia y 100% de prevalencia en todas las muestras analizadas; en las semillas enfermas el patógeno causó disminución o inhibición de la germinación, muerte de raicillas, coleóptilos o plántulas. El hongo *M. oryzae* fue detectado con valores de hasta 55% de incidencia en semillas de arroz y con 90% de prevalencia. Los síntomas observados en las semillas fueron inhibición de la germinación, o muerte de raicillas y coleóptilos. Con respecto a la transmisión, *A. padwickii* fue transmitido desde las semillas a las plántulas con y sin síntomas, en todos los momentos de evaluación. La ET en invernáculo fue de 49 y 6.7% para la variedad Supremo 13, y de 7.2 y 51% para la variedad CT 6919 a los 11 y 30 DDS; mientras que en condiciones de laboratorio, Supremo 1 presentó 87.5 y 30% de ET, en tanto que en la variedad Fortuna fue de 18.8 y 17.6% a los 7 y 20 DDS respectivamente. El sustrato con arena estéril permitió que la transmisión de *A. padwickii* sea sintomática. En cuanto a la transmisión de *M. oryzae*, se observó que a partir de semillas de arroz con 55% de incidencia del patógeno, la ET fue de 2.18%, en plántulas asintomáticas a los 30 DDS, no observándose transmisión del patógeno a los 15 DDS. De los experimentos realizados

para el control de *A. padwickii*, se observó que de los fungicidas probados los más eficaces fueron iprodione, iprodione + triticonazole y tebuconazole, los cuales redujeron su incidencia de 40% en el testigo, a 2.75, 6, y 8% respectivamente. Con respecto al TT y TTQ, con las temperaturas 40, 50 y 60° C y su interacción con los tres tiempos, se observaron diferencias significativas en la incidencia del patógeno; su erradicación se obtuvo en el TT a 60° C, a las 2 horas de inmersión, mientras que en TTQ, la erradicación fue en igual temperatura pero a partir de 1 hora de inmersión. En cuanto a *M. oryzae*, debido a que el TQ se evaluó en dos variedades de arroz (Taim y Supremo 13), la eficacia de los fungicidas carbendazim + tiram (en las dosis 300 cc y 150 cc.100 kg⁻¹), carbendazim (300 cc.100 kg⁻¹), iprodione + triticonazole y carboxin + tiram, fue diferente según las variedades e incidencia del patógeno en las semillas; no obstante se obtuvo un control de 100% en la variedad Taim, a diferencia de lo observado en la variedad Supremo 13, en la cual el porcentaje de control del hongo, varió entre 77-70% entre los fungicidas que mejor respondieron al tratamiento. También se observó que el tratamiento combinando iprodione + triticonazole sobre las semillas de arroz tuvo un comportamiento diferente según las variedades y la incidencia de *M. oryzae* en las semillas, el cual permitió un control de 100% para la variedad Taim (con 5% de incidencia), mientras que para la variedad Supremo 13, con 22% de infección, solamente se obtuvo un control de 54%. Con respecto a los TT y TTQ, a 50° C y 60° C, se obtuvo la erradicación del patógeno presente en las semillas, pero con disminución en el PG. Mediante los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que: a) la utilización de un método de análisis de semillas *in vitro*, sensible como el agar poroto, permitió detectar la presencia de los patógenos *A. padwickii* y *M. oryzae*, y determinar que ambos poseen una amplia distribución en la región de cultivo de la provincia de Corrientes; b) en ensayos de relevamientos de sanidad de semillas, cuantificación de la transmisión y de control, se debería usar el medio de AP; c) los estudios de transmisión realizados constituyen la primera evidencia en Argentina sobre el pasaje de *A. padwickii* y de *M. oryzae* a partir de semillas infectadas hacia las plántulas de arroz; d) se demostró que la semilla de arroz infectada puede constituirse en una importante fuente de inóculo para las enfermedades que ocasionan; e) existen diferencias en la eficiencia de control de los dos patógenos en estudio, de acuerdo a los fungicidas utilizados, y f) es necesario continuar con la investigación sobre transmisión y analizar la posibilidad de utilizar otros principios

activos con diferentes dosis, con el objeto de lograr la erradicación de los dos patógenos presentes en las semillas de arroz.

Palabras claves: *Oryza sativa*, análisis de semillas, alternariosis, escaldadura de la hoja, transmisión, tratamiento de semillas.

ABSTRACT
MONITORING OF RICE SEEDS DISEASES: DETECTION,
QUANTIFICATION AND TRANSMISSION OF *Alternaria padwickii* AND
Microdochium oryzae

Rice seeds from Corrientes Province, Argentina, carry pathogenic fungi that cause important diseases in the region. Among these pathogens are *Alternaria padwickii* (D. Ganguly) M.B. Ellis (Dematiaceae) and *Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) Samuels & Hallet (Insertae Sedis). The fungus *A. padwickii*, causal agent of *Alternaria* leaf spot, was detected in rice seeds, leaves and grain spots. *M. oryzae*, causes rice leaf scald and it causes symptoms on rice leaves, sheaths and grains. Both fungi are necrotrophic pathogens and seedborne. They survive on seeds and old rice straw and causes infection in the next season. Considering the importance acquired by these diseases in the last years, the objectives of the present work were to compare methods to detect *A. padwickii* and *M. oryzae* on rice seeds, to evaluate its transmission from infected seeds to seedlings and to evaluate chemicals, thermal and thermal-chemical seeds treatments, in order to eradicate both pathogens. Four detection methods were compared in laboratory tests, to select the best method a way to quick identification of the fungus in seeds. The methods were: a) blotter test (BT) b) potato glucose agar (PGA), c) bean agar (BA), d) malt extract agar (MEA). Twenty seed samples of different varieties of rice were analyzed in the assays from different localities of Corrientes, Argentina. In the case of *M. oryzae*, four seed health methods (BT, PGA, BA, MEA) were evaluated to detect of fungus on rice seed, Fortuna variety, from Perugorria, Corrientes. Then, the method that showed the greatest sensitivity was used to analyze seeds from the localities previously mentioned, by analysing 18 samples of different rice varieties. Data of seeds incidence were submitted to analysis and the averages were compared by the Tuckey test. Two experiments were carried out for the studies of *A. padwickii* transmission from rice seed to seedlings: seed sowing in pots with a sterile mixture of soil:sand:peat (1:1:1) (kept in greenhouse at 25-30° C) (Supremo 13 and CT 6919 varieties), the another seed sowing in plastic trays with sterile sand (in laboratory, 12 hours of light and 12 hours of darkness) (Supremo 1 and Fortuna varieties). Evaluation of diseased seedlings and the fungus transmission efficiency (TE) were made at 7, 11, 20 and 30 days after sowing (DAS). Each time, 200 seedlings were collected randomly, washed in tap water and pieces of tissue were

cut and sown in a BA media. The transmission of *M. oryzae* was quantified on seedlings 15 and 30 DAS. They were developed in soil:sand:peat (1:1:1) under greenhouse conditions, following the same procedure described above. In order to evaluate the measures to control for both pathogens, the following treatments were conducted: chemical treatment (CT), the fungicides and doses used in g i.a. 100 kg⁻¹ of seed were: carbendazin (100 and 200 cc), carbendazin + thiram (150 and 300 cc), carboxymide + thiram (250 cc), iprodione (100 cc), iprodione + triticonazole (100 + 25 cc) and tebuconazole (42 cc); thermal treatment (TT) (40, 50 and 60° C with 0.0, 1.0 and 2.0 hours of immersion; and a combination of thermal treatment (40, 50 and 60° C with 0.0, 1.0 and 2.0 immersion hours) plus chemical treatment (iprodione 100 cc) (CTT). In the experiment CT, the seeds were sown in the BA media and they were incubated from 8 to 10 days with a 12-hour-photoperiod, whereas for TT and CTT the treated seeds were sown on a selective Reis medium for 15 days. Incidence and the percentage of control of pathogens were determined; TT and CTT, seeds germination and vigor were also determined. Data obtained were subjected to the ANOVA and the Tuckey test at 5% of probability. All tested methods allowed to detect both pathogens studied in rice seeds. However, the BA was the most sensitive for their detection. The highest incidences of *A. padwickii* were observed in the seeds sown in BA, with values from 3.6 to 76% incidence and prevalence of 100% in all the samples. In seeds the pathogen caused a decreased or inhibited germination, death of roots, coleoptiles or seedlings. The fungus *M. oryzae* was detected with 0-55% incidence in rice seeds and 90% prevalence. The symptoms observed were inhibition of seed germination or root and coleoptile death. *A. padwickii* was transmitted from seed to seedling with and without symptoms at all times of evaluation. TE in the greenhouse was 49 and 6.7% for the Supremo 13 variety and 7.2 and 5% for the CT 6919 variety in 11 and 30 DAS. In laboratory conditions, Supremo 1 presented 87.5 and 30% of TE; and the Fortuna variety showed 18.8 and 17.6% in 7 and 20 DAS respectively. The sterile sand substratum allowed a symptomatic transmission of *A. padwickii*. Regarding the transmission of *M. oryzae* was observed that from rice seeds with 55% of the pathogen incidence, TE was 2.18% in symptomless seedlings, 30 DAS. However, there was no pathogen transmission 15 DAS. Studies of *A. padwickii* control, was showed that from all fungicides tested, the most effective were iprodione, iprodione + triticonazole and tebuconazole, which decrease its incidence from 40% to 2.75; 6; and 8% respectively. With respect to TT and CTT with temperatures of 40, 50

and 60° C there were significant differences in the incidence of the pathogen; its eradication was achieved in TT at 60° C after 2.0 hours immersion. However, seed germination were 0.0%. Whereas in CTT the eradication took place at the same temperature after 1.0 hour immersion, seed germination were 0.0%. In the case of *M. oryzae*, the fungicides carbendazin + thiram (300 cc and 150 cc. 100 kg⁻¹), carbendazin (300 cc.100 kg⁻¹), iprodione + triticonazole and carboxin + thiram showed a 100% control for variety Taim; while for variety Supremo 13 the control was 70-77%. However, in the treatment with iprodione + triticonazole on rice seeds there was a different behavior depending on the rice variety and the incidence of *M. oryzae* in seeds. It turned to be very efficient for the Taim variety (5% incidence) achieving 100% control whereas it was only obtained a 54% control on the Supremo 13 variety with 22% of infection. The fungus eradication was achieved in thermal range of 50 to 60° C (TT and CTT); however seed germination and vigor were affected. The results obtained in the present study we determined that: the use of a sensitive and efficient analysis method of *in vitro* seeds such as BA revealed that the pathogens *A. padwickii* and *M. oryzae* are widely distributed in the rice growing regions of Corrientes Province; in seeds monitoring tests, control and quantification of transmission, BA should be used preferably; these studies into the transmission of *A. padwickii* and *M. oryzae* from infect rice seeds to seedlings are the first evidence in Argentina this subject; infect rice seeds can become a major source of inoculum for the diseases; e) there are differences in the efficiency of control of both pathogens under study according to the fungicides used; therefore, further studies are needed to research the influence of factors in the seed transmission process and the use of other active ingredients with different doses to achieve the eradication of pathogens in rice seeds.

Key words: *Oryza sativa*, seed health testing, alternaria leaf spot, leaf scald, transmission, seed treatment.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. El arroz (*Oryza sativa* L.)

El arroz tiene una destacada importancia en la alimentación humana, pues es la principal fuente de calorías para una gran parte de la población mundial, además de tener gran importancia socio-económica, particularmente en Asia, donde más del 90% de todo el arroz cultivado es consumido por aproximadamente el 60% de la población mundial. En el continente asiático se encuentran los principales países productores, consumidores, importadores, exportadores y el mayor consumo por persona; aunque, actualmente existen numerosos países de occidente que cultivan arroz en aquellas áreas ubicadas en zonas tropicales húmedas y subhúmedas, en las que también constituye su principal fuente de alimento; es considerado el cereal de los países en desarrollo (<http://www.sagpya.mecon.gov.ar>). Es el segundo cereal de importancia para la alimentación después del trigo, considerando la superficie cosechada, pero si se lo considera desde el punto de vista alimenticio, el arroz proporciona más calorías por hectárea que cualquier otro cereal. Solo en Asia, alrededor de 2 mil millones de personas obtienen del 60 al 70% del consumo de energía con el arroz y sus derivados; es la fuente de alimento con crecimiento más rápido en África y de gran importancia para un mayor número de países, de escasos ingresos y de sostenido déficit alimentario (Webster & Gunnell, 1992).

1.2. El cultivo de arroz en Argentina

En Argentina, la producción de arroz proviene de la región nordeste donde el área de siembra de la especie se encuentra en expansión. La superficie sembrada nacional para la presente campaña 2008-2009, fue de 218.083 ha, lo que implica un incremento de unas 23.362 ha o un 13% respecto a la superficie sembrada en la campaña anterior. La provincia de Corrientes, con 90.811 ha, representa el 41.64% de la superficie a nivel nacional, por lo que se constituye en la principal provincia arrocera del país. Le siguen en importancia las provincias de Entre Ríos, Santa Fe, Formosa y Chaco, con participaciones del 39.90%, 13.21%, 2.67% y 2.59% respectivamente, en la superficie total destinada al cultivo de arroz en el país. Los mayores incrementos absolutos se dieron en las provincias de Entre Ríos y Santa Fe, con 12.320 y 5.227 ha adicionales en esta campaña respecto a la anterior. El aumento en la superficie arrocera de Entre Ríos fue consecuencia del traspaso de áreas dedicadas en los últimos años al cultivo de soja y otros hacia la siembra de arroz,

principalmente debido a la mejora relativa del negocio experimentada durante el último año. Respecto a Santa Fe, con 26.820 ha, alcanzó en esta campaña la mayor superficie de siembra de su historia. Por otro lado, Corrientes aumentó la superficie dedicada al cultivo en 2.236 ha, número que probablemente hubiese sido mayor si las represas de reservas con agua, se recuperaban con anterioridad. En cambio, Formosa y Chaco experimentaron importantes incrementos relativos respecto a la campaña anterior; la primera, con un aumento del 54%, es la de mayor crecimiento relativo. Por su parte, Chaco, creció en superficie un destacable 31%. En referencia a la producción nacional, ésta manifestó un importante aumento respecto a la campaña pasada, alcanzando en la presente 1.396.705 tn. En el orden provincial, las principales productoras, Entre Ríos con 595.905 tn, y Corrientes con 540.600 tn, engloban más del 80% de la producción total (Figura 1). Por su parte, la provincia de Santa Fe se consolida como tercera productora, con 188.200 tn, correspondiente al 13.47% del total nacional. Por último, Chaco y Formosa también aumentaron su producción respecto a la campaña anterior, con 37.000 y 35.000 tn cada una (Asociación Correntina de Plantadores de Arroz, ACPA, <http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar>).

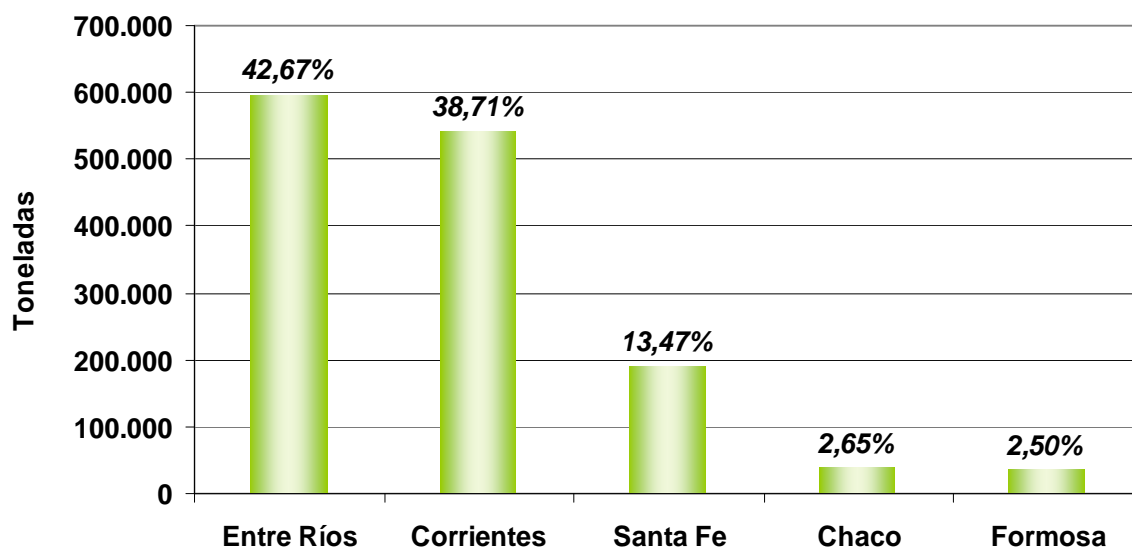


Figura 1. Detalle de la producción arroceras en toneladas y en porcentaje por provincias productoras argentinas (estimado al 11/06/09).

Una de las particularidades de la producción arroceras es que se requiere del riego. En nuestro país el sistema que se aplica es el riego por inundación, por lo que se necesitan de grandes volúmenes de agua, la que es provista en las provincias

productoras por diferentes fuentes, según los recursos existentes. En las zonas arroceras de la provincia de Entre Ríos se riega principalmente por bombeo de agua de pozo, mientras que en la provincia de Corrientes se realiza por medio de represas, o por bombeo de agua de río. El uso de represas ha adquirido notable relevancia en las nuevas áreas, como el centro y este de Corrientes y noreste de Entre Ríos.

En la provincia de Corrientes, el arroz es en la actualidad el cultivo anual de mayor importancia geográfica y se cultiva en 22 departamentos; en solo tres de los cuales Mercedes, Curuzú Cuatiá y Paso de los Libres se concentra el 50.9% de la superficie, con predominio de riego por represas y un alto nivel tecnológico. La mitad restante se distribuye en 19 departamentos de la provincia, de los que se destacan Berón de Astrada, San Miguel, Lavalle, Santo Tomé, San Martín y San Roque, con porcentajes de ocupación por superficie de 4 a 6%. Las arroceras se encuentran implantadas en diferentes agroecosistemas y las fuentes de riego, las tecnologías de manejo y las variedades utilizadas por los productores son muy diferentes, originando las más variadas respuestas en los rendimientos de arroz cáscara (Ligier *et al.*, 2004).

La actividad arroceras es una de las más importantes y dinámicas en la provincia de Corrientes, por el área destinada al cultivo, el valor de la producción agrícola y la ocupación de mano de obra. La producción arroceras moviliza grandes capitales con amplia gravitación en la economía provincial y derivaciones sociales y económicas, por tratarse de una de las pocas producciones primarias que es procesada en diverso grado, generando un importante efecto multiplicador. En los últimos 15 años se registró un importante incremento en los rendimientos debido tanto a la utilización de variedades más productivas, como a mejoras en la aplicación de tecnología. Se dispone de un paquete tecnológico básico que hace que los rendimientos promedios provinciales estén alrededor de las 6 tn.ha⁻¹, no muy lejos de los rendimientos en las áreas arroceras más desarrolladas del mundo. Sin embargo, es necesario seguir mejorando el sistema productivo, entre los que se destacan la necesidad de aumentar los rendimientos y la calidad de la producción.

Por otro lado, la provincia de Corrientes presenta ventajas comparativas para la producción arroceras: abundancia de tierras aptas para el cultivo, de bajo costo; disponibilidad de aguas superficiales con posibilidades de ser represadas; buenas condiciones ecológicas y ubicación geográfica muy cercana a los centros de destino (sur de Brasil). La producción arroceras provincial está orientada al mercado externo, exportándose alrededor del 65% del arroz producido. La situación del mercado

mundial con apertura de algunos mercados (ej. Japón y Corea), el incremento de la demanda por el crecimiento demográfico y la disminución de la producción en algunos países (ej. China), pronostican un importante déficit de arroz a nivel mundial en el mediano y largo plazo. Según estimaciones del Internacional Rice Research Institute (IRRI), la producción mundial de arroz deberá incrementarse en un 70% (unas 350 millones de tn de arroz cáscara) en los próximos 30 años a fin de abastecer el incremento de la demanda mundial. Existen escasas zonas en el mundo donde es posible aumentar la producción en base al incremento de área. América Latina y el noreste de nuestro país en particular, se incluyen entre dichas zonas. Por lo tanto las perspectivas de la región como productora de arroz son promisorias, pudiendo este cultivo convertirse en el motor del desarrollo provincial y regional. El desarrollo de sistemas de producción complementarios con la ganadería, permitirá potenciar ambos sistemas.

1.3. Enfermedades del cultivo de arroz

La planta de arroz desde la germinación hasta la madurez fisiológica, puede ser afectada por una o más enfermedades, las cuales pueden incidir en el rendimiento y/o calidad de la producción. Ou (1985), que revisó la bibliografía mundial sobre el tema hasta 1985, trata 64 enfermedades infecciosas y 4 de origen fisiológico; Webster & Gunnell (1992) complementaron el conocimiento hasta 1992, compendiando alrededor de 80 enfermedades bióticas y abióticas.

En varios países del mundo, el monocultivo extensivo de variedades de arroz de alto rendimiento, junto con nuevas prácticas de manejo más intensivas, han incrementado los rendimientos, pero también aumentaron la severidad de algunas enfermedades, que pueden provocar serias epidemias con importantes pérdidas de producción. Los daños producidos por las enfermedades pueden variar cada año, e incluso, de un cultivo a otro, dependiendo de las condiciones ambientales, de la susceptibilidad de las variedades y de las diferentes especies de hongos causales (Ou, 1985, Padwick, 1950, Webster & Gunnell, 1992).

El cultivo del arroz en Argentina es afectado por numerosas enfermedades producidas por hongos, que resultan ser patógenos importantes en diferentes zonas arroceras del mundo. En la región de cultivo del nordeste de Argentina (NEA), se comprobó que una gran proporción de estos agentes, causan enfermedades que revisten gran importancia por los efectos que ocasionan en la producción y los

rendimientos (Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1999, 2001, Rigonatto & Gutiérrez, 2006). Respecto a ésta problemática, dichos autores concluyeron que debido al escaso conocimiento de las enfermedades del arroz por parte del sector productor y/o técnico, el efecto de las mismas puede pasar desapercibido lo que en parte es consecuencia de la gran extensión de los arrozales y del sistema de cultivo con riego por inundación, que dificulta las observaciones; con frecuencia, la sintomatología de algunas enfermedades puede prestarse a confusión, requiriendo estudios de laboratorio para identificar el agente causal. De tal manera, destacaron la necesidad de un diagnóstico correcto de las enfermedades para la aplicación de las medidas de control correspondiente.

Durante los años 1960 y 1975, en la región del NEA, se identificaron dos enfermedades en el cultivo de arroz, el tizón o quemado (*Pyricularia grisea* Cav.) y el vaneó fisiológico (Mazzanti de Castañón, 1972). A mediados de la década de 1980, en la provincia de Corrientes se inició un cambio en las características regionales del cultivo, originado por varias causas, entre ellas, la introducción de variedades modernas de origen americano (USA) y tropical (semienanas), y variaciones en las tecnologías de producción (fertilización alta de nitrógeno, densidades de siembra elevadas, nuevas prácticas conservacionistas de suelo, empleo de herbicidas). En relación a esto, se observó la aparición de enfermedades no registradas anteriormente y el incremento de otras de importancia secundaria (Fortugno & Rossi, 1984, Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1989).

En relevamientos conducidos desde la campaña 1989/90 hasta 2005/2006, de cultivos comerciales de arroz, rastrojos, rebrotes y Ensayos Regionales de la Estación Experimental Agropecuaria, INTA Corrientes, Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola (1999, 2001) y Rigonatto & Gutiérrez (2006) detectaron la presencia de enfermedades producidas por hongos, algunas de ellas de importancia creciente. Seguidamente se mencionan las enfermedades identificadas (Cuadro 1): 1) tizón o quemado, *Pyricularia grisea* Cav. (anamorfo), *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) Yaegashi & Udagawa (teleomorfo); 2) escaldadura de la hoja, *Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) Samuels & Hallett (anamorfo), *Monographella albescens* Thümen (Thümen) Parkinson, Sivanesan & C. Booth (teleomorfo); 3) mancha foliar castaña angosta, *Cercospora oryzae* Miyake; 4) mancha castaña, *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi) Drechsler ex Dastur (teleomorfo), *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker (anamorfo); 5) carbón de la hoja, *Entyloma oryzae* H. y P.

Sidow; 6) alternariosis, *Alternaria padwickii* (D. Ganguly) M.B. Ellis; 7) podredumbre del tallo, *Magnaporthe salvinii* (Catt.) Krause & Webster (teleomorfo), *Nakataea sigmoidea* (Cav.) Hara (anamorfo conídico), *Sclerotium oryzae* Cav. (anamorfo esclerótico); 8) podredumbre de la vaina de la hoja bandera, *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams & Hawksw.; 9) mancha de la vaina, *Rhizoctonia oryzae* Ryker & Gooch; 10) tizón de la vaina, *Rhizoctonia solani* Kühn; 11) mancha agregada de la vaina, *Rhizoctonia oryzae-sativae* (Sawada) Mordue; 12) podredumbre de las vainas del cuello o pie, *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & Oliver var. *graminis*; 13) podredumbre castaño rojiza de la vaina, *Helicoceras oryzae* Linder & Tullis; 14) manchado del grano, varias especies de hongos asociados con el problema; 15) carbón del grano, *Tilletia barclayana* (Bref.) Sacc. & Syd.; 16) falso carbón, *Ustilagoidea virens* (Cooke) Takahashi; 17) decoloración de la vaina, *Pyrenochaeta oryzae* Shirai ex Miyake; y 18) podredumbre del tallo (*Sclerotium hydrophyllum* Saccardo) (Barrera *et al.*, 2005, Gutiérrez, 2002, 2004, 2005, 2006, 2007, Gutiérrez & Mazzanti de Castañón, 2002, Gutiérrez de Arriola & Mazzanti de Castañón, 1994, 1998, Gutiérrez *et al.*, 2000, 2002, 2005, Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1989, 1991, 1993, 1995, 1999, 2001, Mazzanti de Castañón *et al.*, 1994, 1997, Rigonatto & Gutiérrez, 2006).

1.4. Sanidad de la semilla de arroz

Según lo expresa la International Seed Testing Association (ISTA), la sanidad de la semilla se refiere principalmente a la presencia o ausencia de organismos causantes de enfermedades (hongos, bacterias y virus), y plagas animales (insectos). El 90% de los cultivos destinados a la producción de alimentos pueden sufrir algún tipo de enfermedad y la gran mayoría de sus agentes causales pueden ser transmitidos por la semilla. El nivel de daño causado por estos patógenos resulta muy variable, llegando a pérdidas del 50% de la cosecha en el caso de los cereales (Neergaard, 1979).

Un buen cultivo debe iniciarse con la siembra de semillas de alta calidad; entre los atributos relacionados con la calidad (pureza, poder germinativo, vigor), la sanidad debe ser considerada especialmente, ya que una semilla infectada por patógenos constituye una excelente fuente de diseminación y supervivencia, y está directamente relacionada con la continuidad del ciclo biológico de los patógenos de una generación a otra del hospedante. El proceso de colonización o infección de las semillas se presenta durante el desarrollo de la enfermedad en las inflorescencias, donde los

patógenos causan síntomas de manchas en las glumas o el endospermo. La semilla manchada es fuente de inóculo primario y eficiente medio de dispersión de patógenos importantes y de microorganismos saprófitos. Las estructuras vegetativas y/o reproductivas de ambos grupos se pueden encontrar adheridas a la superficie externa de la semilla, dentro de las glumas, o bien dentro de los cotiledones y otros tejidos del embrión (Reis *et al.*, 1999).

El análisis de rutina de la sanidad de semillas tiene como objetivo la evaluación de la calidad de lotes de semillas en cultivos de importancia económica, debido a que las semillas transportan patógenos que pueden causar daños a la germinación, o cuando son transmitidas a los órganos aéreos pueden causar enfermedades en el cultivo afectando la producción (Moraes, 1995).

La importancia que tiene el cultivo de arroz en la producción mundial de alimentos y la significancia que tiene la transmisión por semilla de varios patógenos importantes de este cereal, constituye una preocupación constante para los investigadores en su objetivo de obtener mayor producción y mejores alimentos. Ya que la agricultura ha alcanzado un nivel alto de tecnificación, es esencial obtener una buena calidad de semilla (Castaño, 1985).

Un gran número de microorganismos son transportados e introducidos en otras áreas a través de las semillas de arroz, siendo los hongos los que causan el mayor número de enfermedades en las plantas, y que ocurren con mayor frecuencia que las bacterias y nemátodos (Castaño, 1985).

Las semillas de arroz son portadoras de numerosos patógenos que causan enfermedades importantes en el cultivo, además de ser un eficiente medio de sobrevivencia de esos patógenos en la naturaleza; su potencial epidémico varía entre especies, razas y ecosistemas (Morato de Amaral *et al.*, 1985, Jayaweera *et al.*, 1988, Mew & Gonzales, 2002, Mew & Misra, 1994, Ou, 1985, Webster & Gunnell, 1992, Winter *et al.*, 1974). Según Mew & Gonzales (2002), más de 80 especies de hongos fueron detectados en semillas de arroz.

Los hongos *Pyricularia grisea* Cav. y *Dreschlera oryzae* (Breda de Haan) Subrayan. & Jain son considerados los principales patógenos de las semillas de arroz (agentes causales del tizón y mancha castaña del arroz, respectivamente), según los estudios realizados por Agarwal & Sinclair (1985), Morato de Amaral *et al.*, (1985), Mew & Misra (1994), Neergaard (1967), Ou (1985) y Padwick (1950), debido a las pérdidas que ocasionan en los cultivos de arroz. Por otro lado, Neergaard (1967)

considera que junto a estos dos patógenos es necesario incluir también a *Trichoconis padwickii* D. Ganguly, causante de la alternariosis del arroz, debido a que los tres microorganismos presentan en común las siguientes características: a) amplia distribución mundial, b) aparición muy frecuente en las muestras de semillas de arroz, c) se manifiestan con altos niveles de infección en las mismas, y d) pueden ser fácilmente detectados en los laboratorios de análisis de sanidad de semillas.

Otros microorganismos que pueden desarrollar con frecuencia en las semillas de arroz, pueden ser *Cercospora oryzae*, *Phoma* spp., *Fusarium* spp., *Nigrospora oryzae*, *Rhynchosporium oryzae*, *Tilletia barclayana*; en tanto *Alternaria tenuis*, *A. longissima*, *Curvularia* sp., *Epicoccum* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., pero son considerados hongos de menor importancia (Morato de Amaral, 1987).

Según Mew & Misra (1994), las especies referidas a cuarentenas en las Filipinas, son *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Cercospora janseana*, *Curvularia lunata*, *Ephelis oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Microdochium oryzae*, *Nakataea sigmoidea*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae*, *Tilletia barclayana* y *Ustilaginoidea virens*.

Por otro lado, Carrera (1974) clasifica a los hongos que afectan a la semilla de arroz en dos grupos: a) hongos que infectan al arroz, durante la época de cultivo (géneros *Helminthosporium*, *Pyricularia*, *Alternaria*, *Nigrospora*, *Epicoccum*, *Curvularia*, *Phyllosticta*, *Trichoconis*, *Cephalosporium*, *Ustilaginoidea*, *Tilletia*, *Rhynchosporium* y *Cladosporium*), y, b) hongos que afectan al grano almacenado (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Dematium* y *Homodendrum*).

Con relación a la calidad fisiológica que representa la capacidad de la semilla en desempeñar funciones vitales y ser caracterizada por su germinación, vigor y longevidad, Machado (1988) afirma que los daños asociados a la presencia de patógenos son mayores cuando éstos están localizados en los tejidos embrionarios de la semilla. El daño puede significar disminución de la población de plantas, debilitamiento de plantas y aumento del desarrollo epidémico de una enfermedad, teniendo como consecuencia la disminución del rendimiento a nivel de campo, ya sea por la calidad de la semilla o para fines de comercialización o de siembra.

En Argentina, el cambio de variedades tradicionales de arroz de alto porte por otras de origen americano (USA) y tropical (semienanos) en monocultivos extensivos, unido a las variaciones en la tecnología de producción, determinaron el incremento de

enfermedades observadas en los últimos años en el NEA, las cuales representan un riesgo para la producción arrocerá de la región, además de haberse comprobado que una alta proporción de patógenos que producen enfermedades en la parte aérea, están presentes en la semilla (Gutiérrez, 2002, 2004, 2005, 2006, Gutiérrez *et al.*, 2002, Mamone & Gaetán, 1999, Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1993, 1995, 1999).

En muestras de semillas de arroz procedentes de la Argentina, se identificaron 13 especies de hongos transportados por la semilla, destacándose *Trichoconis padwicki*, *Cercospora oryzae*, *Drechslera oryzae* y *Fusarium moniliforme*, asociados con la disminución de viabilidad y el problema del manchado del grano; algunas de las muestras estudiadas procedían de la provincia de Corrientes (Winter *et al.*, 1974). Mamone & Gaetán (1999) también analizaron semillas de 10 variedades procedentes de las localidades de La Cruz y Corrientes Capital, e identificaron a los siguientes géneros y especies de hongos: *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *C. oryzae*, *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *D. oryzae*, *Fusarium* spp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Phyllosticta* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Rhizopus* sp., destacando que *Phoma* y *Phyllosticta* estuvieron presentes en el 100% de las muestras.

En el nordeste de la Argentina, Gutiérrez (2002), Gutiérrez *et al.*, (2002) y Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1999, 2001), analizaron semillas de arroz de la región durante los años 1998-2002, e identificaron numerosos microorganismos presentes en la semilla, varios de ellos causantes de enfermedades de importancia en esta región (Cuadro 2).

La mayoría de los patógenos que afectan al cultivo de arroz, son transportados por la semilla; algunos de ellos presentan elevada incidencia, además de causar enfermedades en la parte aérea del cultivo. Entre estos últimos se encuentran *Alternaria padwickii* y *Microdochium oryzae*, objeto de estudio del presente trabajo de tesis (Gutiérrez, 2002, Gutiérrez *et al.*, 2002, Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1999, 2001).

El hongo *A. padwickii* es el agente causal de la alternariosis o mancha foliar del arroz, además de integrar el complejo causal del manchado del grano de arroz. En la región del NEA fue detectado en semillas, hojas y granos manchados de arroz (Gutiérrez, 2002, 2004, Gutiérrez *et al.*, 2002, Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1989, 1991, 1999, 2001, Rigonatto & Gutiérrez, 2006).

La escaldadura de la hoja del arroz causada por *M. oryzae*, es considerada actualmente una enfermedad de amplia distribución en toda la región del NEA; se caracteriza por producir síntomas en hojas, vainas foliares y granos de panojas de arroz (Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1999, 2001, Gutiérrez *et al.*, 2002).

Con el objetivo de obtener nuevos materiales genéticos en el cultivo del arroz, anualmente se introducen al país líneas originarias de países productores de arroz, como Colombia, Brasil y Filipinas con fines de mejoramiento. Teniendo en cuenta que para el cultivo de arroz la semilla es el único medio de propagación comercial de la especie, se debe prestar especial atención en la importancia y manejo de la misma como fuente de inóculo primario.

1.5. Detección de patógenos en semillas de arroz

Según Richardson (1990) y Mew & Gonzales (2002), los hongos forman el principal grupo de organismos patogénicos que pueden asociarse a las semillas de arroz, entre los cuales algunos se destacan por su importancia económica y por lo tanto deben ser identificados en los lotes de semillas.

Morato de Amaral *et al.*, (1985) expresa que el empleo de técnicas de detección de patógenos en semillas de arroz es de gran utilidad para evitar la entrada de nuevos patógenos en regiones aun no contaminadas, evitándose la comercialización de lotes de semillas infectadas de una región a otra. Además, permitirá conocer la cantidad de inóculo inicial y los cuidados a ser tomados para la transmisión de enfermedades.

En la elección de un método específico para un determinado microorganismo, llevado por la semilla, el analista debe conocer el lugar exacto del patógeno en la semilla, la localización del inóculo presente (en la semilla o sobre la semilla, o con la misma) y también si existe más de un tipo de inóculo; un buen conocimiento de estos aspectos, son esenciales para la elección de uno o más métodos de detección, en una determinada combinación hospedante-patógeno (Neergaard, 1967).

Para los análisis de sanidad de semillas pueden ser utilizados varios métodos de detección, cuya elección dependerá de la semilla a ser analizada y de los patógenos a ser cuantificados, lo que a su vez están influenciados por el interés de quién solicita el análisis (ya sea para cuantificar todos los patógenos o solamente determinados patógenos presentes en las semillas). Por este motivo, existen medios de cultivos selectivos para detectar patógenos específicos, y medios de cultivo no selectivos, que permiten detectar un mayor número de patógenos presentes en las semillas.

Según Neergaard (1979) un método de incubación para la detección de patógenos llevados por la semilla, tiene como objetivos la determinación de: a) tipo de inóculo, b) cantidad de inóculo, c) distribución del inóculo dentro del lote de semilla, y d) el potencial del inóculo al momento de realizar el análisis sanitario.

Entre los métodos utilizados en la detección de los principales patógenos asociados a las semillas de arroz, Morato de Amaral (1987) menciona a los siguientes: a) método del papel de filtro, b) método del papel de filtro con congelamiento, c) método de la placa agar, y d) método del tubo de ensayo con agar.

Mew & Misra (1994) consideran a los métodos del papel de filtro y de la placa agar, como métodos patrones para el análisis de semillas de arroz; aunque citan también al método del lavado de semillas que permite identificar esporas o micelio de hongos que desarrollan sobre las semillas, y al método del síntomas en plántulas, como un método suplementario para detectar patógenos transmitidos por las semillas. En tanto Mathur & Kongsdal (2003) y Mew & Gonzales (2002), además de los ya citados, describen a las técnicas moleculares y serológicas como métodos de análisis de semillas.

En la actualidad, la utilización de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y RAPD (Polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados al azar) son las más comúnmente usadas y muy útiles para la detección de microorganismos en semillas y estudios de taxonomía, así como para conocer aspectos del ciclo de vida de los patógenos, mecanismos de producción y liberación de las esporas, etc. (Machado *et al.*, 2002, Mew & Gonzales, 2002).

Neergaard (1979) expresa que la viabilidad y virulencia relativa de un hongo patógeno puede ser medida en términos de: 1) tasa de crecimiento micelial (método del agar); 2) tasa de crecimiento micelial más esporulación y capacidad de producir síntomas (método del papel de filtro); 3) capacidad de reducir la emergencia a campo y producir plántulas enfermas (análisis en suelo, arena, etc); 4) capacidad de producir enfermedades en plántulas procedentes de semillas bajo análisis; y 5) capacidad de inducir enfermedades, utilizando plantas indicadoras. Teniendo en cuenta esto, se podrían considerar cinco métodos de análisis de sanidad, basados sobre la incubación de semillas, sembradas sobre un medio adecuado: a) análisis basados sobre el crecimiento de un patógeno (método del agar) (el inóculo puede ser registrado como porcentaje de incidencia, además de determinar la tasa de crecimiento de las colonias); b) análisis basados sobre el crecimiento de plántulas y patógenos (utilizados para

determinar la tasa de crecimiento de ambos y la virulencia del inóculo; también permitiría obtener información sobre la intensidad de la infección y clasificarla en grados de severidad; son realizados en el método del papel de filtro; c) análisis basados sobre el crecimiento de las plántulas y el desarrollo de síntomas (éste tipo de análisis, denominado test del síntoma en plántulas, puede predecir el comportamiento de los patógenos sobre la emergencia de las plántulas a campo; por esta razón las semillas se siembran en diversos sustratos (suelo, arena) o en un medio inerte semiestéril (perlita, vermiculita). Este procedimiento también podría indicar el vigor de la semilla, así como el potencial de inóculo del patógeno llevado por la semilla, siendo adecuado para analizar semillas tratadas; d) análisis basados sobre el crecimiento del hospedante más allá del estado de plántula (consiste en el cultivo de las plantas hasta los estadios reproductivos, a fin de seguir la evolución de las enfermedades que se manifiestan tardíamente; también puede ser empleado para el control de cuarentenas pos-entrada cuando sólo se dispone de este único método; e) análisis basados sobre el crecimiento de plantas indicadoras e inoculación de patógenos alojados dentro de las semillas (utilizado para detectar e identificar virus llevados por semillas).

1.6. Transmisión de patógenos desde la semilla hacia los órganos aéreos

La transmisión de patógenos por medio de las semillas, se refiere al pasaje de los mismos hacia los órganos aéreos de las plantas. La cuantificación de la transmisión de un patógeno es un requisito necesario para determinar la importancia de la semilla como fuente de inóculo. Esto es fundamental donde el cultivo se implanta por primera vez o en campos donde se practica la rotación de cultivos, sirviendo como una medida de cuantificación de la intensidad de una enfermedad e indicador de epidemias (Reis *et al.*, 1999).

Durante el proceso de germinación de la semilla, el micelio que se encuentra en el pericarpio o en el endosperma reinicia su crecimiento, pasando desde el interior a la superficie de la semilla. Ese proceso es muy importante, porque garantiza la continuidad del ciclo vital de los patógenos al asegurarles la fuente nutricional a su crecimiento y esporulación (Reis & Casa, 1998).

Los patógenos pueden estar asociados a las semillas externa e internamente, o mezclados con ellas. De esta manera, el transporte de patógenos por las semillas puede ser efectuado de tres formas: 1) el patógeno puede acompañar a las semillas sin adherirse y se encuentra mezclado con ellas, 2) el patógeno puede estar adherido

externamente a la semilla y en este caso se dice que la semilla está infestada, 3) el patógeno está localizado internamente en la semilla, para lo cual se debe considerar dos tipos de infección: a) el patógeno se encuentra generalmente como micelio en el pericarpio y en el endosperma, y b) el patógeno se encuentra como micelio latente en el embrión. En los casos de infección la tasa de transmisión generalmente es mayor porque garantiza más eficientemente la supervivencia del patógeno y su posterior pasaje hacia los órganos aéreos. De todas formas, no existe garantía de que los patógenos de los tres grupos citados infecten a las plántulas; por lo tanto es esencial diferenciar entre el transporte del patógeno con la semilla de un lugar a otra y su transmisión a la progenie del huésped. La simple presencia de un patógeno en la semilla no asegura su pasaje a las plantas, y por lo tanto, la eficiencia del pasaje desde las semillas a las plantas, debe ser probada y cuantificada. El grado de eficiencia en la transmisión es mayor para los patógenos que infectan la semilla y menor para los que las infestan (Machado, 2000, Reis *et al.*, 1999).

Con respecto a la dispersión de patógenos por la semilla, aquel utiliza órganos del hospedante para sobrevivir y diseminarse; a través de esta asociación los patógenos siempre acompañan a sus hospedantes, ya que dependen nutricionalmente de la planta cultivada. La asociación de los patógenos a las semillas garantiza el acceso directo del parásito a la fuente nutricional por medio de la germinación y emergencia. En la naturaleza se presenta un proceso cíclico indefinido en cuanto a la duración de la infección de la semilla durante su formación en el cultivo y el posterior pasaje o transmisión de los patógenos a los órganos aéreos y radiculares del hospedante. En este momento se reinicia la fase parasitaria la cual es perjudicial para la planta. Sin embargo es necesario resaltar que la presencia de un patógeno en la semilla, no es suficiente para garantizar el pasaje del patógeno para la plántula procedente de la semilla infectada (Reis *et al.*, 1999)

El pasaje o transferencia de inóculo entre las plantas de una misma generación o entre semillas de un mismo lote, implicará la dispersión del patógeno. La principal amenaza a la viabilidad de los patógenos en ese periodo es la muerte por falta de la fuente nutricional y también por competencia microbiana. La muerte por inanición se presenta cuando los patógenos se encuentran en la fase saprofítica, debido a que enfrentan una gran competencia por el sustrato, estando en desventaja en relación a los organismos descomponedores de la materia orgánica, más adaptados a estos tipos de ambientes y de alta competitividad por el sustrato (Reis & Casa, 2004). Por lo tanto, la

manera más eficiente de sobrevivencia de los hongos necrotróficos es estar asociados a las semillas, lo que garantiza indefinidamente la continuidad del ciclo vital de determinados fitopatógenos.

Según Mew & Gonzales (2002), no todos los patógenos llevados por las semillas de arroz pueden ser transmitidos al cultivo; la forma de transmisión puede variar de un patógeno a otro y el mismo patógeno puede reaccionar en forma diferente cuando las semillas se siembran en diferentes tipos de sustratos o ambientes. Además, consideran la necesidad de determinar los tipos de pérdidas y sus efectos sobre el rendimiento cuando un patógeno es detectado en la semilla y es transmitido al campo en el momento de la siembra desarrollando una enfermedad. Respecto a esto, concluyeron que esta información es escasa y debería ser estudiada, ya que el inóculo inicial presente en las semillas, es la clave para comprender la causa de una epidemia en un contexto cuarentenario. Los umbrales de inóculos llevados por un lote de semilla han sido definidos en términos de sus efectos sobre la transmisión y el establecimiento de la enfermedad.

Hasta el momento se ha demostrado la transmisión por la semilla de arroz de los siguientes patógenos: *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Gerlachia oryzae*, *Pyricularia grisea* y *Sarocladium oryzae* (Faiad *et al.*, 1993, 1994, Malavolta *et al.*, 2002, Manandhar *et al.*, 1998, Mathur *et al.*, 1972, Mía *et al.*, 1986, Ojeda & Subero, 2004, Singh & Mathur, 1992).

Faiad *et al.*, (1994) estudiaron la transmisión de *P. grisea* en semillas de arroz bajo condiciones controladas de temperatura y en diferentes profundidades de siembra; concluyeron que ambos factores no influenciaron en la tasa de transmisión, la cual tuvo un valor medio de 34%.

Malavolta *et al.*, (2002) determinaron la transmisión de *B. oryzae* sembrando semillas inoculadas con el patógeno, en cajas plásticas con tierra esterilizada en invernáculo; concluyeron que la transmisión de semilla-plántula no presentó variación significativa según el nivel de incidencia del patógeno en las semillas. Por otro lado, Prabhu & Vieira (1989) analizando la transmisión de *B. oryzae*, obtuvieron los siguientes resultados: a) el tipo de sustrato utilizado influyó en la transmisión del hongo, siendo de 14 y 17% en suelo y vermiculita no esterilizado respectivamente; b) la transmisión no presentó variación significativa según el nivel de incidencia del patógeno en las semillas; y c) existen diferencias en la incidencia entre las variedades de arroz, en cuanto a la transmisión del patógeno.

Con el objetivo de establecer la asociación entre el grado de manchado de la semilla y la transmisión de *B. oryzae* a las plántulas, Ojeda & Subero (2004) sembraron semillas manchadas infectadas con el patógeno en bandejas plásticas con papel absorbente cubiertas con plástico transparente; realizaron observaciones diarias a fin de detectar los síntomas típicos de la enfermedad en las plántulas, y concluyeron que a mayor grado de manchado de la semilla, mayor porcentaje de transmisión del patógeno hacia las plántulas.

Manandhar *et al.*, (1998), observaron que a partir de semillas de arroz con 21% de infección de *P. grisea*, el 4% de plántulas desarrollaron la enfermedad. Faiad *et al.*, (1993) observaron la transmisión del hongo *Gerlachia oryzae* desde las semillas de arroz al comprobar plántulas enfermas procedentes de semillas infectadas por el patógeno. En tanto, Mia *et al.*, (1986) obtuvieron correlación significativa entre la infección en la semilla y lesiones en las plántulas en condiciones de invernáculo.

Singh & Mathur (1992) estudiaron la transmisión de *Sarocladium oryzae* en condiciones controladas de luz y temperatura, en laboratorio e invernáculo, y encontraron que el hongo puede ser transmitido desde las semillas a plantas maduras de arroz, en las que observaron síntomas de podredumbre de la vaina al estado de emergencia de la panoja y a la madurez. Al analizar las semillas de las panojas con y sin síntomas, detectaron altos valores de transmisión del patógeno.

Los métodos empleados para determinar la transmisión de patógenos de la semilla de arroz, son los siguientes: siembra de semillas en cajas plásticas con suelo esterilizado autoclavado, en tubos de ensayo con arena esterilizada, en bandejas plásticas con papel absorbente, y en tubos de ensayo con agar agua (Malavolta *et al.*, 2002, Ojeda & Subero, 2004).

1.7. Control de patógenos en semillas

Las estrategias de control de patógenos tienen por objetivo principalmente la reducción del inóculo en las fuentes primarias, ya sean las semillas o los restos culturales. A través de las semillas infectadas el patógeno es introducido en nuevas áreas, lo que debe evitarse mediante la utilización de semillas sanas, o por el tratamiento de semillas (Machado, 2000). Según Morato de Amaral *et al.*, (1985) y Sofiatti & Schuch (2005), la aplicación de fungicidas en campos destinados a la producción de semillas, disminuyen la incidencia y severidad de las enfermedades en

el cultivo de arroz, y también en la incidencia de patógenos en las semillas y consecuente mejoría de la calidad fisiológica y sanitaria.

En patología de semillas el punto fundamental se refiere a la íntima asociación entre el patógeno y la semilla, permitiendo que ésta se constituya en un importante vehículo de dispersión y establecimiento de patógenos. Por ello, es necesario resaltar que la presencia de un patógeno en la semilla, no es suficiente para garantizar el pasaje del patógeno para la plántula procedente de la semilla infectada.

La asociación patógeno-semilla nos indicaría el potencial y consecuente establecimiento de la enfermedad debido a la siembra de semillas infectadas, si las condiciones ambientales fueran favorables (Menten & Bueno, 1987). Por lo tanto, es necesario obtener metodologías eficientes de tratamientos de semillas con el fin de lograr la erradicación de patógenos necrotróficos que pueden ser transmitidos hacia los órganos aéreos de las plántulas, causando manchas foliares o en los granos. La posibilidad de controlar enfermedades en la fase previa a la implantación de un cultivo, implica que el tratamiento de semillas sea considerado en la agricultura moderna como una de las medidas más recomendadas, posibilitando el menor uso de agroquímicos, a fin de evitar la contaminación al medio ambiente (Machado, 2000).

1.7.1. Tratamiento de semillas

El tratamiento de semillas tiene como objetivos la eliminación o erradicación del inóculo infectivo asociado a las semillas; protección de la semilla durante la germinación en la fase inicial de desarrollo, garantizando el establecimiento pleno del cultivo; protección de la parte aérea de la planta contra las enfermedades originadas de otras fuentes de inóculo en el campo de cultivo y prevención de la transmisión y dispersión del inóculo por medio de las semillas, evitando o reduciendo los riesgos de epidemias (Machado, 2000).

Según Reis & Casa (1998), la erradicación de patógenos de las semillas es una tarea difícil, motivo por el cual existen escasos trabajos publicados. Algunas de las dificultades podrían ser atribuidas a la íntima asociación que existe entre el patógeno y su hospedante.

De acuerdo a Menten (1996) el tratamiento de semillas es una última alternativa para la obtención de semillas libres de patógenos; aunque debería considerarse la posibilidad de producción de semillas sanas a través del manejo del campo de producción (eliminación de semillas portadoras de patógenos,

almacenamiento bajo condiciones controladas y selección de los mejores lotes después del análisis sanitario de las muestras). Su eficiencia depende del tipo y localización del patógeno, del vigor de la semilla y de la existencia de sustancias o procesos eficaces.

Según Machado (2000), existen tres modalidades o técnicas que pueden emplearse en el tratamiento de semillas: tratamientos químicos, físicos o biológicos, debido a la gran diversidad y naturaleza de los agentes causantes de enfermedades, y también a que no siempre un único método de tratamiento permitiría un 100% de control.

1.7.2. Tratamiento químico

El tratamiento químico es la aplicación de fungicidas, antibióticos y nematicidas a las semillas. El empleo de fungicidas eficientes en el tratamiento de semillas de cereales, tiene por objetivo principal reducir a los niveles más bajos posibles, la tasa de transmisión de los patógenos y de esta manera aumentar el porcentaje de emergencia de plántulas en el campo (Forcelini, 1995).

Los patógenos localizados en la superficie externa o en el pericarpio de las semillas pueden ser controlados por el tratamiento con fungicidas; pero cuando el patógeno se localiza en el embrión, el control es más difícil, siendo necesario el tratamiento térmico o el empleo de fungicidas sistémicos. Cuando se emplea algún tipo de control (térmico o químico) con el fin de erradicar al patógeno en el interior de los tejidos, puede resultar en la muerte del embrión o reducción en la germinación de las semillas. Existen casos en que el método de control no afecta a la germinación, por eso no se consigue la eficiencia de un control satisfactorio. Por lo tanto, la dosis del fungicida sistémico así como el binomio tiempo-temperatura para el tratamiento de semillas, son cruciales y deben ser analizados en forma particular en cada tipo de asociación patógeno hospedante. Por ello, como la erradicación del patógeno de los tejidos internos de las semillas no siempre es considerada en sus sistema de producción, se tiene como resultado la introducción de patógenos por medio de las semillas en nuevos campos de producción (Zambolin, 2004).

El conocimiento de la incidencia de patógenos y las partes de la semilla donde el patógeno se encuentra, son las condiciones necesarias para el éxito de un tratamiento químico. En la práctica es muy difícil obtener esta información cuando realizamos un análisis de sanidad, debido a la falta de metodologías específicas para

los organismos que infectan a las semillas, principalmente para los hongos (Zambolin, 2004).

1.7.3. Tratamiento físico (termoterapia)

La termoterapia es utilizada como medida erradicativa de control de muchos patógenos localizados interna o externamente en las semillas de cereales, hortalizas, y órganos de propagación vegetativa (Dhingra *et al.*, 1980); consiste en la exposición de las semillas a la acción del calor en combinación con el tiempo de duración del tratamiento, a fin de eliminar, o reducir el inóculo infectivo de un agente causante de enfermedades. Es una medida que requiere un riguroso control del binomio temperatura y tiempo de exposición (Machado, 2000).

El principio de la termoterapia se basa en el diferencial de los puntos térmicos letales, en el caso de semillas y patógenos, considerándose que el éxito del tratamiento será tanto mayor en la medida que esos puntos estén los más distanciados uno de otro. La medida se aplica obviamente, en los casos en que el punto térmico letal de las semillas, es mayor que el punto letal del patógeno (Dhingra *et al.*, 1980, Soave & Moraes, 1987, Machado, 2000). La termoterapia de semillas emplea el agua, aire seco o vapor, como vehículo de transferencia del calor. La eficiencia de estos vehículos, disminuye en el orden de agua-vapor aireado y calor seco, siendo el agua al estado líquido el vehículo más eficaz, proporcionando una conductividad de calor 2 a 5 veces mayor, en relación a los demás vehículos (Machado, 2000).

El tratamiento utilizando agua caliente, puede causar la desnaturalización de los tejidos externos de las semillas, pero sin afectar dentro de un determinado periodo de tiempo los tejidos de reserva que posibiliten la germinación de las semillas (Machado 2000).

De acuerdo a lo expresado por Machado (2000), la acción del calor a través de los tejidos de las semillas, siendo uniforme y constante, puede alcanzar el inóculo infectivo de los patógenos localizados más profundamente en los tejidos del vegetal, lo que no siempre es posible de ser alcanzado con otras formas de tratamiento. Por tratarse de una metodología que requiere el uso de equipamientos de precisión en el control de la temperatura y del periodo de tratamiento, la termoterapia es más utilizada en el tratamiento de pequeños volúmenes de semillas, siendo aconsejada su aplicación en semillas de especies de hortalizas. Pequeñas oscilaciones de temperatura y tiempos de tratamiento, pueden causar serios daños a la calidad de semillas sometidas a la

termoterapia. En estos casos, la precisión y la calidad del equipamiento, son requisitos fundamentales para el éxito de esta metodología, no siendo recomendada para el uso masivo entre los agricultores.

Los principales inconvenientes de la termoterapia son la reducción del poder germinativo y del vigor (Menten, 1996).

Es importante tener en cuenta que la relación volumen de la semilla/agua sea no menor a 1:5, para que haya un máximo contacto de las semillas con el agua caliente; las semillas deben ser colocadas en un saco poroso o en un recipiente de tela, y el agua debe tener circulación forzada. Posterior al tratamiento, se debe proceder al enfriamiento en agua y el secado de las semillas, a través de ventilación forzada (Soave & Moraes, 1987, Menten, 1996).

1.7.4. Control químico de patógenos de semillas de arroz

A nivel mundial, existen referencias bibliográficas sobre trabajos realizados para el control de patógenos transportados por la semilla de arroz, mediante el tratamiento de las mismas con fungicidas, con el objetivo de disminuir el inóculo presente en una semilla infectada.

En Brasil, Morato de Amaral (1981) y Ribeiro (1996) demostraron la eficiencia de los fungicidas tiram, captan, carboxin, mancozeb y quitosana en la obtención de semillas de mejor calidad; Valarini *et al.*, (1984), y Sartorato *et al.*, (1990) informaron sobre la eficiencia del fungicida iprodione en el control de *Drehslera oryzae* y *Phoma sorghina* asociados a las semillas de arroz.

Prabhu & Vieira (1989) observaron que las semillas de arroz tratadas con carboxin + tiram presentaron un aumento en la germinación y buena sanidad de las plántulas; Misra & Vir (1990) demostraron la eficacia del producto carbendazim utilizado solo o en mezclas con tiram en la disminución en la incidencia de hongos patógenos; mientras que Goulart (1991) observó una reducción en la incidencia de *P. grisea* en las semillas de arroz, con una disminución del tizón en las hojas y aumento en la productividad, al tratar las semillas con etiltrianol e iprodione + tiram; de la misma manera Arias *et al.*, (2000) lograron controlar el tizón causado por *P. grisea* mediante el tratamiento de semillas con pyroquilon, carboxin + tiram y tiabendazol.

Parisi *et al.*, (2001), lograron erradicar a los hongos *P. grisea*, *B. oryzae* y *M. oryzae* al utilizar las mezclas carbendazim + tiram en las 3 dosis (30+70, 37.5 +87.5 y 45+105 p.a.100⁻¹ kg de semilla) y carboxin + tiram (60+60).

Salazar & Alizaga (1996) en Costa Rica redujeron la incidencia de los hongos *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan, *T. padwickii*, *C. lunata*, *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp., al tratar las semillas con vitavax + captan y carbendazim + iprodione.

Sofiatti & Schuch (2005) evaluaron la aplicación aérea del fungicida tebuconazole en lotes de producción de semillas en la región de Pelotas (RS, Brasil), sobre la calidad fisiológica y sanitarias de las semillas de arroz, observando que la germinación y el vigor de las semillas de cultivos tratados, tuvieron mejor desempeño que las semillas procedentes de cultivos no tratados, al igual que el análisis sanitario reveló alta incidencia de hongos en los tratamientos sin pulverización de fungicida.

También Schuch *et al.*, (2006) en la región de Pelotas (RS, Brasil), aplicaron el fungicida carboxin + tiram ($300 \text{ ml} \cdot 100^{-1}$) en semillas de las variedades BR-IRGA 410 y EMBRAPA 7-Taim, y concluyeron que el producto produjo un aumento en el porcentaje de germinación y disminuyó la incidencia de los hongos *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Gerlachia* sp., *Drechslera* spp. y *Curvularia* sp.

Pereira *et al.*, (2002) demostraron que el iprodione puede inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de los hongos *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Curvularia oryzae*, *Drechslera oryzae* y *Gerlachia oryzae*; también Silva-Lobo (2008) probaron varios productos (carboxin + tiram, triciclazol, azoxistrobina y pyroquilon) para el control de *D. oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Microdochium oryzae*, *Phoma* sp. y *Pyricularia oryzae*, de los cuales carboxin + tiram fue el más eficiente.

La utilización del tratamiento de semillas es necesario en aquellos lotes destinados a la producción de semillas certificada o fiscalizada, y constituye una importante medida de control para impedir la introducción del patógeno donde se siembra arroz por primera vez.

En Argentina no existe un programa de manejo sanitario de las enfermedades desarrollado y propuesto por los investigadores para ser aplicado al cultivo del arroz. Durante los años 1999-2000, en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Concepción del Uruguay (Entre Ríos), se condujeron ensayos en parcelas experimentales utilizando diferentes fungicidas con respuestas muy variadas para el control de enfermedades del arroz (Arguissain *et al.*, 1999, 2000).

También Sisterna & Ronco (1994) realizaron un ensayo *in vitro* con fungicidas para el control de hongos causantes del manchado del grano de arroz; Gutiérrez *et al.*, (2005) evaluaron *in vitro* la eficiencia de los fungicidas ipconazole y carboxin + tiram en semillas de tres variedades de arroz infectadas con *Aspergillus* spp., *Alternaria alternata*, *A. padwickii*, *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*, *Gerlachia oryzae*, *Penicillium* sp., *Phoma* sp., y *Rhizopus* sp; ambos productos químicos redujeron la incidencia de dichos microorganismos.

La presencia de patógenos necrotróficos en la semilla de arroz permite asegurar una convivencia de los mismos con el hospedante, de duración indefinida. Esto es debido a que los métodos de control disponibles, no son suficientes para erradicarlos. Una eficacia de control inferior a 100 % no es suficiente. Por lo tanto es necesario desarrollar métodos y productos capaces de erradicar de las semillas a los patógenos necrotróficos, independientemente del nivel de incidencia.

1.8. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer la importancia actual de *Alternaria padwickii* y *Microdochium oryzae*, como patógenos transportados por las semillas de arroz, analizando la sanidad de la misma mediante métodos de detección, para así cuantificar su transmisión desde la semilla a los órganos aéreos, y evaluar la aplicación de metodologías de control a fin de lograr la erradicación de ambos patógenos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Comparar métodos de detección *in vitro* de *Alternaria padwickii* y *Microdochium oryzae* en semillas de arroz.
2. Cuantificar la transmisión de *Alternaria padwickii* y *Microdochium oryzae* desde las semillas hacia las plántulas de arroz.
3. Evaluar el efecto del tratamiento químico y termoterapia *in vitro* para el control de *Alternaria padwickii* y *Microdochium oryzae* presentes en las semillas de arroz.

1.9. HIPOTESIS

1. Existen diferencias significativas en la sensibilidad de detección de *Alternaria padwickii* y *Microdochium oryzae* según el método utilizado.
2. *Alternaria padwickii* y *Microdochium oryzae* presentan un mecanismo eficiente de transmisión desde las semillas hacia las plántulas de arroz, constituyendo la principal fuente de inóculo en nuevos campos.
3. Existen diferencias en la eficiencia de control de ambos patógenos presentes en las semillas de arroz, de acuerdo a la metodología utilizada.

Cuadro 1. Enfermedades fúngicas determinadas en la región del nordeste argentino Mazzanti de Castañón y Gutiérrez de Arriola, 2001, Rignonatto y Gutiérrez, 2006).

ORGANOS AFECTADOS	NOMBRE COMUN DE LA ENFERMEDAD	AGENTE CAUSAL
Hojas, granos,	Alternariosis	<i>Alternaria padwickii</i>
Hojas, vaina foliar	Mancha foliar castaña angosta	<i>Cercospora oryzae</i>
Hojas, vaina foliar, granos, coleóptilos	Mancha castaña	<i>Cochliobolus miyabeanus</i>
Hojas	Carbón de la hoja	<i>Entyloma oryzae</i>
Hojas, vainas foliares, granos, coleóptilos	Escaldadura de la hoja	<i>Monographella albescens</i>
Hojas, vainas foliares, granos, tallos	Tizón o quemado	<i>Magnaporthe grises</i>
Vainas foliares, tallos	Podredumbre de las vainas del cuello o pie	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>graminis</i>
Vainas foliares, granos	Podredumbre castaño rojiza de la vaina	<i>Helicoceras oryzae</i>
Vainas foliares, tallos	Podredumbre del tallo	<i>Magnaporthe salvinii</i>
Vainas foliares	Decoloración de la vaina	<i>Pyrenochaeta oryzae</i>
Vainas foliares	Mancha de la vaina	<i>Rhizoctonia oryzae</i>
Vainas foliares	Mancha agregada de la vaina	<i>Rhizoctonia oryzae-sativae</i>
Vainas foliares	Tizón de la vaina	<i>Rhizoctonia solana</i>
Vaina de la hoja bandera,	Podredumbre de la vaina de la hoja bandera	<i>Sarocladium oryzae</i>
Vainas foliares	Podredumbre de la vaina y del tallo	<i>Sclerotium hydrophyllum</i>
Granos	Carbón del grano	<i>Tilletia barclayana</i>
Granos	Manchado del grano	Varias especies de hongos
Granos	Falso carbón	<i>Ustilaginoidea virens</i>

Cuadro 2. Porcentaje de hongos detectados en semillas de arroz, analizadas durante el periodo comprendido entre 1998-2002.

GÉNERO Y/O ESPECIES DE HONGOS	ENFERMEDAD	PORCENTAJE DE HONGOS EN SEMILLAS DE ARROZ
<i>Alternaria alternata</i>	Manchado del grano	15%
<i>Alternaria longissima</i>	Manchado del grano	5,0%
<i>Alternaria padwickii</i>	Alternariosis, tizón de plántulas, manchado del grano	27%
<i>Bipolaris sp.</i>	Manchado del grano	3,0%
<i>Bipolaris oryzae</i>	Mancha castaña de la hoja, muerte de plántulas, manchado del grano	15%
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Manchado del grano	6,0%
<i>Chaetomiun spp.</i>	Manchado del grano	1,0%
<i>Curvularia spp. (lunata, pallescens, clavata)</i>	Manchado del grano	18%
<i>Exherohilum rostratum</i>	Manchado del grano	8,0%
<i>Epicocum purpuracens</i>	Manchado del grano	2,0%
<i>Fusarium moniliforme</i>	Manchado del grano	2,0%
<i>Fusarium spp.</i>	Machado del grano	5,0%
<i>Gaeumannomyces graminis var graminis</i>	Podredumbre de las vainas del cuello o pie	2,5%
<i>Gelasinospora sp.</i>	Manchado del grano	5,0%
<i>Helicoceras oryzae</i>	Manchado del grano	1,0%
<i>Melannoma glumarum</i>	Manchado del grano	1,5%
<i>Microdochium oryzae</i>	Escaldadura de la hoja, manchado del grano	25%
<i>Nakataea sigmoidea</i>	Podredumbre del tallo	2,0%
<i>Nigrospora sp.</i>	Manchado del grano	18%
<i>Podospora sp.</i>	Manchado del grano	2,0%
<i>Phoma sp.</i>	Manchado del grano	20%
<i>Pyricularia grisea</i>	Tizón o quemando del arroz	2,0%
<i>Rhizoctonia solani</i>	Tizón de la vaina, muerte de plántulas	5,0%
<i>Rhizoctonia oryzae</i>	Mancha de la vaina	2,0%
<i>Rhizoctonia zae</i>	Mancha de la vaina, muerte de plántulas	5,0%
<i>Sclerotium oryzae</i>	Podredumbre del tallo, muerte de plántulas	3,5%
<i>Sordaria sp.</i>	Manchado del grano	2,5%
<i>Thielavia sp.</i>	Manchado del grano	1,0%
<i>Tilletia barclayana</i>	Carbón del grano	10%
<i>Ulocladium sp.</i>	Manchado del grano	1,0%

CAPITULO 2. REVISION DE BIBLIOGRAFIA DE LA ALTERNARIOSIS DEL ARROZ (*Alternaria padwickii*)

2.1. Antecedentes y ocurrencia

En 1916, Godfrey (citado en Ou, 1985) describió una enfermedad foliar en cultivos de arroz en Louisiana y Texas (USA), la cual presentaba características muy semejantes a la roya negra de los cereales; recibió el nombre de stackburn, alternariosis o mancha foliar del arroz, observando micelio y esclerocios. Posteriormente, en 1920 observó síntomas en plántulas de arroz, causada por un hongo caracterizado por poseer pequeños esclerocios negros y micelio blanco estéril, muy similar al hongo causante de las manchas foliares previamente informado; también detectó al hongo afectando a las semillas (Padwick, 1950, Ou, 1985, Webster & Gunnell, 1992).

Esta enfermedad también fue estudiada por Tisdale (1922) y Tullis (1936), en Estados Unidos, donde produjo considerables pérdidas en plántulas y granos de arroz, antes y durante el almacenaje; Tullis (1936) detectó conidios del hongo causal en semillas manchadas y lo denominó *Trichoconis caudata* (App. & Str.) Clem; en tanto Padwick y Ganguly (1945), informaron su presencia en la India afectando los granos en la panoja de arroz. En 1947, Ganguly le adjudicó el nombre de *T. padwickii* D. Ganguly para diferenciarlo de *T. caudata* por su apéndice conidial más rígido y largo, y por el diferente rango de hospedantes (Padwick, 1950).

En 1966, Pavgi *et al.*, (citado en Padwick, 1950) describieron a *T. indica* Pavgi & R.A. Singh, afectando hojas y glumas de arroz de la India, mientras que Vaidehi en 1971, (citado en Padwick, 1950) también informó sobre un hongo similar denominado *Phaeotrichoconis crotalariae* sobre granos de arroz. En 1971, Ellis transfirió la especie al género *Alternaria*, por sus conidios poco coloreados y por la forma en que ellos se originan, surgiendo de ésta manera, el nombre de *A. padwickii* (Ganguly) M.B. Ellis, utilizado actualmente para denominar al patógeno (Ou, 1985).

El hongo *A. padwickii* es un patógeno de amplia distribución mundial, presente en varios países de América, Africa, Asia y la USRR (CMI Distribution Map 314), en cultivos bajo riego o en secano, causando podredumbre de semillas, raíces o coleóptilos, muerte de plántulas, manchado de granos y manchas foliares (Kimati *et al.*, 2005, Mew & Gonzales, 2002, Mew & Misra, 1994, Morato de Amaral, 1987, Ou, 1985, Portapuglia *et al.*, 1996, Webster & Gunnell, 1992).

La importancia de *A. padwickii* como patógeno de semillas fue demostrada por Mathur *et al.*, (1972) quienes encontraron que el 73% de 388 lotes de semillas de arroz, procedentes de Egipto, India, Korea, Nepal y Tailandia, estaban infectados por el hongo.

Los síntomas en hojas de arroz no son considerados de importancia económica, debido a su manifestación esporádica; no obstante, afecta principalmente a los granos de la panoja, lo que incide en la calidad y también en la germinación al sembrar los granos manchados. El hongo afecta a granos en formación y a granos maduros (Ou, 1985, Mathur *et al.*, 1972).

2.2. Antecedentes en Argentina

El patógeno fue identificado por Winter *et al.*, (1974) por primera vez en cinco muestras de semillas de arroz procedentes de la provincia de Corrientes, una de las cuales presentó 64% de incidencia del patógeno. Posteriormente, fue observado por Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola (1989), Gutiérrez (2002) y Gutiérrez *et al.*, (2002) en semillas de arroz de la región del nordeste de Argentina y asociado al complejo causal del manchado del grano de arroz.

En relevamientos de cultivos de arroz de la provincia de Entre Ríos, Pedraza (2005) menciona la presencia de *A. padwickii* causando síntomas en hojas y raquis de panojas, y considera que las manchas foliares en pocas ocasiones son perjudiciales, pero que en condiciones favorables a la enfermedad, ésta puede afectar un alto porcentaje de granos.

2.3. Sintomatología

2.3.1. Síntomas

Los síntomas de la enfermedad se observan sobre plántulas, hojas y granos de panojas de arroz. En plántulas, el hongo afecta raíces y coleóptilos, desarrollando pequeñas manchas castaño oscuras a negras, que pueden confluir hasta cubrir áreas hasta de varios milímetros de longitud; a medida que avanza la enfermedad, se desarrollan cuerpos negros más o menos esféricos (esclerocios) sobre la superficie de estas áreas oscurecidas. Al mismo tiempo, el coleóptilo comienza a oscurecerse mientras que las raíces seminales presentan sobre su superficie numerosos esclerocios. Sobre los coleóptilos de semillas que han germinado o sobre plántulas jóvenes se

observan lesiones castaño oscuras, mientras que plántulas muy afectadas pueden morir (Ou, 1985, Padwick, 1950).

En hojas de cultivos de arroz de la provincia de Corrientes, se observan manchas circulares a ovales de 0.5 a 1 cm de diámetro, con un margen castaño de 0,5 a 1 mm alrededor de la mancha, con centro castaño pálido, volviéndose de color blanquecino con esclerocios en el centro (Figura 1). En cultivos próximos a maduración, pueden observarse extensas áreas necrosadas que se inician en los ápices de las hojas, cubiertas de abundantes puntuaciones oscuras visibles a simple vista y que corresponden a los esclerocios (Figuras 2, 3) (Rigonatto & Gutiérrez, 2006).

Los granos o semillas afectadas por la enfermedad pueden presentar manchas o áreas blanquecinas a castaño claro; aunque también éstos órganos pueden ser asintomáticos; la enfermedad produce granos manchados o poco desarrollados, arrugados y quebradizos. El hongo afecta a granos en formación y a granos maduros (Figura 4) (Rigonatto & Gutiérrez, 2006).

2.3.2. Etiología

Forma anamórfica (imperfecta o asexual)

Alternaria padwickii (D. Ganguly) M.B. Ellis 1971

Basónimo *Trichoconis padwickii* D. Ganguly 1948

Syn *Trichoconiella padwickii* (Ganguly) B.L. Jain 1976

Deuteromycotina, orden Moniliales, familia Dematiaceae.

Las estructuras fúngicas de *A. padwickii* son las siguientes (Ellis, 1971, Ellis & Holliday, 1972) (Figura 5).

Conidios fusiformes a obclavulados, rostrados, lisos, de color castaño pálido, con un largo apéndice en el extremo, 3-5 septos transversales, contreñidos en los septos, paredes gruesas, con la segunda o tercer célula desde la base más larga que el resto, de 80-125 x 15-20 μm , con cicatriz oscura. El apéndice en el extremo del conidio es casi igual del largo del conidio, rígido o ligeramente curvado, 2-5 septos.

Conidióforos no diferenciados del micelio, 100-180 x 3-4 μm , que desarrollan conidios solitarios.

Esclerocios negros, casi esféricos, parcialmente embebidos en los tejidos del hospedante con paredes reticulares, de 50-200 μm .

Micelio ramificado, hialino en los estados iniciales; hifas maduras levemente coloreadas, de 3-5 μ de diámetro.

Características culturales: *A. padwickii* desarrolla en cultivo sobre agar papa glucosa (APG), formando colonias de crecimiento radial, con micelio aéreo de aspecto algodonoso, de color gris blanquecino y reverso gris verdoso.

Penetración y germinación: el hongo puede penetrar directamente las glumas e infectar a los granos antes de su maduración; Ganguly consideró al hongo un patógeno débil, al observar infección en variedades de arroz que fueron inoculadas con heridas (Ou, 1985).

2.4. Supervivencia y fuentes de inóculo primario

El hongo es considerado un patógeno necrotrófico, presentando una fase parasitaria en la planta viva y una fase saprofítica en el tejido necrosado y en el rastrojo. De esta manera el patógeno sobrevive en semillas y restos de cultivo como esclerocios y micelio, y posteriormente causa infección en la próxima estación de cultivo. Las semillas infectadas constituyen la principal fuente de inóculo primario; la infección en las semillas puede producir muerte de plántulas. Las malezas del cultivo también pueden ser fuente de inóculo (Ou, 1985, Padwick, 1950, Webster & Gunnell, 1992).

La enfermedad se presenta en cultivos de arroz bajo riego y de secano, aunque el ciclo de la enfermedad aún no ha sido determinado (Mew & Misra, 1994, Ou, 1985).

2.5. Condiciones ambientales

Respecto a la influencia de las condiciones ambientales sobre el desarrollo de la enfermedad, en estudios realizados por Sreeramulu & Vital (1966), se comprobó que el periodo de máxima incidencia del hongo se presentó durante la fase de maduración de la panoja, indicando la importancia de que la misma sea considerada una enfermedad de los granos de la panoja de arroz. Según estos autores, existe un ritmo diurno de dispersión de los conidios del hongo, produciéndose mayor cantidad de los mismos durante el día con temperaturas de 27 y 31°C y humedad relativa de 50 y 70%; estas condiciones son favorables para la producción y dispersión de los conidios, ya que se produjeron mayor cantidad de los mismos hacia el mediodía, y a la vez, muy relacionada a las fases de crecimiento del cultivo en el campo; observaron mayor cantidad de inóculo en los períodos de alargamiento del tallo y maduración del cultivo.

2.6. Transmisión

En los Estados de Goiás y Tocantins (Brasil), Costa (1991) comprobó la transmisión de *A. padwickii*, y concluyó que puede penetrar en el endosperma del grano de arroz y reducir la calidad de las semillas; también Mathur *et al.*, (1972) observaron que la infección de las semillas puede causar reducción en la germinación, podredumbre en las raíces y coleóptilos, además de la muerte de las plántulas.

Guerrero *et al.*, (1972) detectaron a *A. padwickii* en valores de incidencia de 1 a 52% en las semillas y asociado con el 23% de plántulas anormales, y observaron que el mismo podría producir diferentes tipos de síntomas en las plántulas (ausencia o muerte de raicillas y/o coleóptilos), hasta la muerte de las mismas.

2.7. Control

Con respecto al tratamiento de semillas de arroz, para el control de *A. padwickii*, Vir *et al.*, (1971) y Mew & Misra (1994), realizaron tratamientos en las semillas con fungicidas protectores (dithane M-45) y con agua caliente (50-54°C, 15 minutos), y comprobaron que ambos tratamientos pueden reducir la incidencia y severidad del tizón de plántulas de arroz. También concluyeron que podrían existir diferencias de resistencia entre las variedades de arroz. Por otro lado, Groth *et al.*, (1991) consideran que el quemado del rastrojo puede reducir el inóculo.

En la Argentina, la escasez de estudios sobre control químico de patógenos de semillas, ha contribuido en parte al incremento de la presencia de los mismos en las semillas de arroz. Actualmente, en la provincia de Corrientes el tratamiento de semillas de arroz no es una práctica muy común, y es realizada principalmente por las empresas semilleras para lograr una mejor germinación y población de plantas. Al respecto, Gutiérrez *et al.* (2005) redujeron la incidencia del hongo en semillas de arroz, que fueron tratadas *in vitro* con los fungicidas ipconazole y vitavax.



Figura 1. Síntomas de la alternariosis en hoja de arroz desarrollados en condiciones de infección natural en cultivos de la provincia de Corrientes. Desarrollo de esclerocios sobre la lesión.

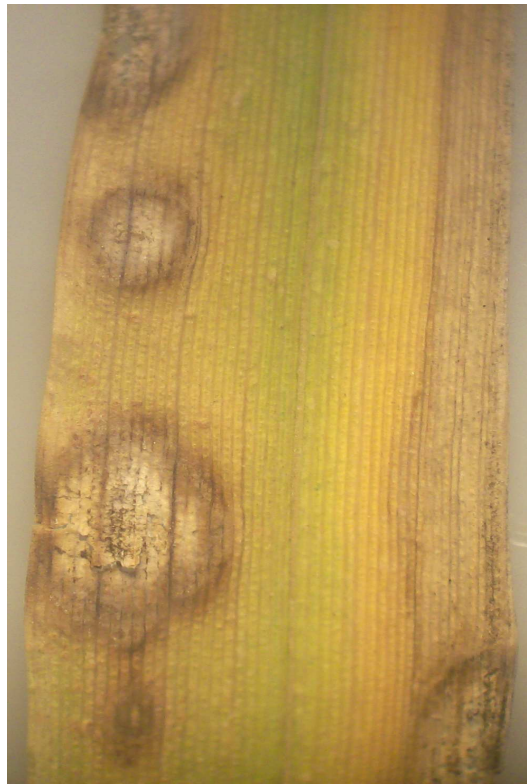


Figura 2. Síntomas (manchas) y signos (esclerocios) de alternariosis en láminas foliares de cultivos de arroz de la provincia de Corrientes, próximos a maduración, causados por *Alternaria padwickii*.

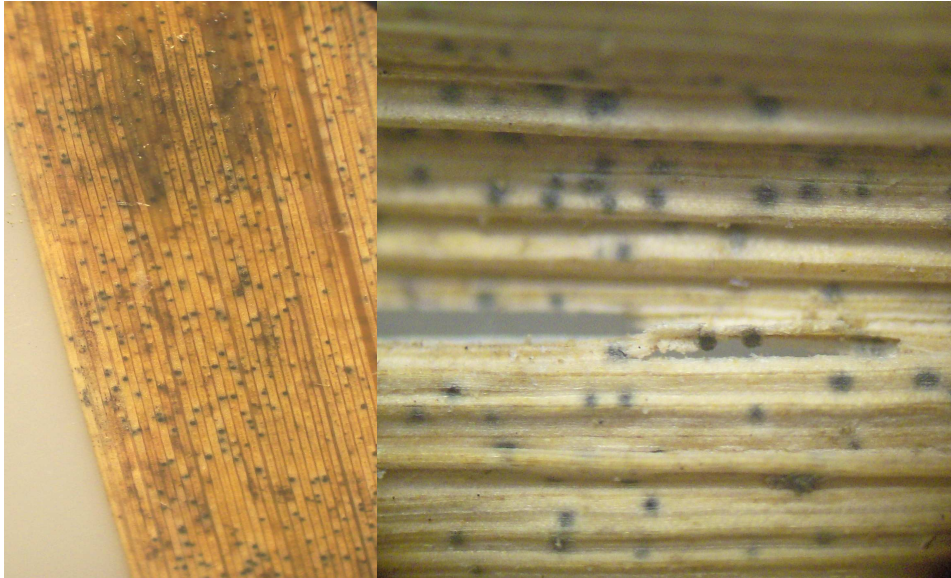


Figura 3. Esclerocios de *Alternaria padwickii* en láminas foliares de arroz, variedad Taim, en cultivos de la provincia de Corrientes.



Figura 4. Síntomas en glumas de granos de arroz procedentes de cultivos de arroz de la provincia de Corrientes, causados por *Alternaria padwickii*

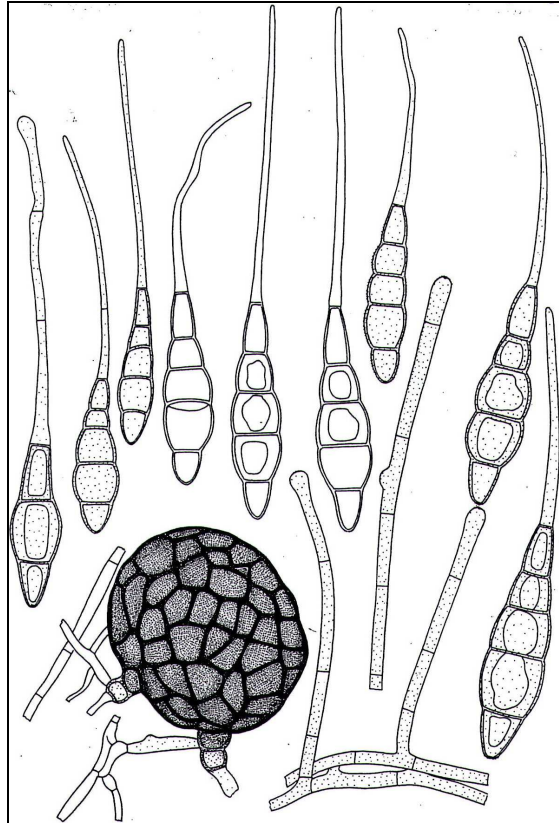


Figura 5. Conidios, conidióforos y esclerocio de *Alternaria padwickii* (Ellis, 1971, Ellis & Holliday, 1972).

CAPITULO 3. DETECCIÓN DE *Alternaria padwickii* EN SEMILLAS DE ARROZ

3.1. INTRODUCCION

Entre los hongos patógenos asociados a las semillas de arroz procedentes de la región nordeste de Argentina (NEA), se encuentra *Alternaria padwickii* (Ganguly) M.B. Ellis (Syn *Trichoconis padwickii*), causante de la alternariosis del arroz e integrante del complejo causal del manchado del grano de arroz (Gutiérrez, 2002, Rigonatto & Gutiérrez, 2006).

El hongo *A. padwickii* fue identificado en semillas de arroz en diversos países de Africa, Asia, América Latina, y USA, en cultivos bajo riego o en secano, causando podredumbre de semillas, raíces o coleóptilos y muerte de plántulas (Ellis & Holliday, 1972, Farias *et al.*, 2007, Kimati *et al.*, 2005, Morato de Amaral, 1987, Ou, 1985, Mew & Gonzales, 2002, Mew & Misra, 1994, Webster & Gunnell, 1992). Las pérdidas causadas por el patógeno, pueden ser significativas cuando se presenta una elevada infección en las semillas de hasta un 76%; en esta situación se pueden observar síntomas en plántulas, hojas de plantas adultas y manchas en granos (Ou, 1985, Mathur *et al.*, 1972).

Según Islam *et al.*, (2000) la incidencia de *A. padwickii* en las semillas de arroz puede variar de 1.33 a 44% dependiendo del cultivar utilizado.

El hongo transmitido por las semillas puede penetrar directamente en las glumas y en el endosperma, reduciendo la calidad de las mismas; de esta manera la semilla de arroz cumpliría un rol fundamental en la dispersión del patógeno; además, puede sobrevivir en el suelo y rastrojos de arroz (Ou, 1985).

Para la detección del patógeno en semillas, se mencionan a los métodos del papel de filtro y del agar como los más eficientes (Guerrero *et al.*, 1972, Jayaweera *et al.*, 1988, Kulik, 1975, Mathur & Kongsdal, 2003, Mathur & Neergaard, 1967, y Shetty & Shetty, 1985, 1988); se observaron valores de incidencia del patógeno de 1 a 52% y ocasionando también plántulas enfermas.

Al respecto, Kulik (1975) comparó los métodos del papel de filtro modificado con congelamiento y del agar guayacol para la detección de *A. padwickii*; determinó que el agar guayacol resultó ser menos sensible que el del papel de filtro. Jayaweera *et al.*, (1988) también utilizaron el método del agar (agar extracto de malta, AEM y agar papa dextrosa, APD); *A. padwickii* presentó una frecuencia de 8% en APD, pero no

desarrolló en AEM. En lo que respecta a Shetty & Shetty (1985, 1988) utilizaron seis métodos de análisis (papel de filtro, 2,4-D, congelamiento, APD, agar guayacol y agar extracto de granos de arroz), los cuales, excepto el agar guayacol, resultaron eficientes para la detección del hongo en semillas. Por otro lado, la International Seed Testing Association (2004) propone como método validado al del papel de filtro (Blotter test), sin pretratamiento de las semillas.

Los objetivos de este estudio fueron: a) comparar cuatro métodos de análisis sanitario de semillas, a fin de seleccionar el más sensible en la detección de *A. padwickii* y, b) cuantificar la incidencia del patógeno en semillas de arroz procedentes de cultivos de la provincia de Corrientes, Argentina.

3.2. MATERIALES Y METODOS

Recolección de lotes de semillas. Se recolectaron 20 muestras de semillas de arroz de campos de productores ubicados en la provincia de Corrientes, pertenecientes a las siguientes regiones agroecológicas y respectivas localidades: región Centro Sur (Mercedes, Paso de los Libres y Perugorria), región Norte (Empedrado e Itá Ibaté), región Nordeste y Malezales del Aguapey/Miriñay (Virasoro y Santo Tomé), y región Lomadas Arenosas (Goya y Gobernador Martínez).

De cada región se recolectaron 50 panojas de plantas de arroz, en estado de madurez fisiológica (M9) según la escala propuesta por el IRRI. Posteriormente, en laboratorio, las panojas fueron desgranadas y los granos se acondicionaron sobre papel de diario para su secado. Los granos (semillas) de arroz se conservaron en bolsas de papel en condiciones de laboratorio (hasta la realización de los análisis correspondientes).

Análisis sanitario y estadístico. El ensayo fue conducido en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, Argentina.

Se utilizó un diseño experimental con arreglo factorial, de cuatro métodos de análisis y 20 muestras de diferentes variedades de semillas de arroz con infección natural de *A. padwickii* de distintas localidades de la provincia de Corrientes (factores métodos y variedades) (Tabla 1).

Para el análisis se utilizaron los siguientes métodos: a) papel de filtro (PF) (3 discos de papel de filtro humedecidos con agua estéril), b) agar papa glucosado (APG) 1.5%, pH 6 (20 g de agar, 250 g de papa lavada sin cáscara, cortada en rodajas, 15 g de glucosa, y agua destilada hasta completar 1000 ml), c) agar poroto (AP) 3%, pH 6 (20

g de agar, 30 g de porotos y agua destilada hasta completar 1000 ml), y d) agar extracto de malta (AEM), 2%, pH 6 (20 g de agar, 20 g de extracto de malta, y agua destilada hasta completar 1000 ml) (Mathur & Kongsdal, 2003, Mew & Misra, 1994). En los medios agarizados se agregó 200 ppm de sulfato de estreptomicina.

En cada método se sembraron 200 semillas, previamente desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% por 10 minutos y posteriormente fueron lavadas tres veces con agua estéril, durante cinco minutos cada uno (modificado de Mathur & Kongsdal, 2003). Luego, las semillas fueron transferidas a cajas de Petri; en el método del PF se depositaron 25 semillas por caja de Petri y 10 semillas en los métodos con agar (4 repeticiones de 50 semillas). Las semillas se incubaron durante 10-12 días, a temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$ con fotoperíodo de 12 h luz, 12 h oscuridad (NUV Philips lamps, model TL40W/52).

La incidencia del patógeno en semillas se cuantificó utilizando microscopios estereoscópico (45x) y compuesto (400x); se consideró semilla infectada a aquella que presentó las estructuras de fructificación del patógeno (conidios y conidióforos y/o esclerocios).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de la varianza y test de Tukey con 5 % de probabilidad; para el análisis, los datos fueron transformados a $\sqrt{x+0,5}$.

Características culturales y morfométricas: Las características culturales y morfométricas de *A. padwickii* se determinaron en APG 1.5%, pH 6, durante 8-10 días, con fotoperíodo de 12 h. Se midieron diámetro de hifas y esclerocios, y largo y ancho de conidios en agua estéril con microscopio compuesto (400x).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSION

En cultivos comerciales de arroz de la provincia de Corrientes, *A. padwickii* causa enfermedades en plántulas, hojas y panojas de arroz; es el agente causal de la mancha foliar o alternariosis del arroz.

En el presente estudio, *A. padwickii* fue detectado en las semillas de arroz, con valores variables de incidencia según los métodos utilizados (Tabla 1); las incidencias medias fueron de 1% para el método de AEM, 4.38% en el método del PF, 13.5% en APG y 29.82% en AP, demostrando de esta manera que el patógeno puede ser detectado con cualquier método utilizado. Estos resultados fueron coincidentes con los trabajos realizados por varios investigadores, entre ellos, Jayaweera *et al.*, (1988),

Mathur *et al.*, (1972), Mathur & Neergaard (1967) y Shetty & Shetty (1988), quienes detectaron al patógeno con diferentes métodos de análisis, aunque Jayaweera *et al.*, (1988) no observaron desarrollo del patógeno al analizar las semillas con AEM.

En las semillas enfermas, *A. padwickii* produjo los siguientes síntomas: muerte de raicillas y coleóptilos, o inhibición de la germinación, desarrollando un micelio algodonoso, de color grisáceo, con conidios y conidióforos y/o esclerocios (Figuras 1, 2, 3 y 4).

Los conidióforos son rectos y lisos, con conidios rectos a ligeramente curvos, fusiformes, lisos, con un largo pico o rostro de color castaño claro, con 3-4 septos transversales, con medidas de 95-160 x 11-18 μm ; los esclerocios son esféricos a irregulares, de color negro, con paredes reticulares, de 55-180 μm de diámetro (Figuras 5, 6 y 7).

El hongo desarrolla en cultivo sobre APG, formando colonias de crecimiento radial con micelio aéreo de aspecto algodonoso, de color gris blanquecino y reverso gris verdoso (Figura 8). Los esclerocios de color negro, desarrollan a partir de los 12-15 días y sumergidos en el agar.

En el método del PF, las semillas infectadas se cubrieron de micelio aéreo algodonoso, blanquecino, desarrollando a veces una coloración rosada sobre el papel alrededor de las semillas enfermas, lo que facilitaría la identificación del hongo, según lo expresan Mathur *et al.*, (1972) y Shetty & Shetty (1988); en las semillas sembradas en APG, AP y AEM, se observaron colonias de aspecto algodonoso, gris blanquecino, con abundante formación de esclerocios sobre las glumas y/o sobre los tejidos afectados y también sumergidos en el medio de cultivo (Figura 9). Con respecto a la esporulación, los conidios del hongo se observaron alrededor de los 7-8 días en las semillas sembradas en PF, en tanto que en los medios con agar, éstos se detectaron al prolongar el periodo de incubación, a diferencia de los esclerocios del hongo, los cuales fueron más abundantes en las semillas sembradas en medio agar. Los esclerocios se detectaron a los 4 días de edad de la colonia.

Según Mew & Misra (1994), el método del PF es considerado un método estandar para detectar hongos que responden a la esporulación, mientras que los métodos con agar permiten identificar a hongos mediante las características culturales.

De los métodos utilizados, el de AP fue significativamente más eficiente ($p < 0,05$) que los métodos de APG, PF y AEM, para la detección del patógeno en

semillas. Respecto a la interacción de los factores métodos y variedades, la misma no fue significativa.

Según los estudios realizados por Farias et al., (2007) e Islam et al., (2000), los niveles de infección de *A. padwickii* en semillas de arroz pueden variar según la variedad utilizada y la procedencia, lo cual a su vez está relacionada al manejo del cultivo y al ambiente utilizando un solo método. También Farias et al., (2007) expresaron que debido a la disminución en la germinación de las semillas de arroz causada por el patógeno, es necesario realizar una resiembra del cultivo, por lo que las plántulas muertas originadas de semillas infectadas, no desarrollarán permaneciendo en el cultivo como fuente de inóculo. La dificultad para desarrollar una plántula normal, está también relacionada al pobre desarrollo de las raíces debido a la acción del patógeno.

Mathur & Neergaard (1967) analizaron semillas procedentes de Filipinas, India, Portugal y Egipto, mediante los métodos del papel de filtro y del agar, y consideraron al método del agar como un método macroscópico para la detección del hongo en semillas, el cual al ser utilizado como método de rutina, permite que las colonias de *A. padwickii* pueden diferenciarse fácilmente de las colonias desarrolladas por hongos saprófitos. Por esta razón, estos autores consideran que los analistas de semillas deberían ser entrenados para identificar principalmente a este patógeno por las características culturales de las colonias desarrolladas.

El análisis comparativo de métodos demostró que el método con AP resultó ser el más sensible y podría ser utilizado para los estudios epidemiológicos de transmisión y control químico. Dada la importancia aquí demostrada de este patógeno en semilla, se sugiere implementar estrategias de manejo integrado que sean eficientes para su erradicación.

3.4. CONCLUSIONES

El agente causal de la alternariosis del arroz, *Alternaria padwickii* está ampliamente distribuido en todas las localidades donde se cultiva arroz en la provincia de Corrientes.

Todos los métodos analizados (papel de filtro, agar papa glucosado, agar extracto de malta y agar poroto), permiten detectar al patógeno en las semillas de arroz.

El medio de agar poroto resultó ser el más sensible para su detección en semillas de arroz.



Figura 1. Desarrollo de micelio y esclerocios de *Alternaria padwickii* sobre plántula enferma de arroz.



Figura 2. Desarrollo de micelio y esclerocios de *Alternaria padwickii* sobre plántula enferma de arroz.



Figura 3. Esclerocios y micelio de *Alternaria padwickii* en coleóptilo de plántula de arroz.



Figura 4. Semilla de arroz sin germinar con desarrollo de micelio y esclerocios de *Alternaria padwickii*.



Figura 5. Conidios de *Alternaria padwickii*.



Figura 6. Conidióforos de *Alternaria padwickii*.



Figura 7. Esclerocios de *Alternaria padwickii* en raicillas de plántula de arroz.



Figura 8. Colonias de *Alternaria padwickii* en medio de agar papa glucosado.

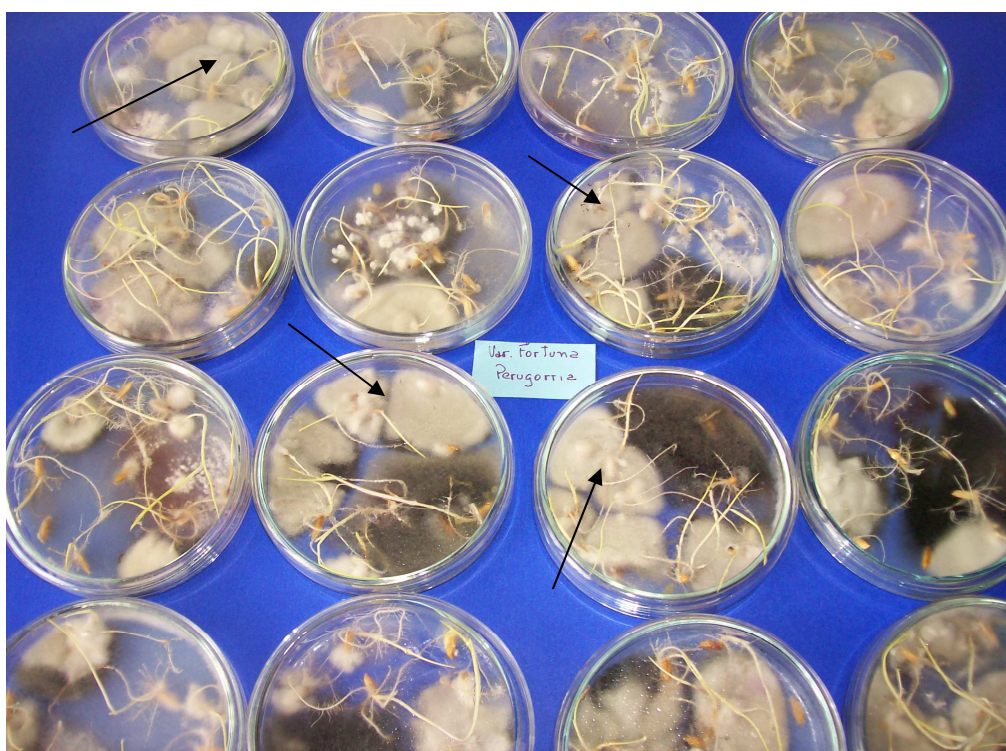


Figura 9. Desarrollo de colonias de *Alternaria padwickii* en semillas de arroz de la variedad Fortuna, procedente de Perugia, sembradas en medio de agar poroto.

Tabla 1. Sensibilidad de distintos métodos en el porcentaje de incidencia de *Alternaria padwickii* en semillas de variedades de arroz de diferentes localidades de la provincia de Corrientes.

VARIETADES	LOCALIDADES	AEM	PF	APG	AP	MEDIA (%)
CT 6919	Itá Ibaté	2.5	5.0	26	76.0	27.37 a
RP2	Mercedes	0.0	8.0	20	61.6	22.40 ab
Taim	Santo Tomé	1,5	8.0	45	61.5	29.00 ab
Taim	Mercedes	2.0	9.5	25	46.0	20.60 ab
Taim	La Cruz	1.5	8.5	20	45.0	18.75 ab
Fortuna	Peruggorría	0.0	6.5	25	42.5	18.50 ab
Supremo 1	Mercedes	2.0	8.5	20	40.0	17.60 ab
Taim	Peruggorría	0.0	6.0	20	32.5	14.60 ab
Supremo 13	Empedrado	5.0	10	22	29.5	16.60 b
Linea 363	Goya	2.0	5.0	15.4	28.0	12.90 b
Puitá	Itá Ibaté	0.0	0.0	10	28.0	9.50 b
Taim	Mercedes	2.0	5.0	10	25.0	10.50 b
Supremo 13	Mercedes	0.0	2.0	10	24.4	9.10 b
Supremo 13	Paso de los Libres	0.0	0.0	10	19.0	7.25 b
Supremo 13	Goya	0.0	0.0	6.4	14.4	5.20 b
IRGA 417	Goya	0.0	0.0	2.5	10.0	3.12 b
CT 6919	Goya	0.0	0.0	2.0	7.4	2.35 b
Supremo 13	Peruggorría	0.0	0.0	2.0	5.0	1.75 b
IRGA 417	Mercedes	0.0	0.0	2.0	3.8	1.45 b
Taim	Goya	0.0	0.0	2.0	3.7	1.42 b
Media	-	1.0 C	4.38 BC	13.5 B	29.82 A	-

AEM=Agar extracto de malta; PF=Papel de filtro; APG=Agar papa glucosa; AP=Agar poroto. CV 15,55%.

Medias seguidas por la misma letra minúscula en la columna y mayúscula en la fila, no difieren significativamente ($P = 0.05$) por el test de Tukey.

CAPITULO 4. ESTUDIOS DE TRANSMISIÓN DE *Alternaria padwickii*

4.1. INTRODUCCION

Las semillas constituyen el medio más importante de sobrevivencia, de dispersión y de transmisión de un patógeno, debido a que son las unidades propagativas más utilizadas por el hombre. La transmisión se presenta a través del pasaje del inóculo de la semilla infectada hacia las plántulas emergidas (Maude, 1996). El proceso de transmisión es importante porque garantiza la continuidad del ciclo vital de los patógenos y les asegura la fuente nutricional necesaria para su crecimiento y esporulación (Reis *et al.*, 1999).

Las semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) constituyen una importante fuente de inóculo primario para diversos hongos patógenos, algunos de los cuales presentan elevada incidencia en las semillas. Entre estos hongos, se destaca *Alternaria padwickii* por su incidencia en semillas de arroz de la región nordeste de Argentina (Gutiérrez *et al.*, 2002).

El hongo *A. padwickii* es transportado por las semillas y de esta manera es introducido en nuevas áreas de cultivo; no obstante, el suelo, los restos de cultivos y algunas malezas, también constituyen fuentes de inóculo para la enfermedad causada por este patógeno (Padwick, 1950, Ou, 1985, Webster & Gunnell, 1992).

Existen trabajos realizados por varios investigadores que observaron que varios hongos asociados a las semillas de arroz (*A. padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Gerlachia oryzae*, *Pyricularia grisea*, *Sarocladium oryzae*) pueden transmitirse a las plántulas (Faiad *et al.*, 1993, 1994, Malavolta *et al.*, 2002, Manandhar *et al.*, 1998, Mía *et al.*, 1986, Ojeda & Subero, 2004, Singh & Mathur, 1992). También Groth *et al.*, (1991), Islam *et al.*, (2000) y Mathur *et al.*, (1972) observaron que la infección de las semillas puede causar reducción en la germinación, podredumbre en las raíces y coleóptilos, además de la muerte de las plántulas.

Costa (1991) en los Estados de Goiás y Tocantins (Brasil) comprobó la transmisión de *A. padwickii*, y observó que el patógeno puede afectar la emergencia de plántulas infectadas por el hongo, ocasionando el descarte de lotes destinados a la producción de semillas. Guerrero *et al.*, (1972) detectaron la presencia de *A. padwickii* en valores de incidencia de 1 a 52% en las semillas, asociaron con el 23% de plántulas anormales, y observaron diferentes síntomas en las plántulas, como muerte de raicillas y/o coleóptilos.

En Argentina, los estudios de transmisión de patógenos desde las semillas hacia las plántulas, se refieren exclusivamente a cereales de invierno (Carmona *et al.*, 2000, 2006). Con respecto al arroz, no existen antecedentes sobre estudios de transmisión de *A. padwickii* desde las semillas hacia las plántulas de arroz.

Considerando la importancia que representa *A. padwickii* como patógeno de semillas de arroz, se propuso cuantificar su transmisión desde las semillas de arroz hacia las plántulas en condiciones de laboratorio e invernáculo.

4.2. MATERIALES Y METODOS

En la detección de *A. padwickii*, se analizaron semillas de arroz de las variedades Supremo 13, CT 6919, Supremo 1 y Fortuna, procedentes de las localidades de Empedrado, Itá Ibaté, Mercedes y Peruggorria, respectivamente, de la provincia de Corrientes. Se utilizó el método de agar poroto 3%, pH 6 con el agregado de 200 mg.L⁻¹ de sulfato de estreptomicina. Las semillas (200 semillas/variedad) se sembraron en cajas de Petri, previa desinfección con hipoclorito de sodio 2.5 % y se incubaron en condiciones de 12 h luz, 12 h oscuridad, durante 10-12 días.

La transmisión de *A. padwickii* desde semillas infectadas de las variedades en estudio hacia las plántulas de arroz, se determinó mediante la realización de dos experimentos con diferentes sustratos y edades de las plántulas: a) siembra de semillas en macetas con partes iguales de suelo:arena:turba, y b) siembra de semillas en bandejas plásticas con arena estéril. Cada experimento se repitió tres veces.

Siembra de semillas en macetas con partes iguales de suelo:arena:turba.

Las semillas utilizadas para este experimento correspondieron a las variedades Supremo 13 (Empedrado) y CT 6919 (Itá Ibaté).

Se sembraron 800 semillas de cada variedad, en macetas plásticas de 250cc conteniendo una mezcla de suelo:arena:turba en la proporción 1:1:1 (previamente esterilizado) y mantenidas en invernáculo a 25-34° C. Las macetas se depositaron en bandejas plásticas de 60 x 30 cm. Previo a la siembra, cada maceta fue humedecida con agua; posteriormente en cada una se sembraron dos semillas a una profundidad de 2 cm; mediante riegos periódicos, se mantuvo la humedad del sustrato.

A los 11 y 30 días después de la siembra (DDS), se observaron si las plántulas de arroz presentaban síntomas, y al no detectarlos se extrajeron 200 plántulas al azar (la extracción se realizó a los 11 y luego a los 30 DDS), a partir de las cuales se cortaron solamente trozos de tejidos correspondientes a la parte inferior.

Los trozos de tejido vegetal fueron lavados con agua de canilla y desinfectados con hipoclorito de sodio 2.5%; posteriormente se sembraron en cajas de Petri con AP y se incubaron durante 4-8 días, a temperatura de 25-28° C.

Siembra de semillas en bandejas plásticas conteniendo arena estéril

Se utilizaron semillas de arroz de las variedades Supremo 1 (Mercedes) y Fortuna (Perugorría). Las semillas (800) se sembraron en bandejas plásticas de 21 x 14.5 x 4.5 cm (25 semillas por bandejas) conteniendo arena estéril y humedecida con agua esterilizada; las bandejas se cubrieron con bolsas plásticas y se incubaron en condiciones de laboratorio 12 h luz, 12 h oscuridad y a 25-30°C.

A los 7 y 20 DDS de las semillas de ambas variedades, se extrajeron las plántulas que presentaron síntomas en la región próxima al cuello de las plántulas, a partir de las cuales solamente se cortaron trozos de tejidos correspondientes a la parte inferior; posteriormente se lavaron con agua de canilla, para ser desinfectados con hipoclorito de sodio 2.5%, y se sembraron en cajas de Petri con AP; la incubación se realizó durante 4-8 días en iguales condiciones a las descritas anteriormente.

Para los dos experimentos, la eficiencia de transmisión se determinó mediante la fórmula $ET = C / S \times 100$, donde C corresponde al porcentaje de tejidos colonizados por el patógeno y S el porcentaje de incidencia en las semillas infectadas (Reis *et al.*, 1999).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSION

Los niveles de infección observados en las semillas (29.5% de Supremo 13; 40% de CT 6919; 42.5% de Supremo 1; y 76% de Fortuna) demuestran la importancia de *A. padwickii* en las semillas de arroz en la provincia de Corrientes. Debido a la acción del patógeno algunas semillas no germinaron y se cubrieron de micelio aéreo de aspecto algodonoso, de color blanco grisáceo; en tanto en las semillas que lograron germinar, el hongo produjo posteriormente la muerte de los tejidos (coleóptilos y/o raicillas), los cuales también se cubrieron de micelio con esclerocios y/o conidios y conidióforos.

En los estudios de transmisión realizados, el patógeno fue detectado en plántulas asintomáticas y con síntomas, según se detalla a continuación:

Siembra de semillas en macetas con suelo:arena:turba.

En las plántulas originadas de semillas de arroz de las variedades Supremo 13 (Empedrado) (Figura 1) y CT 6919 (Itá Ibaté) sembradas en este sustrato (Tabla 1), no

se observaron síntomas de la enfermedad causados por el hongo, pero la siembra posterior de trozos de tejido vegetal de dichas plántulas en medio de cultivo con AP, permitió detectar su presencia, al observar el desarrollo de las colonias características correspondientes a *A. padwickii*.

Tabla 1. Porcentaje de transmisión de *Alternaria padwickii* desde semillas a plántulas de arroz en suelo:arena:turba en base a sintomatología y recuperación del patógeno desde tejido asintomático.

VARIEDAD	DDS*	INCIDENCIA SEMILLAS (%)	TRANSMISIÓN (%)	ET (%)
Supremo 13	11	29.5	14.5	49.0
	30		1.98	6.70
CT 6919	11	76.00	5.45	7.20
	30		38.8	51.0

*DDS Días después de la siembra

En la variedad Supremo 13 (Empedrado) con una incidencia de *A. padwickii* de 29.5%, el hongo presentó una ET de 49 y 6.7% a los 11 y 30 DDS, mientras que en la variedad CT 6919 (Itá Ibaté) con una incidencia de 76% en las semillas, el patógeno también fue detectado a los 11 y 30 DDS con una ET de 7.2 y 51% respectivamente. La temperatura durante las cuales se desarrollaron las plántulas fue de 25-34° C, consideradas favorables para el desarrollo del patógeno.

Siembra de semillas en bandejas plásticas conteniendo arena estéril

En las plántulas originadas de semillas de arroz de las variedades Supremo 1 (Mercedes) y Fortuna (Perugorria) sembradas en arena estéril, se observaron síntomas en algunas plántulas emergidas, correspondiendo en este caso a una transmisión sintomática en los tejidos enfermos.

En la variedad Supremo 1, con una incidencia de 40% en las semillas, *A. padwickii* fue transmitido desde las semillas a las plántulas con síntomas, a los 7 y 20 DDS, con una ET de 87.5 y 30% respectivamente (Tabla 2).

Con respecto a la variedad Fortuna, la cual presentó una incidencia de 42.5% en las semillas, la ET del patógeno fue de 18.8 y 17.6 % a los 7 y 20 DDS.

Al analizar los resultados obtenidos en la transmisión del hongo en el sustrato compuesto por arena esterilizada, a los 7 DDS, se observó que algunas plántulas de arroz manifestaron síntomas de necrosis en coleóptilos con posterior desarrollo de

micelio con conidios y conidióforos de *A. padwickii* sobre los tejidos afectados (Figuras 2 y 3); de la misma manera, en algunas plántulas enfermas y a los 20 DDS, se observó oscurecimiento de los tejidos y desarrollo de micelio aéreo gris blanquecino así como también muerte de las mismas. La siembra posterior de trozos de tejido vegetal de dichas plántulas en AP, permitió confirmar la presencia del hongo al observar el desarrollo de las colonias características correspondientes a *A. padwickii* (Figura 4).

Tabla 2. Porcentaje de transmisión de *Alternaria padwickii* desde semillas a plántulas de arroz en arena en base a sintomatología y recuperación del patógeno desde tejido sintomático.

VARIEDAD	DDS*	INCIDENCIA SEMILLAS (%)	TRANSMISIÓN (%)	ET (%)
Supremo 1	7	40	35	87.5
	20		12	30
Fortuna	7	42.5	8	18.8
	20		7.5	17.6

*DDS Días después de la siembra

La detección de *A. padwickii* en los coleóptilos a los siete DDS, indicaría un temprano pasaje del inóculo desde la semilla infectada a los órganos aéreos.

En los dos experimentos realizados, se comprobó la transmisión del patógeno en las cuatro variedades analizadas, en los dos sustratos y en todas las edades de las plántulas. La transmisión del patógeno se manifestó mediante desarrollo de síntomas en plántulas sembradas en arena estéril y sin síntomas en plántulas sembradas en el sustrato compuesto por suelo:arena:turba. Estos resultados obtenidos en el presente trabajo, coinciden por lo reportado por Costa (1991), Groth *et al.*, (1991), Guerrero *et al.*, (1972), Islam *et al.*, (2000) y Mathur *et al.*, (1972), quienes también observaron el pasaje del patógeno desde la semilla infectada hacia las plántulas.

La arena esterilizada se constituiría en un sustrato que favorece el desarrollo del patógeno, ya que el mismo puede expresarse al no encontrar competencia con otros microorganismos.

Por tratarse de una asociación biológica entre el hospedante y el patógeno, en la eficiencia de transmisión planta-semilla y semilla-plántula interactúan diversos factores que pueden reducir o incrementar significativamente el pasaje del patógeno para los órganos foliares y/o radiculares de la planta hospedante y el posterior establecimiento del patógeno en un cultivo; entre éstos factores se encuentran los

siguientes: especie cultivada (edad, resistencia varietal), condiciones ambientales (humedad ambiental y del suelo, temperatura, viento, lluvias y luz), inóculo (viabilidad, localización en las semillas), prácticas culturales, tipo de suelo, pH, población de plantas, profundidad de siembra y época de siembra, fertilización, sobrevivencia del inóculo, vigor de la semilla, microflora del suelo y de la semilla, entre otros (Agarwal & Sinclair, 1985, Barba *et al.*, 2002, Neergaard, 1979). Algunos de los factores mencionados podría haber influenciado en el proceso de transmisión observado en la variedad Supremo 13 que presentó una menor ET (6.70%) a los 30 DDS que a los 11 DDS (49%). Este es un aspecto que debería ser analizado en futuros estudios.

Según Reis & Casa (1998), la simple presencia de un patógeno en la semilla no asegura su pasaje a las plántulas, por lo tanto, la transmisión del patógeno necesita ser demostrada y cuantificada. Además, es fundamental diferenciar el transporte del patógeno por medio de la semilla de un lugar a otro y su transmisión exitosa a la progenie del hospedante.

Por otro lado, el grado de severidad de ocurrencia de una enfermedad en la planta debería ser proporcional al transporte y transmisión del patógeno por las semillas. De la misma manera, la variabilidad genética existente en cuanto a la resistencia de las plantas al patógeno, debería extenderse también al nivel de transmisión para las semillas y de éstas hacia las plantas. Al respecto, existen trabajos realizados en los que fueron analizados dichos factores. Manandhar *et al.*, (1998), al estudiar la transmisión de semilla a plántula de *Pyricularia grisea*, observaron que la temperatura puede influir en la manifestación de los síntomas, debido a que plántulas que desarrollaron en condiciones de bajas temperaturas (15-20° C) no manifestaron lesiones de tizón, pero cuando dichas plántulas fueron transferidas a un ambiente con altas temperaturas (25-30° C), se detectaron lesiones de la enfermedad,

También Alizaga *et al.*, (1983) estudiaron el efecto de las temperaturas (25 y 30° C) y del sustrato (papel para germinación y arena estéril) sobre la manifestación de algunos hongos patógenos transportados en la semilla; concluyeron que el sustrato no tuvo efecto importante sobre la infección del patógeno para los ensayos de germinación, pero que la temperatura está estrechamente relacionada con la infección y su efecto sobre el desarrollo de las plántulas; es decir que a medida que aumenta el porcentaje de infección, el efecto de la temperatura resulta más importante. Es posible que la disminución del porcentaje de plántulas enfermas se deba a un efecto de la

temperatura sobre el desarrollo del patógeno, o a un desarrollo más vigoroso de las plántulas o a una combinación de ambos factores. Con respecto al presente estudio, se observó que las temperaturas en ambos experimentos (25-34° C en invernáculo, y 25-30° C en laboratorio), son consideradas favorables para la manifestación del patógeno.

Por otro lado, Prabhu & Vieira (1989) estudiaron la transmisión de *B. oryzae*, y consideraron que el tipo de sustrato utilizado influyó en la transmisión del hongo, siendo de 14 y 17% en suelo no esterilizado y vermiculita esterilizada respectivamente, aunque también constataron que existen diferencias entre las variedades de arroz, en cuanto a la transmisión de un mismo patógeno. Con respecto a esta situación, en el ensayo realizado en este estudio, el sustrato compuesto por arena estéril, permitió la manifestación del patógeno, coincidiendo por lo expresado por Prabhu & Vieira (1989), de la misma manera que también se observó un comportamiento diferente en cuanto a la transmisión en cada variedad analizada.

Faiad *et al.*, (1993) estudiaron la transmisión de *P. grisea* en semillas de arroz bajo condiciones controladas de temperatura y en diferentes profundidades de siembra; concluyeron que ambos factores no influenciaron en la tasa de transmisión, la cual tuvo un valor medio de 34%.

Malavolta *et al.*, (2002), al estudiar la transmisión de *B. oryzae*, concluyeron que la ET no presentó relación con el porcentaje de incidencia del patógeno en las semillas.

Para el cultivo del arroz, el proceso de transmisión aún no está bien esclarecido, por lo que se considera necesario analizar los factores que podrían estar involucrados en la transmisión de *A. padwickii* hacia las plántulas de arroz.

Durante el proceso de germinación de la semilla, el micelio que se encuentra en el pericarpio o en el endosperma reinicia su crecimiento. Los patógenos responden a estímulos en función de la presencia de agua. Durante el proceso de almacenamiento la semilla contiene de 12 a 13% de humedad, constituyéndose en un ambiente adverso para el crecimiento vegetativo de los patógenos infectantes como también para la germinación de la misma. Cuando la semilla entra en contacto con el agua, se hidrata y en ese momento el micelio reanuda su actividad vital, comenzando a crecer desde el interior hacia la superficie de la semilla (Reis *et al.*, 1999).

4.4. CONCLUSIONES

El hongo *Alternaria padwickii* puede transmitirse con una alta eficiencia, desde las semillas de arroz hacia las plántulas de 7 hasta 30 días después de la siembra.

El tipo de sustrato utilizado influye en la manifestación de los síntomas en las plántulas durante el proceso de transmisión.

Estos resultados constituyen la primera evidencia en Argentina, sobre el pasaje de *A. padwickii* de semillas infectadas hacia las plántulas de arroz.

La transmisión del hongo puede ser con síntomas y sin síntomas o latente en plántulas de arroz.



Figura 1. Plántulas procedentes de semillas de arroz de la variedad Supremo 13 (con 29.5 % de infección de *Alternaria padwickii*), sembradas en sustrato compuesto por suelo: arena:turba.



Figura 2. Plántulas enfermas de arroz de la variedad Supremo 1 procedentes de semillas sembradas en sustrato con arena, con desarrollo de síntomas y signos causados por *Alternaria padwickii*.



Figura 3. Secciones de plántulas de arroz de la variedad Supremo 1, recuperadas a los 7 DDS, con desarrollo de síntomas.



Figura 4. Desarrollo de colonias de *Alternaria padwickii* en trozos de tejidos de plántulas de arroz, sembrados en medio con agar poroto.

CAPITULO 5. METODOS PARA EL CONTROL DE *Alternaria padwickii* EN SEMILLAS DE ARROZ

5.1. INTRODUCCION

Los resultados del relevamiento de semillas de arroz en la provincia de Corrientes, confirmaron que *Alternaria padwickii* (D. Ganguly) M.B. Ellis está presente con alta incidencia y en el 100 % de las semillas analizadas, planteando de esta manera la necesidad de llevar a cabo medidas de control del patógeno (Mazzanti de Castañón y Gutiérrez de Arriola, 1999, 2001, Gutiérrez *et al.*, 2002).

La eliminación o reducción del inóculo en semillas puede ser realizada mediante su tratamiento por métodos biológicos, físicos o químicos, de los cuales el tratamiento químico de semillas presenta como ventajas ser económico y de fácil ejecución (Soave & Moraes, 1987).

Con respecto al control de *A. padwickii*, existen trabajos de investigación realizados específicamente para este hongo. Suryanarayana *et al.*, (1963), Vir *et al.*, (1971), Salazar & Alizaga (1996) e Islam *et al.*, (2000), demostraron que el tratamiento químico de semillas puede controlar la infección del patógeno.

Ribeiro (1996) recomienda realizar el tratamiento de semillas con fungicidas tomando como criterio los resultados obtenidos en un análisis de sanidad de las mismas, o bien, por la presencia de síntomas en cultivos de origen, principalmente cuando no se dispone de semillas de buena calidad sanitaria y en los casos de introducción de semillas de otras regiones. Al respecto menciona varios productos que fueron utilizados para el tratamiento de semillas de arroz, como por ejemplo, productos protectores (tiram y captan), sistémicos (carboxin y tiabendazol) o formulaciones mixtas (carboxin + tiram). Ribeiro también menciona a otros fungicidas de uso no generalizado, como la mezcla iprodione + tiram con muy buen control para patógenos de suelo y otros utilizados para el tratamiento foliar, pero que poseen buen comportamiento para el tratamiento de semillas, como el benomil y mancozeb. Además, cita también como eficientes para el tratamiento de semillas los fungicidas triadimenol, guazatine, guazatine + imazalil, imazalil, carbendazim, metil tiofanato, diniconazole y tebuconazole.

En Argentina, Gutiérrez *et al.*, (2005) observaron que los fungicidas ipconazole y carboxin + tiram redujeron la incidencia de *A. padwickii* en semillas de arroz.

Otro tipo de tratamiento de semillas es la termoterapia, la cual surge como alternativa más económica y con menores daños al medio ambiente, y consiste en la exposición de las semillas al calor, cuyo principio es la sensibilidad diferencial entre patógenos y semillas al calor; siempre se debe considerar el binomio temperatura-tiempo de exposición (Reis *et al.*, 2009).

Según lo expresa Machado (2000), al utilizar la termoterapia el agua en estado líquido es el vehículo más eficaz, proporcionando una conductividad de calor 2-5 veces mayor en relación a los demás vehículos. Al respecto, existen referencias sobre la utilización de este método en semillas de arroz; Suryanarayana *et al.*, (1963) y Mendez *et al.*, (1992), utilizaron este tipo de tratamiento y lograron disminuir la incidencia del hongo en semillas de arroz.

El objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología de tratamiento de semillas a fin de erradicar al hongo *A. padwickii* de las semillas de arroz.

5.2. MATERIALES Y METODOS

En el presente estudio se realizaron dos experimentos en laboratorio, utilizando semillas de arroz de la variedad Supremo 1 de la localidad de Mercedes, Corrientes, cosechada durante la campaña agrícola 2007-08.

5.2.1. Experimento 1. Tratamiento químico de semillas

Fue llevado a cabo en el laboratorio de Fitopatología, de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, Argentina, utilizando semillas con 40% de incidencia de *A. padwickii*.

Se evaluaron los fungicidas frecuentemente utilizados por productores y semilleros de la provincia de Corrientes, así como también otros principios activos

Los fungicidas y dosis utilizadas en g i.a.100 kg⁻¹ de semilla, fueron las siguientes: carbendazim (100 y 200 cc), carbendazim + tiram (150 y 300 cc), carboxin + tiram (250 cc), iprodione (100 cc), iprodione + triticonazole (100 + 25 cc) y tebuconazole (42 cc); una muestra sin tratar fue considerada como testigo.

Las semillas fueron tratadas con los productos químicos, agregando agua estéril al 2 % del peso de las semillas. Cada muestra consistió de 200 gramos de semilla. La aplicación de los fungicidas se realizó en un erlenmeyer de 500 cc, agregándolos gradualmente y removiendo por 10 minutos hasta que las semillas quedaron uniformemente cubiertas (Reis *et al.*, 1999). Posteriormente las semillas fueron sembradas en cajas de Petri con AP 3%.

Las cajas fueron incubadas a temperatura de 20-25° C con fotoperiodo de 12 h, durante 10-12 días. Se consideró semilla infectada a aquella que desarrolló conidios, conidióforos y/o micelio y esclerocios del patógeno.

El diseño experimental consistió de tratamientos completamente aleatorios con 4 repeticiones de 100 semillas/tratamiento.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de semillas infectadas; el porcentaje de control fue determinado con la siguiente fórmula (Carmona *et al.*, 2000):

$$\text{Control (\%)} = \frac{\text{Infección testigo (\%)} - \text{Infección tratamiento (\%)}}{\text{Infección testigo (\%)}} \times 100$$

Los datos fueron transformados a \sqrt{x} y analizados por medio del análisis de varianza y al test de Tuckey al 5 % de probabilidad, utilizando el programa Infostat 2006.

5.2.3. Experimento 2. Tratamiento de semillas con termoterapia y tratamiento de semillas con fungicida asociado a termoterapia.

Fue conducido en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Medicina Veterinaria (FAMV), de la Universidad de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, Brasil, utilizando semillas de arroz con incidencia de 39.5 % de *A. padwickii*.

El tratamiento de semillas consistió en: a) inmersión en agua a diferentes temperaturas (40, 50 y 60° C, en baño María) durante 0, 1 y 2 horas; y b) inmersión de semillas en una suspensión acuosa del fungicida iprodione (50% SC) en baño María en diferentes temperaturas (40, 50 y 60° C) y tiempos de inmersión (0, 1 y 2 horas).

Los tratamientos realizados en un diseño experimental (factorial) fueron los siguientes: 1) testigo (sin tratamiento); 2) 0 hora (inmersión de las semillas en agua, y en la suspensión acuosa del fungicida y retiro inmediato); 3) 1 hora; y 4) 2 horas de inmersión en cada una de las suspensiones.

En cada tratamiento 100 g de semillas (4000 semillas) fueron colocadas en recipientes de tejido de algodón (gasa); cada recipiente fue sumergido en 500 ml de agua o en la suspensión fungicida contenida en un recipiente de plástico en baño María. Después de cada tratamiento, las semillas fueron inmediatamente retiradas y colocadas sobre papel de filtro para el secado en aire forzado (ventilador) por 12 horas sobre una mesada de laboratorio. Posterior al secado, 200 semillas de cada tratamiento (cuatro repeticiones de 50 semillas) fueron sembradas en cajas de acrílico de 11x11 cm (25 semillas de cada caja) conteniendo medio selectivo de Reis (1983) y

posteriormente se incubaron a $24 \pm 2^\circ \text{C}$ en cámara de crecimiento, con fotoperíodo de 12 horas. Una parte de las semillas fueron enviadas al Laboratorio de Semillas de la FAMV (UPF), para realizar pruebas de germinación y vigor.

La cuantificación de la incidencia del hongo en las semillas se realizó a los 15 días después de la siembra, mediante la observación del número de semillas infectadas con microscopio estereoscópico a 50 x de aumento. Se consideró semilla infectada a la que presentó conidios y conidióforos y/o micelio y esclerocios del patógeno. Los datos fueron transformados a $\sqrt{x+1}$ y analizados mediante el programa Statistica 6.0 obteniéndose los gráficos de superficie de respuesta. Posteriormente, los datos fueron sometidos al análisis de varianza.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSION

5.3.1. Experimento 1. Tratamiento químico de semillas

Los fungicidas más eficaces fueron: iprodione, iprodione + triticonazole y tebuconazole, los cuales redujeron la incidencia de *A. padwickii* de 40% en el testigo, a 2.75; 6; y 8% respectivamente bajo condiciones *in vitro* (Tabla 1), siendo los porcentajes de control 93.75%; 85%; y 80% respectivamente. Los restantes fungicidas evaluados demostraron ser poco eficientes para disminuir la incidencia del hongo en las semillas.

El tratamiento con carbendazim + tiram en la dosis de 300 cc.100 kg⁻¹ permitió una reducción en la incidencia del hongo de 40% en el testigo a 18% en las semillas tratadas, en tanto que en la dosis de 150 cc.100 kg⁻¹ la incidencia de *A. padwickii* fue de 30%. Respecto al tratamiento con carboxin + tiram solamente permitió un control de 32.5% en las semillas infectadas por el patógeno.

En cuanto a los tratamientos a las semillas con el producto carbendazim en las dos dosis utilizadas (100 y 200 cc.100 kg⁻¹) no resultó ser eficiente por cuanto se obtuvo un porcentaje de control de 6.25 y 10% respectivamente.

Según lo explica Machado (2000), el fungicida iprodione posee un periodo de protección prolongado y actúa en forma preventiva y curativa, pero considera que aún se desconoce el espectro de control de este fungicida para los hongos asociados a las semillas de arroz, si bien Valarini *et al.*, (1988), y Sartorato *et al.*, (1990) informaron sobre la eficiencia del mismo en el control de *Drechslera oryzae* y *Phoma sorghina* asociados a las semillas de arroz.

Pereira *et al.*, (2002) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de iprodione, sobre el crecimiento micelial *in vitro* de hongos presentes en las semillas de arroz del estado de Minas Gerais y concluyeron que dicho producto puede inhibir el crecimiento de varios hongos Dematiaceos, como *Alternaria alternata*, *Curvularia oryzae* y *Drechslera oryzae*. Asimismo, el iprodione ha sido muy eficiente en otras Dematiaceas de otros cultivos, como la cebada o el trigo, para el control de hongos de los géneros *Bipolaris* y *Drechslera* (Carmona *et al.*, 2000, 2006), lo cual explicaría la fungitoxicidad específica de esta molécula contra este grupo de hongos.

Varios son los investigadores que evaluaron la eficiencia del carboxin + tiram en semillas de arroz. Prabhu & Vieira (1989) observaron que las semillas de arroz tratadas con carboxin + tiram presentaron un aumento en la germinación y buena sanidad de las plántulas; mientras que Mendez & Fonseca (1992) observaron disminución de la infección producida por *Phoma* sp. (22 a 1.5%) y *B. oryzae* (43 a 1%) en semillas tratadas con carboxin + tiram. También Parisi *et al.*, (2001) redujeron la incidencia de *Pyricularia oryzae*, *Phoma oryzae* y *Microdochium oryzae* al tratar las semillas con carboxin + tiram en una concentración mayor (60 + 60), y además concluyeron que debido a este tratamiento, no se produjo la transmisión de estos patógenos desde la semilla a las plántulas de arroz. Resultados similares fueron observados por Gutiérrez *et al.*, (2005) al evaluar *in vitro* la eficiencia de carboxin + tiram en semillas de tres variedades de arroz en las que observaron reducción en la incidencia de los hongos presentes entre ellos *Aspergillus* spp., *A. alternata*, *A. padwickii*, *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *G. graminis* var. *graminis*, *Gerlachia oryzae*, *Penicillium* sp., *Phoma* sp., y *Rhizopus* sp. Por otro lado, Schuch *et al.*, (2006) obtuvieron similares resultados con la mezcla carboxin + tiram en la dosis 300 cc.100 kg⁻¹ de semilla.; asimismo Silva.Lobo (2008) consideraron que la mezcla de carboxin + tiram resultó la de mejor comportamiento para mejorar la sanidad de semillas de arroz afectada con *D. oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *M. oryzae*, *Phoma* sp. y *P. oryzae*.

Respecto al efecto de carbendazim + tiram, Parisi *et al.*, (2001) probaron tres concentraciones de esta mezcla (30 + 70; 37.5 + 87.5; y 45 + 105), en semillas de arroz, y lograron erradicar a los hongos *Pyricularia grisea*, *Bipolaris oryzae* y *Microdochium oryzae* al utilizar la mayor concentración (45 + 105).

El tratamiento de semillas como una medida de control y erradicación de patógenos o de protección de las semillas durante la germinación, necesita estudios

más profundos, debido a que no se puede generalizar el tratamiento de semillas para todos las muestras, y teniendo en cuenta que existen lotes de semillas con porcentajes de infección tan elevados, que a pesar de observar una mejora en las condiciones de germinación y emergencia con el tratamiento, éste no compensa los costos debido a que no se logra eliminar totalmente el inóculo en las semillas. La utilización de fungicidas en la parte aérea de las plantas, es aconsejable para cultivos situados en regiones con presencia de enfermedades, o cuando las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de las mismas. En el caso de campos de producción de semillas (certificada o fiscalizada) el empleo de esta práctica es muy importante.

Según algunos estudios realizados, el control de *A. padwickii* es posible, de acuerdo a los trabajos realizados por Suryanarayana *et al.*, (1963) quienes demostraron que el tratamiento químico de semillas puede controlar la infección del patógeno y reducirla de 39 a 23%; asimismo Vir *et al.*, (1971) e Islam *et al.*, (2000) informaron que la utilización de los fungicidas benomil 0.3% y mancozeb 0.3% para el tratamiento de semillas elimina la presencia del hongo, independientemente del cultivar utilizado. También Salazar & Alizaga (1996) en Costa Rica evaluaron diez tratamientos fungicidas en dos modalidades de aplicación (en seco y en inmersión en suspensión acuosa) en semillas de arroz que presentaban 62% de germinación y 26% de plántulas enfermas portadoras de *B. oryzae*, *A. padwickii*, *C. lunata*, *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp. Los fungicidas utilizados fueron pencicuron, iprodione, procloraz, anilazina, hidróxido de estaño, carboxin + captan, iprodione + carbendazim y triadimenol; solamente carboxin + captan e iprodione + carbendazim lograron reducir el porcentaje de plántulas enfermas.

En la provincia de Corrientes, la utilización de fungicidas en semillas de arroz, no es una práctica realizada por los productores de la región. Por su parte, las empresas semilleras realizan el tratamiento de las mismas, principalmente con carboxin + tiram o carbendazim + tiram; sin embargo, no resultan eficientes para controlar *A. padwickii* lo cual ha sido comprobado al observar la frecuencia creciente del patógeno en los análisis de semillas. Posiblemente, para lograr un mejor control habría que analizar otros factores que influyen en la efectividad de un tratamiento, como diferentes dosis, cobertura del producto sobre las semillas, nivel de infección en las semillas, volumen de agua utilizado, etc. Al respecto, Schuch *et al.*, (2006), demostraron que la existencia de pilosidad en la cáscara de las semillas de arroz, puede resultar en una mayor retención de fungicidas formulados en polvo; observaron que en los tratamientos

utilizando mayores volúmenes de caldo fungicida, hubo mayor eficiencia en el control de hongos en relación al tratamiento con menor volumen de caldo, además de mejor cobertura del producto sobre las semillas.

Tabla 1. Efecto del tratamiento con fungicidas en el control de *Alternaria padwickii* en semillas de arroz de la variedad Supremo 1.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN (%) Y FORMULACIÓN	DOSIS (cc.100 ⁻¹ kg de semillas)	INCIDENCIA %	CONTROL %
Iprodione	50	100	2.75 ^a	93.75
Iprodione + triticonazole	50FS+10FS	100+25	6.00 ^a	85.00
Tebuconazole	6 FS	42	8.00 ^a	80.00
Carbendazim + tiram	25FS+25FS	300	18.0 ^b	55.00
Carboxin + tiram	20FS+20FS	250	27.0 ^{bc}	32.50
Carbendazim + tiram	25FS+25FS	150	30.0 ^{cd}	25.00
Carbendazim	50FS	200	36.0 ^{cd}	10.00
Carbendazim	50FS	100	37.5 ^d	6.25
Testigo			40.0 ^d	-

Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí por el test de Tuckey al 5% de probabilidad.

Durante esta experiencia, si bien los fungicidas iprodione, iprodione y triticonazole lograron reducir la infección de *A. padwickii*, no se logró la erradicación del patógeno con los fungicidas evaluados a las dosis correspondientes.

5.3.2. Experimento 2a.

Tratamiento de semillas de arroz con termoterapia

Las relaciones entre temperatura y tiempos de inmersión sobre la incidencia de *A. padwickii* fue representada por un modelo de regresión polimomial expresado por la ecuación $z = 10.012 - 1.91 * x + 0.188 * y + 1.748 * x^2 - 0.111 * x * y - 0.003 * y^2$.

En el tratamiento de las semillas de arroz a 40°C durante 0, 1 y 2 horas de exposición, no se observó variación en la incidencia del patógeno; los porcentajes de control fueron 6.3; 13.9; y 25.3% respectivamente, mientras que el poder germinativo se mantuvo entre 91-92.5% y el vigor fue de 90.25; 87.25; y 91%. Las diferencias en

la incidencia de *A. padwickii* se observaron cuando las semillas se sumergieron en agua durante 2 horas a 50°C, obteniéndose 84.8% de control, pero el poder germinativo y el vigor disminuyeron a 63.25 y 67% respectivamente en éste tratamiento (Tabla 2, Figuras 1 y 2).

Con el tratamiento de semillas a 60°C (0 hora de inmersión) se observó que el porcentaje de control fue de 64.55%, mientras que al exponer las semillas a 1 y 2 horas de inmersión, el patógeno fue erradicado, pero la germinación de la semilla fue 0.0%.

Tabla 2. Efecto del tratamiento de semillas de arroz, con diferentes temperaturas (°C) y tiempos de inmersión (horas), en la incidencia expresada en porcentaje de *Alternaria padwickii*.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPOS DE INMERSIÓN (HORAS)		
	0	1	2
0	A 9.90 a*	-	-
40	A 12.5 a	B 8.50 a	B 7.40 a
50	A 11.4 a	B 3.50 b	C 1.50 b
60	A 8.90 a	B 3.50 b	C 0.00 c

Medias seguidas por diferentes letras mayúsculas, dentro de la fila y medias seguidas por diferentes letras minúsculas dentro de cada columna presentan diferencias significativas (Tukey al 5 % de probabilidad de error).

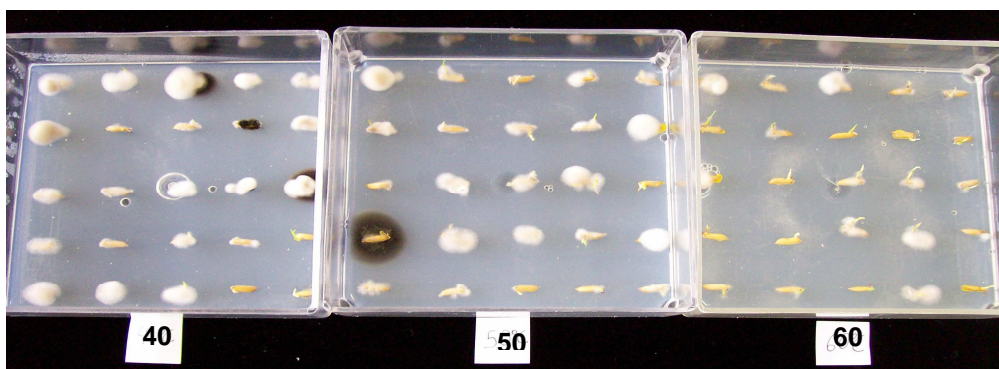


Figura 1. Tratamiento de semillas de arroz con termoterapia, a 40, 50 y 60°C y 0 hora de inmersión, observándose menor infección del patógeno, en el tratamiento a 60°C.

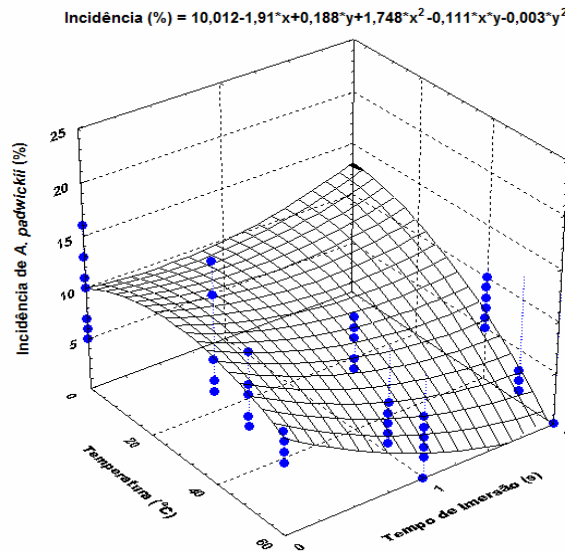


Figura 2. Efectos de diferentes temperaturas (y) y tiempos de inmersión (x) en la incidencia (z) de *Alternaria padwickii* en semillas de arroz, expresado como superficie de respuesta.

Experimento 2b.

Tratamiento de semillas con fungicida asociado a termoterapia.

Las relaciones entre temperaturas, tiempos de inmersión y control con el fungicida iprodione, se representó por la ecuación $z = 5.655+0.454*x-0.014*y+1.391*x^2-0.11*x^2y+0.0003*y^2$.

En el tratamiento de las semillas combinando termoterapia (40°C con 0,1 y 2 horas, y 50°C, con 0 hora de inmersión) y fungicida, los porcentajes de control observados (45.; 67; 67; y 45.5% respectivamente), no fueron eficientes, no observándose interacción entre estas temperaturas y los respectivos tiempos de inmersión sobre la incidencia del patógeno; pero el poder germinativo y el vigor de las semillas no fueron afectados. La combinación del tratamiento térmico-fungicida presentó un mejor control en la reducción de la incidencia del patógeno, al tratar las semillas a 50°C durante 1 y 2 horas de inmersión, obteniéndose 74.6 y 97.4% de control; no obstante en ambos tratamientos se observó disminución del poder germinativo (85-69%) y el vigor (90-72%) de las semillas (Tabla 3, Figuras 3, 4, 5 y 6).

La erradicación del patógeno se obtuvo con el tratamiento de 60°C e inmersión a partir de una hora, pero en estas condiciones las semillas no germinaron, indicando con esto la imposibilidad del uso práctico de esta combinación.

Los resultados obtenidos demuestran la dificultad de obtener un buen control de *A. padwickii* en semillas de arroz. Si bien se observó disminución en la incidencia del hongo en las semillas, el control no fue eficiente ya que determinados tratamientos afectaron el poder germinativo y el vigor de las semillas. Estos resultados son coincidentes con los trabajos realizados por Suryanarayana *et al.*, (1963), quienes lograron reducir la infección de *A. padwickii* de 30% a 4%, en el tratamiento de las semillas con agua caliente a 52°C por 10 minutos. También Mendez *et al.*, (1992) al evaluar el efecto del calor seco (70°C en flujo de aire continuo durante 4,8,12, y 15 días) en semillas de arroz, obtuvieron reducción en la incidencia de *Phoma* sp., *B. oryzae* y *B. sorokiniana*, pero al mismo tiempo el tratamiento afectó la germinación y vigor (90 a 77% y de 85 a 75% respectivamente); dichos autores concluyeron que el control de hongos en las semillas fue variable, dependiendo esencialmente de la especie de patógeno analizada y de la severidad de infección en las semillas.

Tabla 3. Efecto del tratamiento en porcentaje de semillas de arroz con iprodione (100cc. 100⁻¹kg de semillas) combinado con diferentes temperaturas (°C) y tiempos de inmersión (horas), sobre la incidencia de *Alternaria padwickii*.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPOS DE INMERSIÓN (HORAS)		
	0	1	2
0	A 5.60 a*	-	-
40	A 5.40 a	A 3.63 a	A 3.25 a
50	A 5.40 a	B 2.50 a	C 0.25 b
60	A 6.40 a	B 0.00 b	B 0.00 b

Medias seguidas por diferentes letras mayúsculas, dentro de la fila y medias seguidas por diferentes letras minúsculas dentro de cada columna presentan diferencias significativas (test de Tukey al nivel de 5 % de probabilidad).

Los resultados obtenidos indican la necesidad de continuar con este tipo de tratamiento aplicando la termoterapia en tiempo menores a una hora de inmersión a fin de controlar al patógeno pero sin afectar el poder germinativo y vigor. Por lo tanto, es necesario desarrollar métodos capaces de erradicar los patógenos necrotróficos de las semillas, independientemente de la incidencia. Sin embargo, las dificultades para lograr la eliminación del patógeno pueden ser atribuidas a la íntima asociación del microorganismo con el hospedante, localizado en el interior de la semilla y, a la similar sensibilidad fisiológica del embrión y del micelio del patógeno. Probablemente, esta situación favoreció la evolución conjunta del patógeno y del

hospedante en el tiempo. La semejanza fisiológica es la garantía a la supervivencia del patógeno y una dificultad para el control.

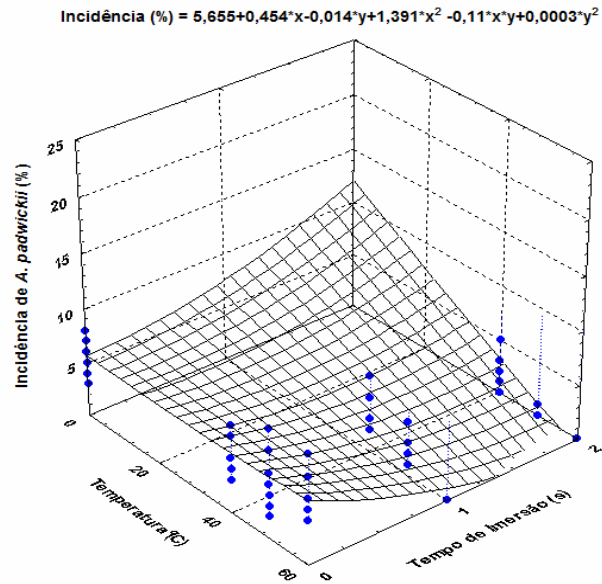


Figura 3. Efecto del tratamiento de semillas con el fungicida iprodione (100cc. 100^{-1} kg de semillas) sometido a diferentes temperaturas (y) y tiempos de inmersión (x) en la incidencia (z) de *Alternaria padwickii*, expresada como superficie de respuesta.



Figura 4. Tratamiento combinado de fungicida (iprodione) y termoterapia, 40°C (0, 1 y 2 horas de inmersión) en semillas de arroz, para evaluar el control de *Alternaria padwickii*.



Figura 5. Tratamiento combinado de fungicida (iprodione) y termoterapia, 50°C (0, 1 y 2 horas de inmersión) en semillas de arroz, para evaluar el control de *Alternaria padwickii*.



Figura 6. Tratamiento combinado de fungicida (iprodione) y termoterapia, 60° C (0, 1 y 2 horas de inmersión) en semillas de arroz, para evaluar el control de *Alternaria padwickii*.

CONCLUSIONES

Los procedimientos utilizados, tratamiento con fungicida y tratamiento conbinado de fungicida y termoterapia, no fueron eficientes para erradicar a *Alternaria padwickii* en semillas de arroz.

La erradicación por medios físico-químicos es difícil de ser obtenida en este patosistema.

Es necesario continuar con los estudios de control químico, a fin de investigar otros principios activos y/o coadyuvantes orgánicos que puedan controlar eficientemente a *Alternaria padwickii* presente en semillas de arroz.

CAPITULO 6. REVISION DE BIBLIOGRAFIA DE LA ESCALDADURA DE LA HOJA DEL ARROZ (*Microdochium oryzae*)

6.1. Antecedentes y ocurrencia

La escaldadura de la hoja tiene amplia distribución mundial, y está presente en varios países de América, Africa y Asia, tanto en cultivos de arroz bajo riego o en secano. Su agente causal es el hongo *Monographella albescens* (Thümen) Parkinson, Sivanesan & C. Booth (teleomorfo), *Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) Samuels & I.C. Hallet (anamorfo) (Boratynski, 1979, Filippi *et al.*, 2005, Kimati *et al.*, 2005, Ou, 1985, Webster & Gunnell, 1992).

La enfermedad ocasiona daños considerables que varían de 20 a 30% (Ou, 1985, Webster & Gunnell, 1992). Lamey & Williams (1972) consideraron a la enfermedad tan destructiva como el tizón del arroz (*Pyricularia oryzae* Cav.) en Nigeria; también Castaño, quién observó la enfermedad en Colombia por primera vez en 1971, la consideró tan importante como el tizón causado por *P. oryzae*, principalmente en arroz de secano y suelos ácidos (Castaño *et al.*, 1990, Ou, 1985). Según Ribeiro (1984) la escaldadura se manifestó en la década del 70 en Río Grande do Sul (Brasil), con ataques leves; pero la siembra de mayor superficie cultivada con variedades semienanas, más susceptibles a la enfermedad, ha aumentado su severidad en comparación con los ataques iniciales.

Filippi *et al.*, (2005) en Goiás, determinaron que al manifestarse la enfermedad al inicio del estado de embuchamiento (R4), produce muerte de hojas y por lo tanto paraliza el crecimiento de las plantas, afectando la cantidad y calidad de los granos que se encuentran en plena formación en esa fase; por lo general, los cultivos afectados pueden presentar un amarillamiento generalizado debido a las extremidades secas de las hojas.

En Brasil, en estudios realizados por Soave *et al.*, (1997) y Malavolta & Bedendo (1999a, 1999b) determinaron que *M. oryzae* junto a *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker y *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema, Dorenbosch & van Kest, son los hongos responsables de las manchas en semillas de arroz en la región Centro-Oeste, además de ser los más frecuentes, más severos y los que presentan los mayores coeficientes de correlación entre su incidencia en las semillas y la ocurrencia de manchas en las mismas, menor número de granos por panoja y pérdida de peso de las semillas; aunque la incidencia de *M. oryzae* puede variar según las localidades y el

año de cultivo. Hastings de Gutiérrez (1960) en Costa Rica, observó reducción en la productividad y en la calidad de los granos de las panojas cuando las plántulas fueron afectadas en su fase inicial.

6.2. Antecedentes en Argentina

La escaldadura de la hoja fue detectada por primera vez en Argentina en el año 1989, en cultivos de arroz de la localidad de Santo Tomé (Corrientes). Desde entonces la enfermedad ha aumentado su frecuencia de aparición en cultivos de la región nordeste de Argentina (Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1989, 1999, 2001, Rigonatto & Gutiérrez, 2006).

El agente causal de la enfermedad fue observado también asociado a granos manchados de panojas de arroz (Gutiérrez, 2002). En análisis sanitario de semillas de arroz de la región del NEA, el mismo fue detectado con valores de hasta 24% de incidencia (Gutiérrez *et al.*, 2002).

6.3. Sintomatología

6.3.1. Síntomas

Los síntomas de la escaldadura de la hoja se observan en hojas inferiores a fines del estado de macollaje y van evolucionando hasta la emergencia de la panoja, que es cuando el hongo afecta a los granos. La enfermedad se caracteriza por presentar diferentes síntomas según los estadios de la planta de arroz (desde plántula, con desarrollo de lesiones necróticas en láminas y vainas foliares, cuello de panojas a manchado de glumas de granos de arroz), y por esta razón, es que la enfermedad ha sido descripta con diferentes nombres en Japón y China. Los síntomas característicos son lesiones zonificadas alternantes de color castaño claro y oscuro, que se inician de las extremidades foliares o bordes constituyendo el síntoma foliar clásico; dichas lesiones se pueden unir y destruir grandes áreas de la hoja, y a medida que las lesiones envejecen, la zonificación se descolora, y las áreas necrosadas se extienden, dando a la hoja aspecto de escaldadura. Las lesiones por lo general se presentan sobre hojas maduras.

Otros síntomas causados por la enfermedad incluyen manchas pequeñas castaño rojizas sobre las hojas y áreas castañas sobre las vainas. Filippi *et al.*, (2005) informaron que cuando las condiciones no son favorables para el desarrollo de la enfermedad, los conidios del hongo producen numerosas puntuaciones pequeñas de

color castaño claro; síntomas semejantes también pueden ser observados sobre las vainas foliares. Por lo general estos síntomas se pueden confundir con otras enfermedades.

En Costa Rica, Hastings de Gutiérrez (1960) informó que la enfermedad causa un tizón de la panoja que da por resultado flores deformadas o estériles y una coloración castaño rojiza de las glumas; también produce muerte de coleóptilos y podredumbre de semilla. Rao *et al.*, (1977) en la India, observaron que el agente causal puede producir lesiones oscuras sobre las radículas y plúmulas, y muerte de plántulas.

Respecto a los otros síntomas, el bronceado de la vaina foliar se caracteriza por presentar áreas relativamente grandes de lesiones castañas sin necrosis y márgenes imprecisos; ambos tipos de síntomas son observados ocasionalmente en los trópicos, y por lo general estos síntomas sobre la vaina foliar, son fácilmente confundidos con los de otras enfermedades. La denominación de tizón de la punta de la hoja y desecación de la punta fueron los nombres dados a la enfermedad en Japón y China, debido a que no observaron los síntomas de lesiones zonificadas (Ou, 1985, Webster & Gunnell, 1992).

La coalescencia de lesiones pueden causar el tizón de una gran parte de la lámina foliar; se han observado lesiones de 25 cm. En Corea, Kwon *et al.*, en 1977 (citado en Ou, 1985) observaron, además de los síntomas foliares típicos, manchas pequeñas castaño rojizas sobre las hojas (tizón foliar castaño) y manchas oscuras, elípticas o rectangulares sobre las vainas foliares; también detectaron lesiones sobre el cuello o base de las panojas, semejantes a las observadas sobre la vaina foliar (Ou, 1985, Webster & Gunnell, 1992). La infección en las panojas consiste en coloración castaño rojiza de las glumas durante la formación de los granos (Ou, 1985).

De toda esta sintomatología, el síntoma más comunmente observado y de fácil reconocimiento en condiciones de campo en la provincia de Corrientes, es el que se manifiesta sobre las láminas foliares, con lesiones presentes en los ápices, o márgenes, y cuando han completado su desarrollo, presentan una típica zonificación, por la alternancia de bandas sucesivas castaño claro y oscuro (Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1999, 2001, Rigonato & Gutiérrez, 2006) (Figura 1).



Figura 1. Síntomas de la escaldadura de la hoja en cultivos de arroz de la provincia de Corrientes, observados en condiciones de infección natural.

6.3.2. Etiología

Forma anamórfica (imperfecta o asexual)

Microdochium oryzae (Hashioka & Yokogi) Samuels & I.C: Hallet (1983)

Bas. *Rhynchosporium oryzae* Hashioka & Yokogi 1955

Syn. *Gerlachia oryzae* (Hashioka & Yokogi) W. Gams 1980

Deuteromycotina, orden Moniliales, familia Moniliaceae

Forma teleomórfica (perfecta o sexual)

Monographella albescens (Thümen) Parkinson, Sivanesan & C. Booth 1981

Bas. *Metasphaeria albescens* Thümen 1889

Syn. *Micronectriella pavgii* R.A. Singh 1978

Griphosphaerella albescens (Thümen) von Arx 1981

Phragmosperma oryzae (Hashioka & Yokogi) Inoue & Takeda 1957

Ascomycotina, orden Xilariales, Incertae Sedis

El teleomorfo fue identificado por Wei en 1934 (citado en Ou, 1985), como *Metasphaeria albescens* Thümen, causante de la enfermedad de desecación de la extremidad foliar en China oriental; dicho autor realizó descripciones completas e ilustró ambos estados, conídico y ascógeno, pero la mayor parte de los investigadores al parecer no tuvieron conocimiento de su artículo, por lo que durante mucho tiempo, distintos investigadores aseguraron que el agente causal era *Fusarium nivale* Ces. Ex Sacc. Por otro lado, Parkinson *et al.*, (1981) cambiaron *Metasphaeria albescens* a

Monographella albescens (Thümen) Parkinson, Sivanesan y Booth, debido a los ascos unitunicados (*Metasphaeria* Sacc. es un género de loculoascomicetes bitunicado). Gams & Müller (1980) transfirieron el estado conídico de *Rhynchosporium oryzae* a *Gerlachia oryzae* debido a que dicho patógeno no presentaba afinidades con otras especies del género, excepto por sus conidios semejantes a *Rhynchosporium* (Ou, 1985).

Ou *et al.*, (1978) concluyeron que la formación y maduración de los peritecios aparentemente dependen del ambiente; si los tejidos enfermos se secaban rápidamente, los peritecios no se formaban o no maduraban; al respecto Crill *et al.*, (1979) (citado en Ou, 1985) produjeron el teleomorfo en cultivo, por el apareamiento de aislamientos monoascospóricos en medio de Sach, con hojas de arroz.

Las estructuras fúngicas de *M. oryzae* son las siguientes (Sivanesan, 1982):

Conidios falcados, unicelulares cuando jóvenes y de dos células cuando maduras, a veces 2 ó 3 septos, no estrechados en el septo, episporio muy delgado; formando masa de conidios de color rosado a salmón (esporodoquio) (rosados en masas, hialinos en el microscopio); 9-14 x 3-4.5 µm; se originan de células conidiógenas anelídicas en masas húmedas y viscosas (Figura 2). Los conidios son llevados sobre estromas superficiales que se elevan sobre las lesiones.

Peritecios subepidérmicos en los tejidos foliares, esféricos o ligeramente deprimidos, de 100-140 x 80-120 µm, castaño oscuros con un ostíolo; ascos cilíndricos a claviformes, a veces ligeramente curvos; son unitunicados y poseen un claro anillo apical el cual se colorea de azul con yodo; miden 40-65 x 10-14 µm; poseen ocho ascosporas oblicuamente uniseriadas a biseriadas, elípticas o algo fusiformes, incoloras, con 3 septos, a veces 4 septos, de 10-25 x 3-6 µm; paráfisis largas y delgadas, incoloras.

Características culturales: según Hashioka y Makino (Ou, 1985), *M. oryzae* presentó un buen desarrollo de la colonia en medios de cultivo con agar papa y en un medio especial con vitamina B1, pero su crecimiento fue escaso en medios sintéticos.

Cuando las colonias envejecen, el patógeno puede desarrollar masas de conidios de color rosado a salmón en el agar.

En medios agarizados, el hongo puede desarrollar dos tipos de colonias: a) colonias de aspecto algodonoso, blanquecinas con formación de masas cremosas de color salmón, y 2) colonias con micelio sumergido y solamente formación de masas de conidios de aspecto cremoso de color salmón, ambas correspondientes al estado

conídico del hongo. De la misma manera, sobre las semillas infectadas, también pueden desarrollarse 3 tipos de crecimiento: a) esporodoquios de color rosado o salmón sin micelio, b) esporodoquios con micelio y c) micelio esparcido con necrosis del coleóptilo (Pereira & Pierobon, 2004, Parkinson, 1980).

La temperatura óptima para el crecimiento del patógeno varía entre 24-28° C, y la luz no tiene efecto sobre el crecimiento del mismo (Ou, 1985).

6.4. Penetración y germinación del patógeno

El hongo penetra al hospedante a través de estomas. Cuando los conidios entran en contacto con la superficie foliar, se fusionan entre ellos por medio de tubos germinativos hasta formar un complejo conidial; luego desarrollan hifas que en contacto con el estoma forman estructuras semejantes a apresorios; posteriormente las hifas ingresan a las cavidad subestomática y desde allí a los espacios intercelulares e invaden a las células del mesófilo. Después de tres días desde el inicio del proceso de infección, los conidióforos emergen a través del estoma formando las masas de conidios (Ou, 1985).

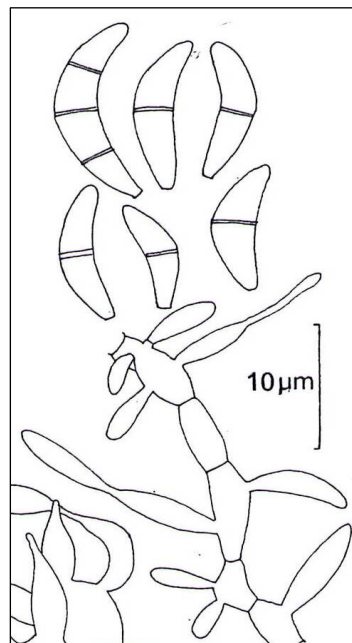


Figura 2. Hifas, células conidiógenas y conidios de *Microdochium oryzae* (Sivanesan, 1982).

La germinación de los conidios se produce entre 14 a 31°C de temperatura con un óptimo de 24°C (Ou, 1985). Según Faría & Prabhu (1980), la incubación en cámara húmeda (100%) por 92 horas es necesaria para la infección y desarrollo de la lesión.

6.5. Supervivencia y fuentes de inóculo primario

Sobrevivir es la capacidad de mantener la viabilidad ante situaciones límites o adversas. Esta fase se caracteriza por garantizar la existencia del patógeno ante condiciones adversas generalmente asociadas a la ausencia del hospedante cultivado y/o la presencia de condiciones climáticas desfavorables. En esta fase el patógeno se encuentra por lo general, sometido una intensa competencia microbiana (Reis *et al.*, 1999).

La escaldadura de la hoja es una enfermedad que se presenta en todos los ecosistemas de arroz. El hongo sobrevive en semilla de arroz y en restos secos de cultivo, aunque la semilla constituiría la principal fuente de inóculo de la enfermedad (Mew & Misra, 1994, Mew & Gonzales, 2002, Ou, 1985). Las salpicaduras del agua de lluvia, contribuyen a la dispersión a corta distancia del patógeno (Thomas, 1981).

En Costa Rica, Boratynski (1979) aisló el hongo de semillas, tejidos foliares y restos de plantas secas, consideradas fuentes de inóculo primario, y también detectó al estado sexual, *M. albescens*, en tejidos foliares y rastrojos secos.

Amu Sing & Sen Gupta (1980) comunicaron que *Echinochloa cruz-galli* (L.) P. Beauv. es considerada maleza hospedante del hongo y podría servir como fuente de inóculo (Mia *et al.*, 1986, Ou, 1985). En el Amazonia (Brasil) el arroz salvaje *Oryza glumepatula* y *O. grandeglumis* presentan síntomas severos de la enfermedad; Prabhu & Bedendo (1982) demostraron que todas las especies salvajes del género *Oryza* y otros seis géneros de gramíneas son susceptibles a *M. oryzae* en condiciones de inoculación artificial.

El hongo puede sobrevivir hasta 11 años en semillas de arroz almacenadas a 5°C de temperatura (Manandhar, 1999).

6.6. Condiciones ambientales

El desarrollo de la enfermedad, por lo general se manifiesta hacia las etapas finales de la estación de cultivo, sobre las hojas maduras; las condiciones ambientales favorables al desarrollo de la enfermedad son precipitaciones abundantes, temperatura media entre 24-28°C, períodos prolongados de rocío, alta densidad de plantas y

fertilización nitrogenada en exceso (Ou, 1985, Groth, 1991). Los daños causados por los insectos constituyen una puerta de entrada para el patógeno. La humedad del suelo y del ambiente afectan el desarrollo de la enfermedad. Según Castaño *et al.*, (1990), la enfermedad es grave en cultivos de arroz de secano, en ambientes húmedos y con alta fertilización nitrogenada.

6.7. Transmisión

Bedendo (1983) y Faiad *et al.*, (1993) observaron la transmisión de *M. oryzae* desde las semillas de arroz al comprobar plántulas enfermas procedentes de semillas infectadas por el patógeno. En tanto, Mia *et al.*, (1986) obtuvieron correlación significativa entre la infección en la semilla y lesiones en las plántulas en condiciones de invernáculo.

6.8. Control

Resistencia varietal: todas las variedades comerciales sembradas en cultivos bajo riego o en secano, presentan diferentes grados de susceptibilidad frente a la enfermedad (Ancalmo & Davis, 1962, Prabhu & Bedendo, 1990, Prabhu & Filippi (1997); en general, las variedades con hojas anchas son más susceptibles que las variedades con hojas estrechas y erectas. Al respecto, Prabhu & Bedendo (1990), observaron diferencias en el comportamiento de las variedades respecto a la resistencia a la enfermedad, al analizar por medio de inoculación artificial, 200 variedades y líneas nativas e introducidas de arroz.

Bonman *et al.*, (1990) observaron la ocurrencia de especialización patogénica en aislamientos de *M. oryzae*; la ausencia de patotipos en el hongo *M. albescens* es un indicio de que la naturaleza de la resistencia sea poligénica.

La variabilidad genética para resistencia a la escaldadura en germoplasma de arroz ya fue constatada en estudios realizados en invernáculo y a campo (Faria & Prabhu, 1980, Prabhu & Bedendo, 1990, Bonman *et al.*, 1990). El grado de resistencia en 32 gramíneas pertenecientes a 18 géneros y 11 especies diferentes del género *Oryza*, demostró que dentro de un mismo género todas las especies exhibieron reacción susceptible o resistencia, lo que indica solamente la existencia de diferencias intergenéricas (Prabhu & Bedendo, 1982).

Prácticas culturales: en estudios realizados por Prabhu *et al.*, (2005) en Goiás (Brasil) determinaron que la enfermedad es esporádica y por lo tanto, recomiendan

realizar un manejo adecuado del agua, rotación de cultivos y fertilización equilibrada, lo cual ayudaría a disminuir la incidencia de la enfermedad.

Tratamiento químico: según Prabhu & Filippi (1997), entre las medidas preventivas es aconsejable la utilización de semillas sanas; el tratamiento de semillas con fungicidas disminuye el inóculo inicial. La enfermedad evoluciona rápidamente en épocas lluviosas, dificultando la aplicación de fungicidas foliares en cultivos de arroz de secano, mientras que en cultivos bajo riego, podrían realizarse aplicaciones al inicio de la aparición de los síntomas, por lo que es necesario profundizar los estudios en regiones donde la enfermedad es endémica.

Thomas *et al.*, (1985) consideraron que la aplicación del fungicidas benomil al follaje y a las semillas, permitió obtener reducción en la infección del patógeno.

Filippi *et al.*, (2005) en Goiás (Brasil) realizaron un experimento a campo con los fungicidas triciclazole, tebuconazole y benomil, aplicados en forma individual, en la dosis 0.250 i.a. kg⁻¹ durante los estadios de embuchamiento y emisión de la panoja y concluyeron que los fungicidas tebuconazole y benomil disminuyeron significativamente la incidencia de la enfermedad.

El tratamiento de las semillas con carbendazim y tiram, aplicado 12 horas antes de la siembra es efectivo; en tanto que la aplicación de benomil y mancozeb, ambos a 0,3% kg⁻¹ de semilla, pueden erradicar al patógeno (Mew & Misra, 1994).

Silva-Lobo (2008) realizó un experimento evaluando la aplicación de los fungicidas carboxin + tiram, triciclazole, azoxistrobina y pyroquilon, en semillas de arroz con 22.5% de incidencia; los fungicidas carboxin + tiram y triciclazole fueron los tratamientos que lograron eliminar al hongo de las semillas.

En Argentina, Gutiérrez *et al.*, (2005) evaluaron *in vitro* la eficiencia de carboxin + tiram en semillas de 3 variedades de arroz en las que observaron reducción en la incidencia de *M. oryzae*.

Tratamiento físico: Mendez *et al.*, (1992), observaron que el tratamiento a las semillas infectadas con calor seco (70°C flujo de aire continuo durante 4, 8, 12, y 15 días), redujo la incidencia de *M. oryzae*. También Mendez & Fonseca (1992) analizaron el efecto del tratamiento térmico (57°C por 15 min, calor húmedo bajo agitación) y químico para hongos en semillas de arroz; dichos autores observaron que de los fungicidas utilizados, tales como carboxin + tiram (37.5% + 37.5% i.a.) en combinación con el tratamiento térmico, fue el más efectivo para reducir la incidencia del patógeno.

CAPITULO 7. DETECCIÓN DE *Microdochium oryzae* EN SEMILLAS DE ARROZ

7.1. INTRODUCCION

El cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) en la provincia de Corrientes es afectado por varias enfermedades de origen fúngico, entre las que la escaldadura de la hoja, causada por *Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) Samuels & Hallet, es considerada de importancia creciente (Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 2001).

La enfermedad está presente en varios países de América, Africa y Asia, ocasionando pérdidas considerables (Boratynski, 1979, Filippi *et al.*, 2005, Kimati *et al.*, 2005, Ou, 1985, Webster & Gunnell, 1982). También el hongo se observa asociado a granos de arroz, integrando el complejo causal del manchado de las glumas de arroz (Gutiérrez, 2002). Las semillas infectadas y los restos de cultivos, constituyen las principales fuentes de inóculo de la enfermedad (Mia *et al.*, 1986, Ou, 1985).

En relevamientos de cultivos de arroz de la región y en análisis de sanidad rutinarios, realizados con muestras de semillas de la región se pudo constatar que la presencia del hongo *M. oryzae* ha ido aumentando en estas últimas campañas agrícolas; esto indicaría que la semilla de arroz cumpliría un rol fundamental en la dispersión del patógeno por medio de la misma. Ante esta situación, es necesario contar con métodos de análisis que permitan detectar en forma eficiente y rápida, la presencia del hongo en las semillas. Al respecto, en la bibliografía se mencionan al método del papel de filtro (blotter test) y del agar, como los más sensibles para los análisis sanitarios, según los trabajos realizados por Boratynski (1979), Mia *et al.*, (1986), Mew & Misra (1994) y Shetty & Shetty (1988). Manandhar (1999), desarrolló un medio semiselectivo constituido por sucrosa como fuente carbonada y cloruro de potasio, con el agregado de varios antibióticos y un fungicida (mancozeb); en tanto Parkinson (1980) analizó el efecto de algunos medios de cultivo y de la luz, sobre la morfología y crecimiento del hongo; obtuvo buena esporulación en medio sólidos con 1% de peptona y 0.25% de glucosa. También Thomas (1981), observó buena esporulación del hongo en agar sucrosa, agar peptona y agar V8.

Los objetivos de este estudio fueron comparar cuatro métodos de análisis de semillas, a fin de seleccionar el más sensible en la detección de *M. oryzae* asociado a semillas de arroz y realizar un relevamiento sanitario de semillas de arroz de diferentes

localidades de la provincia de Corrientes, utilizando el método que resultó eficiente para la manifestación del patógeno.

7.2. MATERIALES Y METODOS

Se realizaron dos ensayos *in vitro* que fueron conducidos en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, Argentina: a) comparación de métodos de análisis de semillas para la detección de *M. oryzae*, y; b) relevamiento sanitario de semillas de las distintas áreas productoras a fin de determinar la prevalencia e incidencia actual de *M. oryzae*.

a) Comparación de métodos de análisis de semillas: se analizaron semillas de la variedad Fortuna, procedente de la localidad de Perugorría, Corrientes, naturalmente infectada con *M. oryzae* y cosechada durante la campaña agrícola 2006/07.

Para el análisis se utilizaron los siguientes métodos: papel de filtro (PF), agar papa glucosado (APG), agar poroto (AP) y agar extracto de malta (AEM) (Mathur & Kongsdal, 2003, Mew & Misra, 1994). En los medios agarizados se agregó un antibiótico (200 ppm de sulfato de estreptomicina).

Para el método del PF, se utilizaron cajas de Petri de 9 cm de diámetro, con papel de filtro humedecidos con agua estéril, sobre los que se depositaron 25 semillas de arroz. Para los métodos agarizados, las semillas fueron inicialmente tratadas en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% por 10 minutos y posteriormente fueron lavadas tres veces con agua estéril, durante cinco minutos cada uno (modificado de Mathur & Kongsdal, 2003). Las semillas fueron transferidas a cajas de Petri conteniendo el medio de cultivo correspondiente (depositando 10 semillas por caja de Petri).

Las cajas sembradas se incubaron a temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ con fotoperíodo de 12 h luz (NUV Philips lamps, model TL40W/52).

Fueron utilizadas 400 semillas de arroz por método analizado, con cuatro repeticiones de 100 semillas cada una. Después de 10-12 días de incubación, la identificación del patógeno se realizó utilizando microscopios estereoscópico y compuesto, considerándose semilla infectada a aquella que presentó las estructuras de fructificación del patógeno (esporodoquio y / o micelio).

La comparación estadística de los métodos de análisis, se realizó a través del análisis de la varianza y test de Tukey con 5 % de probabilidad.

b) Relevamiento sanitario de semillas de las distintas áreas productoras: se analizaron 18 muestras de semillas de diferentes variedades de arroz, con infección natural de *M. oryzae*, procedentes de cultivos ubicados en las diferentes regiones agroecológicas de la provincia Corrientes (Cuadro 2), en las campañas agrícolas 2006-2008. Para la recolección de las muestras, se siguió el mismo procedimiento detallado en el Capítulo III.

Para el análisis se utilizó el método que resultó ser más sensible para la detección del patógeno en las semillas. Se sembraron 400 semillas de arroz de cada lugar de muestreo (cuatro repeticiones de 100 semillas), previamente desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% por 10 minutos y posteriormente fueron lavadas tres veces con agua estéril, durante cinco minutos cada una. Las semillas fueron transferidas a cajas de Petri, depositando 10 semillas en cada una; la incubación se realizó durante 10-12 días, a temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ con fotoperíodo de 12 h luz, 12 h oscuridad.

La cuantificación de la incidencia del patógeno en semillas se realizó utilizando microscopios estereoscópico (45x) y compuesto (400x), considerándose semilla infectada a aquella que presentó las estructuras de fructificación del patógeno.

Características culturales y morfométricas. Las características culturales y morfométricas de *M. oryzae* se determinaron en agar papa glucosado 1.5%, pH 6, durante 8-10 días con fotoperíodo de 12 h. Se midieron hifas y conidios en agua estéril con microscopio compuesto (400x).

Identificación del estado sexual o perfecto de *Microdochium oryzae*. En los relevamientos realizados en las diferentes regiones agroecológicas del cultivo de arroz, se recolectaron láminas foliares con síntomas de la escaldadura de la hoja, las cuales fueron llevadas al laboratorio a fin de confirmar la identificación del agente causal. Con dichas muestras se confeccionaron cámaras húmedas, siembras y aislamientos del patógeno *in vitro*.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSION

a) Comparación de métodos de análisis de semillas. El hongo *Microdochium oryzae* fue detectado en semillas de arroz de la variedad Fortuna, en todos los métodos de análisis utilizados, registrándose los siguientes valores de incidencia: PF (4%), AEM (4%), APG (23%) y AP (41.25%) (Tabla 1).

En las semillas enfermas, *M. oryzae* produjo los siguientes síntomas: muerte de raicillas y coleóptilos, o inhibición de la germinación, desarrollando micelio algodonoso, de color blanquecino y/o esporodoquios de color salmón, sobre los tejidos enfermos (Figuras 1 y 2). En los métodos utilizados se observó que el patógeno puede manifestarse de maneras diferentes sobre las semillas y/o sustratos: desarrollando abundante micelio aéreo, algodonoso blanquecino y escasa presencia de esporodoquios de color salmón, o solamente formando una masa cremosa de conidios, de color salmón brillante, sin micelio (Figuras 3a y 3b). Cuando las semillas se sembraron en PF, *M. oryzae* desarrolló pequeños esporodoquios de color salmón, aislados, sobre las glumas de la semilla, sin micelio aéreo; en APG, AP y AEM, el hongo produjo micelio aéreo y/o esporodoquios típicos. Estas características culturales del hongo ya habían sido descritas por Parkinson (1980), quién encontró que la tasa de crecimiento y el grado de pigmentación de la masa de conidios, estaban influenciadas por el tipo de medio de cultivo utilizado; aquellos medios que contenían arroz pulido y arveja, produjeron buen crecimiento del micelio y conidios, a diferencia de los medios con agar papa dextrosa que desarrollaron abundante micelio aéreo. En agar harina de maíz, el micelio del hongo desarrolló sumergido en el medio de agar, pero con abundante producción de conidios.

El análisis estadístico demostró que el método AP fue más eficiente ($p < 0.05$) que PF, AEM y APG, para la detección del patógeno; no obstante se comprobó que al utilizarse dicho método también desarrolla *Alternaria padwickii* (Ganguly) M.B. Ellis, considerado actualmente un patógeno importante de las semillas de arroz. Con respecto a los métodos de PF y AEM, no se observaron diferencias significativas entre ambos.

b) Relevamiento sanitario de semillas de las distintas áreas productoras

En la Tabla 2 se indican los porcentajes de infección de *M. oryzae* en las semillas de arroz analizadas utilizando el método del AP, el cual resultó ser el de mayor sensibilidad para la detección del patógeno. En este sustrato a partir de las semillas enfermas desarrollaron las colonias características correspondientes al patógeno en estudio (Figura 4).

M. oryzae fue detectado en las semillas con valores variables de incidencia (2-55%) según las variedades de arroz y procedencias con una prevalencia de 90%. De esta manera se comprobó que *M. oryzae* posee una amplia distribución en la provincia

de Corrientes, al ser detectado en las muestras procedentes de las diferentes regiones de cultivo de arroz en la región.

Tabla 1. Incidencia de *Microdochium oryzae* en semillas de arroz, variedad Fortuna, con diferentes métodos de aislamiento.

MÉTODOS DE AISLAMIENTO	INCIDENCIA (%)
PF	4.00 a
AEM	4.00 a
APG	23.00 b
AP	41.25 c

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)
 PF=Papel de filtro; AEM=agar extracto de malta; APG=Agar papa glucosado; AP=Agar poroto.

En las últimas campañas agrícolas, el cultivo de arroz en la provincia de Corrientes, ha experimentado un aumento gradual de los rendimientos debido a la utilización de variedades más productivas y a mejoras en la aplicación de tecnologías. Esta situación junto a las variaciones climáticas, ha contribuido al aumento en la incidencia y/o severidad de algunas enfermedades y entre éstas se encuentra la escaldadura de la hoja del arroz.

Características culturales y morfológicas de *M. oryzae*.

En medio de APG, el hongo *M. oryzae* desarrolló dos tipos de colonias: a) colonias de aspecto algodonoso, blanquecinas con formación de masas cremosas de color salmón, y 2) colonias con micelio sumergido y solamente formación de masas de esporas de aspecto cremoso de color salmón, ambas correspondientes al estado asexual del patógeno (Figura 5). Estas características fueron concidentes con lo observado por Pereira & Pierobon (2004) y Parkinson (1980) al estudiar el crecimiento del patógeno en medios de cultivo *in vitro*.

A partir de las siembras *in vitro* de material enfermo, se obtuvieron aislamientos de *M. oryzae* en su estado asexual. Las estructuras de fructificación del patógeno son las siguientes: Conidios falcados, unicelulares, hialinos cuando jóvenes y de dos células cuando maduros, a veces hasta tres septos (no estrechados en el septo), episporio muy delgado; formando masas de conidios de color rosado a salmón (esporodoquios); los conidios miden 6-15 x 2.5-4.5 μm (Figura 6).

Las características culturales y morfométricas observadas fueron coincidentes con los de la bibliografía consultada (Ou, 1985, Sivanesan, 1982, Webster & Gunnell, 1992).

Identificación del estado sexual o perfecto, *Monographella albescens*.

El estado sexual o perfecto de *M. oryzae*, *Monographella albescens*, fue detectado en cultivos de arroz próximos a maduración, de las localidades de Itá Ibaté, Mercedes, Santo Tomé y Virasoro, en hojas verdes y senescentes. En los tejidos enfermos desarrollaron peritecios subepidérmicos (Figura 7) de color castaño claro a oscuro a la madurez; son globosos comprimidos, de 137.5-167.5 x 87.5-120µm; ascos cilíndrico-fusiformes, hialinos, a veces ligeramente curvos, de 40-65 x 10-14 µm, con 8 ascosporas oblicuamente uniseriadas a biseriadas, hialino-amarillentas, ligeramente curvas, oblongas, con 3-4 septos, midiendo 12.5-20 x 3-3.7 µm (Figura 8).

En algunos aislamientos comunes de *M. oryzae* en APG, de 20-30 días de edad, se desarrollaron peritecios maduros *in vitro*.

En Argentina, *M. oryzae* es el estado mas frecuente observado a campo. El teleomorfo podría proveer otra fuente de diseminación del patógeno y generar también variabilidad genética del hongo.

7.4. CONCLUSIONES

El medio de cultivo con agar poroto resultó ser el más sensible para la detección de *Microdochium oryzae* en semillas de arroz, y por lo tanto debería recomendarse en relevamientos de sanidad en semillas, cuantificación de la transmisión semillas-plántulas y de control químico.

Microdochium oryzae es un patógeno ampliamente distribuido en la región de cultivo de la provincia de Corrientes.

El agente causal de la enfermedad presenta dos formas de reproducción, asexual y sexual, desconociéndose hasta el momento la importancia de éste último.

Esta es la primera información sobre la presencia de *Monographella albescens* en cultivos de arroz de la provincia de Corrientes.

Tabla 2. Incidencia (%) de *Microdochium oryzae* en semillas de arroz de diferentes variedades y localidades, analizadas mediante el método de agar poroto.

VARIETADES DE ARROZ	LOCALIDADES DE LA PROVINCIA DE CORRIENTES	INCIDENCIA (%)
Taim	Mercedes	55.00
Fortuna	Perugorria	41.25
RP2	Mercedes	26.00
Supremo 13	Goya	26.00
Irga 417	Virasoro	26.00
Irga 417	Goya	22.00
Supremo 13	Mercedes	22.00
Supremo 13	Mercedes	13.00
Taim	Goya	12.00
CT8 6919	Goya	8.00
Supremo 13	Perugorría	8.00
L363	Goya	7.00
Taim	Empedrado	5.00
CT 6919	Empedrado	5.00
Supremo 13	Itá Ibaté	5.00
El Paso	Empedrado	3.00
Taim	Virasoro	2.00
Puitá Inta	Itá Ibaté	0.00



Figura 1. Muerte de raicilla y coleóptilo de semilla de arroz, causado por *Microdochium oryzae*.



Figura 2. Síntomas en semillas de arroz sembradas en medio de agar poroto, causados por *Microdochium oryzae*.



Figura 3a. Desarrollo de esporoquios de *Microdochium oryzae* sobre semilla de arroz de la variedad Fortuna.



Figura 3b. Desarrollo de esporoquios y micelio de *Microdochium oryzae* sobre semilla de arroz.



Figura 4. Desarrollo de colonias de *Microdochium oryzae* en semillas de arroz, sembradas en medio con agar poroto.

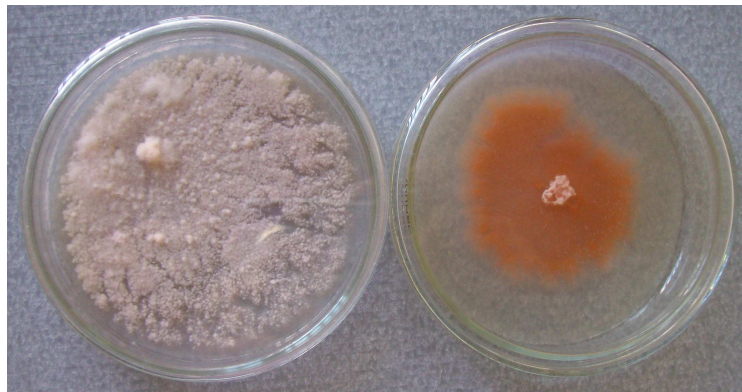


Figura 5. Colonias de *Microdochium oryzae* en medio de agar papa glucosa



Figura 6. Conidios de *Microdochium oryzae*.

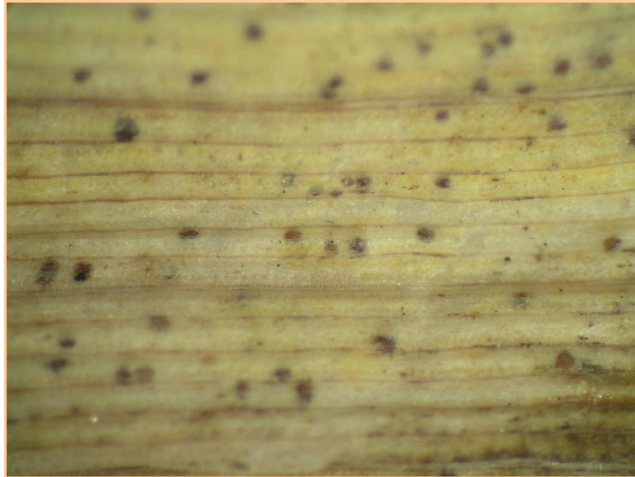


Figura 7. Peritecios de *Monographella albescens* en láminas foliares de arroz.

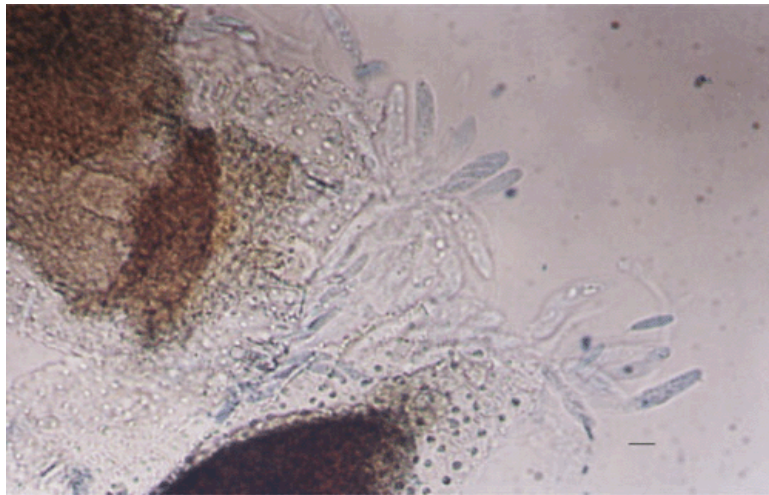


Figura 8. Ascus y ascosporas de *Monographella albescens*

CAPITULO 8. ESTUDIOS DE TRANSMISION DE *Microdochium oryzae*

8.1 INTRODUCCION

Las semillas de arroz constituyen una importante fuente de inóculo primario para diversos hongos patógenos, y entre éstos se destaca *Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) Samuels & Hallet (anamorfo) considerado actualmente un patógeno de aparición frecuente en cultivos de la provincia de Corrientes y agente causal de la escaldadura de la hoja del arroz (Gutiérrez *et al.*, 2002, Mazzanti de Castañón y Gutiérrez de Arriola, 2001).

El hongo *M. oryzae* es transportado por las semillas y de ésta manera es introducido en nuevos campos de cultivo (Ou, 1985, Mew & Misra, 1994, Webster & Gunnell, 1992).

Faiad *et al.*, (1993) observaron transmisión del hongo *G. oryzae* (= *Microdochium oryzae*) desde las semillas infectadas hacia las plántulas de arroz; en tanto, Mia *et al.*, (1986) obtuvieron correlación significativa entre la infección del patógeno en la semilla y lesiones en las plántulas en condiciones de invernáculo.

El objetivo de este estudio fue cuantificar la transmisión de *M. oryzae* desde la semilla hacia plántulas de arroz y probar la patogenicidad del hongo en plántulas de arroz en condiciones de invernáculo.

8.2 MATERIALES Y METODOS

Para la realización de este ensayo de transmisión se analizaron 400 semillas de arroz de la variedad Taim de la localidad de Mercedes, Corrientes, por medio del método con agar poroto 3%, pH 6, con el agregado de 200 ppm de sulfato de estreptomicina. Las semillas fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio 2% durante 10 minutos y posterior lavado en agua destilada estéril. Posteriormente se sembraron 10 semillas por caja de Petri y se incubaron en condiciones de 12 h luz, 12 h oscuridad durante 10-12 días.

Un total de 600 semillas fueron sembradas en macetas sopladas de plástico (300 cm³) con un sustrato compuesto por una mezcla de suelo:arena:turba (1:1:1) esterilizada (tres semillas por maceta), en condiciones de invernáculo, donde la temperatura varió entre 25-34° C.

A los 15 y 30 días de la siembra se extrajeron al azar 250 coleóptilos de plántulas asintomáticas a 1.0-1.5 cm por encima de la superficie del suelo, los cuales fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% para ser sembrados posteriormente en cajas de Petri conteniendo medio de AP; las cajas se incubaron durante 6-8 días en estufa a 25° C. El ensayo se repitió tres veces.

La eficiencia de transmisión (ET) del hongo desde la semilla hacia las plántulas se determinó mediante la incidencia de plántulas colonizadas por *M. oryzae* (C) y la incidencia en semillas infectadas por el patógeno (S): $ET = C (\%) / S (\%) \times 100$.

Pruebas de Patogenicidad: Para evaluar la patogenicidad de *M. oryzae*, 100 plántulas de arroz de 15 días de edad desarrolladas en macetas plásticas conteniendo una mezcla de suelo:arena:turba estéril fueron pulverizadas con una suspensión de esporas en agua destilada estéril (1×10^6 esporas/ml del hongo). El inóculo fue obtenido de colonias desarrolladas en APG 1.5%, pH 6, durante 10 días. Los testigos consistieron de igual número de plántulas pulverizadas con agua destilada estéril. Luego de la inoculación, las macetas con plántulas se mantuvieron en cámaras húmedas confeccionadas con soportes de madera y polietileno, durante 72 horas en invernáculo, a $25 \pm 2^\circ$ C bajo luz natural.

8.3 RESULTADOS Y DISCUSION

En las semillas de arroz de la variedad Taim sembradas en AP, la incidencia de *M. oryzae* fue de 55%; el hongo se manifestó desarrollando masas de conidios de color salmón sobre las glumas (lema y pálea) o sobre lemas estériles, y además afectando la germinación y provocando la muerte de plántulas.

Con respecto a la transmisión el patógeno presentó una ET de 2.18 % a los 30 días después de la siembra de plántulas asintomáticas en medio de AP, en las que se observó desarrollo de micelio y esporodoquios característicos del patógeno (Figuras 1 y 2). Sin embargo, no se observó transmisión del mismo a los 15 días después de la siembra.

Este valor de transmisión observado, puede ser considerado bajo si se lo compara con la alta incidencia del patógeno observada en las semillas (55%). El proceso de transmisión de un hongo llevado por la semilla hacia el cultivo, puede ser afectado por el ambiente y por las características inherentes al patógeno y al hospedante. Según Lima *et al.*, (1985), la edad de la planta en el momento de la infección es uno de los factores que puede afectar la transmisión. En tanto, Machado

(1988) concluye que esa relación biológica es afectada por varios factores físicos, biológicos y también por aquellos inherentes al tipo de germinación de las semillas.

Según Neergaard (1979), Maude (1996) y Agarwal & Sinclair (1985), además de los factores mencionados, es importante tener en cuenta la localización del patógeno en la semilla. Respecto a esto, Amu Singh & Sen Gupta (1981) solamente detectaron al patógeno en semillas no esterilizadas, y concluyeron que el hongo es llevado externamente. Sin embargo, Mia & Safeulla (1984), Mía *et al.*, (1986) y Thomas (1984) informaron que *M. oryzae* es un hongo frecuente en las semillas y puede encontrarse tanto externa como internamente, además de estar presente en todas las partes de la semilla de arroz (cáscara, endosperma y embrión).

Faiad *et al.*, (1993) estudiaron la transmisión del patógeno en semillas de arroz sembradas a diferentes profundidades de siembra (2, 4 y 6 cm), y concluyeron que el hongo fue transmitido de las semillas hacia las plántulas, independientemente de la profundidad de siembra, pero afectando el desarrollo inicial de aquellas plántulas procedentes de semillas infectadas. En tanto, Mia *et al.*, (1986) obtuvieron correlación significativa entre la infección del patógeno en la semilla y lesiones en las plántulas en condiciones de invernáculo; en el presente estudio no se observaron síntomas en las plántulas desarrolladas en invernáculo.

Pruebas de Patogenicidad: en las plántulas inoculadas con la suspensión de esporas de *M. oryzae*, el 100% manifestó síntomas de la enfermedad a partir de los seis días después de la inoculación. En dichas plántulas se observaron dos tipos de síntomas: a) lesiones zonificadas alternantes de color castaño claro y oscuro, que se inician de las extremidades foliares, y b) tizón foliar sin zonificación (Figura 3). A partir de dichos síntomas, el hongo causal fue reaislado en medio de APG, cumpliendo de ésta manera los postulados de Koch. En dicho medio el patógeno desarrolló colonias de crecimiento radial, de aspecto algodonoso, de color blanco con abundante producción de masas cremosas de esporas, de color salmón. Las características morfológicas, culturales y de patogenicidad, confirmaron la identificación de *M. oryzae*.

Según Rao *et al.*, (1977) y Boratynski (1979), el hongo puede ser considerado un patógeno débil debido a que en los estudios realizados por dichos investigadores, la presencia de heridas facilitó el ingreso del hongo al hospedante; ésta situación no se detectó en el presente estudio, debido a que se observaron los síntomas de la

enfermedad en el 100% de las plántulas inoculadas, concluyendo de esta manera, que las heridas no son necesarias para el ingreso del hongo en las plántulas.

El hongo *M. oryzae* puede ser detectado con frecuencia en muestras de semillas de arroz de la provincia de Corrientes y es capaz de ser transmitido desde las semillas hacia las plántulas de arroz.

8.4 CONCLUSIONES

El hongo *Microdochium oryzae* es capaz de transmitirse desde las semillas infectadas hacia plántulas de arroz.

La transmisión de *Microdochium oryzae* fue asintomática en plántulas de 30 días de edad.

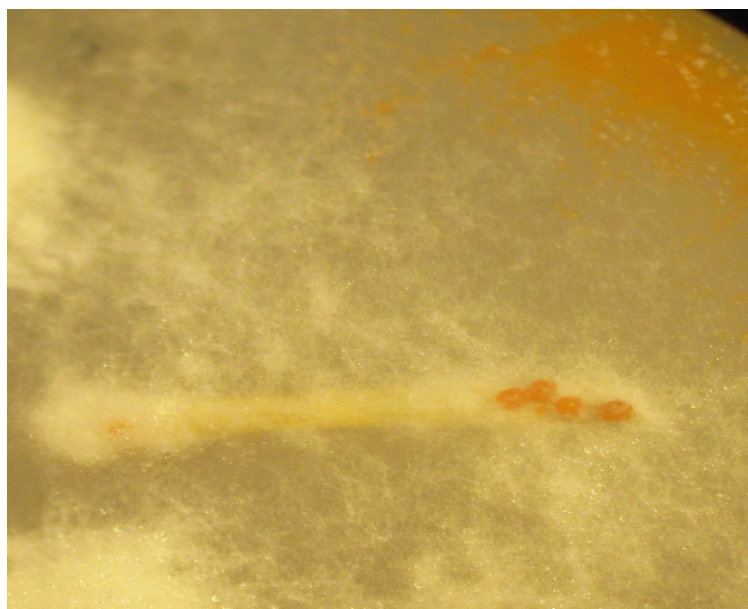


Figura 1. Trozo de tejido de coleoptilo de arroz sembrado en medio de AP, colonizado por *Microdochium oryzae* (desarrollo de micelio y esporoquios).



Figura 2. Esporodocios de *Microdochium oryzae* sobre ápice foliar de plántulas de arroz inoculadas y sembrada en medio de AP.

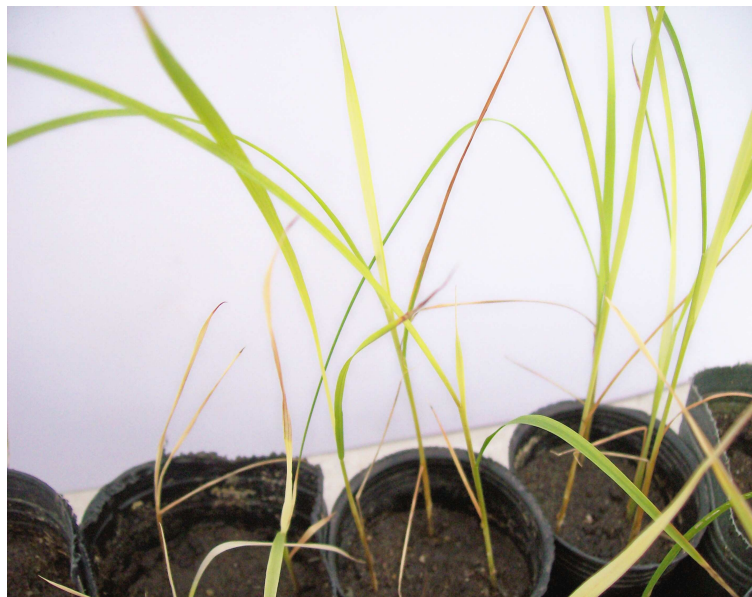


Figura 3. Síntomas de escaldadura de la hoja en plántulas de arroz, inoculadas con *Microdochium oryzae*.

CAPITULO 9. METODOS PARA EL CONTROL DE *Microdochium oryzae* EN SEMILLAS DE ARROZ

9.1 INTRODUCCION

Las semillas de arroz constituyen una importante fuente de inóculo primario para *Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) Samuels & Hallet (anamorfo) agente causal de la escaldadura de la hoja del arroz (Mew y Misra, 1994).

Con respecto al control de la enfermedad, Melvilla *et al.*, (1985) lograron la erradicación de *M. oryzae* al tratar las semillas durante 30 minutos, con 2500 ppm i.a. de benomil. Mew & Misra (1994) realizaron el tratamiento de las semillas de arroz con los productos benomil y mancozeb, ambos a 0.3% kg⁻¹ de semilla, y erradicaron al patógeno. También Filippi *et al.*, (2005) en Goiás (Brasil) realizaron un experimento a campo con los fungicidas triciclazole, tebuconazole y benomil, aplicados en forma individual, en la dosis 0.250 i.a. kg⁻¹ durante los estadios de embuchamiento y emisión de la panoja y concluyeron que los fungicidas tebuconazole y benomil disminuyeron significativamente la incidencia de la enfermedad.

Por otro lado, Celmer *et al.*, (2007), observaron que la aplicación de los fungicidas tebuconazole y trifloxystrobin + propiconazol en el estado de embuchamiento (R4), fueron eficientes en el control de la enfermedad, al obtener aumentos en los rendimientos en las variedades tratadas; asimismo consideraron que las enfermedades foliares pueden impactar negativamente en la producción de granos, al observar reducción en los rendimientos del tratamiento testigo con relación a los tratamientos con fungicidas. Por lo expuesto, consideran que el control químico de enfermedades, es una estrategia esencial de manejo del cultivo de arroz bajo riego, para maximizar los rendimientos.

Según los estudios realizados por Ribeiro (1996) en Brasil, dependiendo de la región y del sistema de cultivo utilizado en arroz, se pueden presentar variaciones ecológicas y de manejo en las prácticas culturales, que podrían determinar diferencias en los niveles de infección y consecuentemente en la importancia de la diseminación de enfermedades por medio de las semillas. Es así que al analizar lotes de semillas de arroz infectadas, y observar un aumento en la incidencia de *Microdochium oryzae* la cual superó los patrones de tolerancia, destacó la importancia que ha adquirido la enfermedad en el cultivo, así como la presencia del patógeno en las semillas. Debido a

esta situación, consideró necesario analizar en detalle la utilización de fungicidas para el control de patógenos de semillas.

Según Prabhu & Filippi (1997) entre las medidas preventivas para el control de la escaldadura de la hoja, es aconsejable la utilización de semillas sanas tratadas con fungicidas para disminuir el inóculo inicial. Al respecto existen algunos trabajos realizados, en los que resaltan la efectividad del tratamiento químico de las semillas de arroz, y entre los que se pueden citar los realizados por Pereira *et al.*, (2002), Schuch *et al.*, (2006), Silva-Lobo (2008) en Brasil, y Gutiérrez *et al.*, (2005), en Corrientes; todos ellos lograron una disminución de la incidencia de *M. oryzae* al tratar las semillas con diferentes fungicidas.

Además del tratamiento químico de semillas, se puede aplicar el tratamiento térmico, tal como lo realizaron Mendez *et al.*, (1992) y Mendez & Fonseca (1992), que analizaron el efecto del tratamiento térmico y térmico-químico en el control de *M. oryzae*.

Ante esta situación, y debido a la necesidad de evaluar medidas de control del patógeno en las semillas, el objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología de tratamiento para erradicar al hongo *M. oryzae* presente en las semillas.

9.2 MATERIALES Y METODOS

En el presente trabajo se realizaron dos experimentos conducidos en laboratorio según se detalla a continuación:

9.2.1. Experimento 1. Tratamiento químico de semillas de dos variedades de arroz.

Fue realizado en el laboratorio de Fitopatología, de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, Argentina.

Se utilizaron dos variedades de semillas de arroz, variedad Taim (con 5% de infección de *M. oryzae*) y Supremo 13 (con 22% de incidencia). Las semillas de las dos variedades fueron cosechadas durante la campaña agrícola 2007-08, y procedieron de la localidad de Mercedes, Corrientes. El patógeno fue detectado mediante análisis *in vitro* de las semillas utilizando el método del agar poroto 3%.

Los fungicidas y dosis utilizadas en g i.a.100 kg⁻¹ de semilla, fueron las siguientes: carbendazim (100 y 200 cc), carbendazim + tiram (150 y 300 cc), carboxin + tiram (250 cc), iprodione + triticonazole (100 + 25 cc) y tebuconazole (42 cc); una muestra sin tratar fue considerada como testigo.

Las semillas fueron tratadas con los productos químicos, agregando agua estéril al 2 % del peso de las semillas. Cada muestra consistió de 200 gramos. La aplicación de los fungicidas se realizó en un erlenmeyer de 500 cc, agregándolos gradualmente y removiendo por 10 minutos hasta que las semillas quedaron uniformemente cubiertas (Reis *et al.*, 1999). Posteriormente las semillas fueron sembradas en cajas de Petri conteniendo medio de AP.

Las cajas se incubaron a temperatura de 20-25° C con fotoperiodo de 12 h, durante 10-12 días, considerándose semilla infectada a aquella que presentó las estructuras de fructificación del patógeno (esporodoquio y / o micelio).

El diseño experimental consistió de tratamientos completamente aleatorios con 4 repeticiones de 100 semillas por tratamiento.

Los resultados se expresaron como porcentaje de semillas infectadas; el porcentaje de control fue determinado con la siguiente fórmula (Carmona *et al.*, 2000):

$$\text{Control (\%)} = \frac{\text{Infección testigo (\%)} - \text{Infección tratamiento (\%)}}{\text{Infección testigo (\%)}} \times 100$$

Los datos fueron transformados a \sqrt{x} y analizados por medio del análisis de la varianza y test de Tuckey al 5 % de probabilidad, utilizando el programa Infostat (2006).

9.2.2. Experimento 2. a) Tratamiento de semillas con termoterapia y b) Tratamiento de semillas con fungicida asociado a termoterapia.

Fue conducido en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (FAMV-UPF), Passo Fundo, Brasil.

Se utilizaron semillas de arroz de la variedad Supremo 1 (con infección natural de 5%), cosecha 2007-2008, procedentes de la localidad de Mercedes (Corrientes).

El tratamiento de semillas consistió en: a) inmersión en agua a diferentes temperaturas (40, 50 y 60°C, en baño María) durante 0, 1 y 2 horas, y b) inmersión de semillas en una suspensión acuosa del fungicida iprodione (50% SC) en baño María en diferentes temperaturas (40, 50 y 60°C) y tiempos de inmersión (0, 1 y 2 horas).

Para la realización de los diferentes tratamientos de la semilla, se aplicó la misma metodología ya desarrollada en el Capítulo 5, páginas 71-72 del presente trabajo.

La cuantificación de la incidencia del hongo en las semillas se registró a los 15 días después de la siembra mediante la observación del número de semillas infectadas con microscopio estereoscópico a 50 x de aumento. Se consideró semilla infectada a la que presentó esporodoquios y / o micelio del hongo objeto de estudio.

Los datos fueron transformados a $\sqrt{x+1}$ y analizados mediante el programa Statistica 6.0, obteniéndose los gráficos de superficie de respuesta. Posteriormente, los datos fueron sometidos al análisis de varianza.

9.3 RESULTADOS Y DISCUSION

9.3.1. Experimento 1.

Tratamiento químico de semillas de dos variedades de arroz.

La eficiencia de los fungicidas evaluados fue diferente según las variedades analizadas. En semillas de la variedad Taim, los tratamientos más eficaces fueron carbendazim + tiram (en las dosis 300 cc y 150 cc.100 kg⁻¹), carbendazim (300 cc.100 kg⁻¹) e iprodione + triticonazole; mientras que para la variedad Supremo 13, los fungicidas que demostraron mejor comportamiento fueron carbendazim + tiram (en la dosis 300 cc.100 kg⁻¹) y carboxin + tiram (Tablas 1 y 2).

Los tratamientos realizados en las semillas de la variedad Taim, con los productos carbendazim + tiram (en la dosis de 300 cc.100 kg⁻¹), carbendazim (300 cc.100 kg⁻¹) e iprodione + triticonazole, permitieron obtener 100% de control de *M. oryzae* en las semillas, a diferencia de los restantes productos probados (tebuconazole, carbendazim 200 cc y 100 cc.100 kg⁻¹, y carboxin + tiram), cuya eficiencia de control del patógeno, fue de 80%, 80%, 70%, y 60% respectivamente.

Con respecto a los tratamientos aplicados a semillas de la variedad Supremo 13, los fungicidas carbendazim + tiram (en la dosis 300 cc.100 kg⁻¹) y carboxin + tiram permitieron una reducción en la incidencia de *M. oryzae* de 22% en el testigo a 5% en las semillas tratadas con ambos productos; mientras que en los tratamientos realizados con los productos carbendazim + tiram (150 cc.100 kg⁻¹) y tebuconazole, la infección en las semillas tratadas alcanzó a 6.50%, correspondiendo a un 70.45% de control. En cuanto al tratamiento de las semillas con el producto carbendazim en las tres dosis utilizadas (300, 200 cc y 100 cc.100 kg⁻¹), el mismo no resultó ser eficiente por cuanto se obtuvo un porcentaje de control de 63.63, 52.37, y 45.54% respectivamente.

Tabla 1. Efecto de fungicidas en el control de *Microdochium oryzae* en semillas de arroz de la variedad Taim.

Tratamientos	Concentración (%) y formulación	Dosis (cc.100 ⁻¹ kg de semillas)	Incidencia %	Control %
Carbendazim + tiram	25FS+25FS	300	0.00	100a
Carbendazim + tiram	25FS+25FS	150	0.00	100a
Carbendazim	50FS	300	0.00	100a
Iprodione + triticonazole	50FS+10FS	100+25	0.00	100a
Tebuconazole	6 FS	42	1.00	80ab
Carbendazim	50FS	200	1.00	80ab
Carboxin + tiram	20FS+20FS	250	1.50	70ab
Carbendazim	50FS	100	2.00	60b
Testigo	-	-	5.00	C

Los resultados obtenidos en este estudio con algunos de los fungicidas probados, coinciden con los observados por otros investigadores. Al respecto, Parisi *et al.*, (2001) probaron tres concentraciones de la mezcla carbendazim + tiram (30 + 70, 37.5 + 87.5, y 45 + 105), en semillas de arroz, y lograron erradicar a *M. oryzae* al utilizar la mayor concentración (45 + 105). En este estudio, la mezcla carbendazim + tiram en la mayor dosis empleada (300 mL) fue muy eficiente para el control de *M. oryzae* en la variedad Taim (al lograr un control de 100%), mientras que en la variedad Supremo 13 alcanzó a 77.27 %. La diferencia en la respuesta de las dos variedades a un mismo tratamiento puede ser debida a los valores diferentes de infección que presentaba cada una de ellas.

Con respecto a la mezcla carboxin + tiram utilizado, los resultados observados en la variedad Supremo 13 también coincidieron con los obtenidos por otros investigadores. Parisi *et al.*, (2001) redujeron la incidencia de *M. oryzae* al tratar las semillas con carboxin + tiram en una concentración mayor (60 + 60) y además, concluyeron que debido a este tratamiento no se produjo la transmisión del patógeno desde la semilla a las plántulas de arroz. Asimismo, Schuch *et al.*, (2006) y Silva-Lobo (2008) en Brasil, obtuvieron una disminución de la incidencia de *M. oryzae* al tratar las

semillas con el fungicida; similares resultados ya habían sido obtenidos por Gutiérrez *et al.*, (2005) en el tratamiento de las semillas de arroz.

Otro de los tratamientos que resultaron efectivos en el control de *M. oryzae* fue el compuesto por la mezcla iprodione + triticonazole, los que permitieron un control de 100% del patógeno presente en las semillas de la variedad Taim.

Con respecto al iprodione, Pereira *et al.*, (2002) evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de este producto sobre el crecimiento micelial *in vitro* de varios hongos asociados a las semillas de arroz del estado de Minas Gerais, entre los que se encontraba *M. oryzae*, y observaron que el mismo puede inhibir con alta eficacia el crecimiento micelial *in vitro* del patógeno.

Si bien el cultivo de arroz es considerado de importancia económica para la región nordeste de Argentina, son escasos los trabajos realizados sobre la aplicación de fungicidas en semillas y en cultivo para el control de las enfermedades. Esta situación ha llevado a un aumento en la incidencia de patógenos en las semillas, así como en la prevalencia e incidencia de algunas enfermedades fúngicas, ya observado por Mazzanti de Castañón y Gutiérrez de Arriola (1999, 2001), Gutiérrez *et al.*, (2002) y Rigonato y Gutiérrez (2006). De esta manera, es necesario profundizar los estudios sobre la utilización de otros principios activos y de diferentes dosis, para el control de patógenos que afectan al cultivo de arroz.

Prabhu & Filippi (1997) proponen que como medidas preventivas para el control de la escaldadura de la hoja, se debería realizar el tratamiento de semillas con fungicidas para disminuir el inóculo inicial. Esto también coincide con lo observado por Celmer *et al.*, (2007) en Brasil, quienes consideran que el control químico de enfermedades puede ser una estrategia esencial de manejo del cultivo de arroz bajo riego para maximizar los rendimientos y también para disminuir la presencia de inóculo en semillas de arroz.

9.3.2. Experimento 2.

a) Tratamiento de semillas con termoterapia

Las relaciones entre temperatura y tiempos de inmersión sobre la incidencia de *M. oryzae* en semillas de arroz de la variedad Supremo 1, fue representada por un modelo de regresión polinomial expresado por la ecuación $z = 1.273 - 1.113 * x + 0.023 * y - 0.108 * x^2 + 0.022 * x * y - 0.0008 * y^2$ (Figura 1).

En el tratamiento de las semillas a 40°C y su interacción con los tres tiempos de inmersión, se observó que a cero hora de exposición se obtuvo un 30% de control de *M. oryzae*, mientras que al exponer las semillas al tratamiento durante 1 y 2 horas, se observó un 100% de control del mismo; el PG se mantuvo entre 91-92.5% y el vigor fue de 90.25 y 87.25% respectivamente. Similar situación se observó cuando las semillas se sumergieron al tratamiento con agua caliente a 50°C, durante 0, 1 y 2 horas de exposición, pero a diferencia del tratamiento anterior, se observó que el PG disminuyó de 91.75% a 63.25%, y el vigor de 87.75% a 67% respectivamente. Cuando las semillas se sumergieron en agua caliente a 60°C, durante 0, 1 y 2 horas, se obtuvo 100% de control, pero no hubo germinación de las semillas tratadas (Figura 1, Tabla 3).

Tabla 2. Efecto de fungicidas en el control de *Microdochium oryzae* en semillas de arroz de la variedad Supremo 13.

Tratamientos	Concentración (%) y formulación	Dosis (cc.100 ⁻¹ kg de semillas)	Incidencia %	Control %
Carbendazim + tiram	25FS+25FS	300	5.00	77.27a
Carboxin + tiram	20FS+20FS	250	5.00	77.27a
Carbendazim + tiram	25FS+25FS	150	6.50	70.45ab
Tebuconazole	6 FS	42	6.50	70.45ab
Carbendazim	50FS	300	8.00	63.63ab
Iprodione + triticonazole	50FS+10FS	100+25	10.0	54.54ab
Carbendazim	50FS	200	10.5	52.27b
Carbendazim	50FS	100	12.0	45.45ab
Testigo	-	-	22.0	c

Si bien en los tratamientos a 50°C y 60°C se logró la erradicación de *M. oryzae* presente en las semillas con 5% de infección, en base a los resultados obtenidos, se considera necesario realizar más estudios para evaluar la eficiencia de éste método en semillas de variedades de arroz con diferentes niveles de infección.

Con respecto a antecedentes sobre este tipo de tratamiento para el control de *M. oryzae*, Mendez *et al.*, (1992) evaluaron el efecto del calor seco (70°C en flujo de aire

continuo durante 4,8,12, y 15 días) sobre la población de hongos en semillas de arroz, y concluyeron que dicho tratamiento disminuyó (a los 15 días) la incidencia del patógeno, de 45 a 26%, una reducción en el poder germinativo (de 90 a 77%) y de 85 a 75% en el vigor de las semillas. Al mismo tiempo, Mendez & Fonseca (1992) también evaluaron el tratamiento térmico (calor húmedo) de semillas de arroz, a 57°C, durante 15 minutos y obtuvieron una reducción en la incidencia de 45% a 27.5%. En ambos experimentos, no lograron la erradicación del patógeno.

b) Tratamiento de semillas con fungicida asociado a termoterapia.

Las relaciones entre temperatura y tiempos de inmersión sobre la incidencia de *M. oryzae* en semillas de arroz de la variedad Supremo 1, fue representada por un modelo de regresión polinomial expresado por la ecuación $z = 1.004 - 1.036 * x + 0.0001 * y + 0.145 * x^2 + 0.012 * x * y - 0.0003 * y^2$ (Figura 2).

En el tratamiento de las semillas de arroz, combinando termoterapia (40° C con 0 hora de exposición) y fungicida, el mismo no fue eficiente en el control del patógeno, alcanzando un 50% de control, mientras que a igual tratamiento (40° C) pero con 1 y 2 horas de exposición se obtuvo un control de 90%; el PG y el vigor de las semillas, fueron de 94-95% y de 94.7 y 91.2% respectivamente; mientras que al exponer las semillas a 50° C y 0 hora, el porcentaje de control fue de 70%; en tanto que en los subsiguientes tratamientos (50° C, con 1 y 2 horas) se obtuvo un 100% de control, ocasionando una reducción en el PG y vigor de las semillas (85%- 69.5% y 90.70 y 72% respectivamente). La erradicación del patógeno se obtuvo a 60° C, en los tres tiempos de exposición; en el primer tiempo analizado, la germinación y el vigor se mantuvieron en 95.75% y 95.5% respectivamente, pero con 1 y 2 horas de exposición al calor, no se observó germinación de las semillas tratadas (Tabla 4, Figura 2).

En cuanto a los antecedentes sobre este tipo de tratamiento a las semillas de arroz, Mendez *et al.*, (1992) lograron reducir la infección de *M. oryzae* de 45% a 1% al combinar el tratamiento térmico (agua caliente a 52° C por 10 minutos) con el tratamiento químico, utilizando en este caso al producto carboxin + tiram (37.5 + 37.5).

Según los resultados obtenidos, la erradicación de patógenos en las semillas es una tarea difícil, posiblemente debida a la asociación íntima del patógeno con el hospedante, localizado, generalmente, en el interior de la semilla. Por lo tanto, la semejanza fisiológica es una garantía para la supervivencia del patógeno y una dificultad para el control (Carmona *et al.*, 2000, Reis, *et al.*, 1999).

Es necesario obtener metodologías eficientes de tratamientos de semillas con el fin de lograr la erradicación de patógenos necrotróficos que pueden ser transmitidos hacia los órganos aéreos de las plántulas, causando manchas foliares o en los granos. La posibilidad de controlar enfermedades en la fase previa a la implantación de un cultivo, implica que el tratamiento de semillas sea considerado en la agricultura moderna como una de las medidas mas recomendadas, posibilitando el menor uso de agroquímicos, a fin de evitar la contaminación al medio ambiente (Machado, 2000).

Tabla 3. Efectos del tratamiento a diferentes temperaturas (°C) y tiempos de de inmersión (horas) sobre la incidencia de *Microdochium oryzae*.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPOS DE INMERSIÓN (HORAS)		
	0	1	2
0	A 1.25a*	-	-
40	A 1.00 a	A 1.0 a	B 0.0 a
50	A 0.38 a	A 0.0 b	A 0.0 a
60	A 0.00 a	A 0.0 b	A 0.0 a

* Médias antecedidas por diferentes letras mayúsculas, dentro de la fila y medias seguidas por diferentes letras minúsculas dentro de cada columna presentan diferencias significativas (test de Tukey al nivel de 5 % de probabilidad)

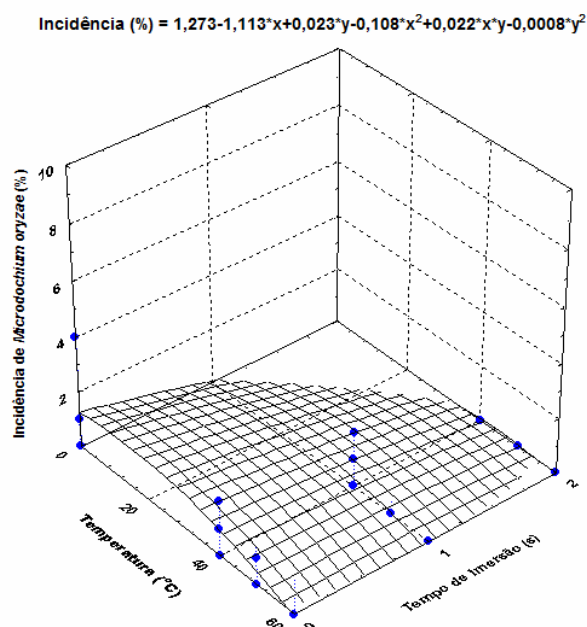


Figura 1. Efecto de diferentes temperaturas (y) y tiempo de inmersión (x) en la incidencia (z) de *Microdochium oryzae* en semilla de arroz.

Tabla 4. Efectos del tratamiento en por ciento de semillas con iprodione (100cc. 100⁻¹ Kg/semillas) a diferentes temperaturas (°C) y tiempos de inmersión (horas) sobre la incidencia de *Microdochium oryzae*.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPOS DE INMERSIÓN (HORAS)		
	0	1	2
0	A 1.00 a*	-	-
40	A 0.63 ab	A 0.13 a	A 0.13 a
50	A 0.38 ab	A 0.00 a	A 0.00 a
60	A 0.00 b	A 0.00a	A 0.00 a

* Medias antecedidas por diferentes letras mayúsculas, dentro de la fila y medias seguidas por diferentes letras minúsculas dentro de cada columna presentan diferencias significativas (test de Tukey al nivel de 5% de probabilidad).

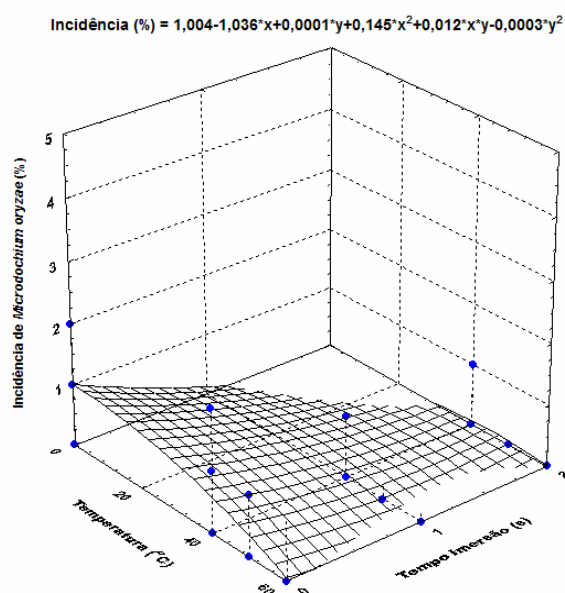


Figura 2. Efecto del tratamiento de semillas con el fungicida iprodione sometido a diferentes temperaturas (y) y tiempos de inmersión (x) en la incidencia (z) de *Microdochium oryzae*, expresado como superficie de respuesta.

CONCLUSIONES

La eficiencia de los fungicidas evaluados en el control de *Microdochium oryzae* en semillas de arroz, fue diferente según las variedades analizadas.

Es necesario realizar más estudios a fin de evaluar la eficiencia del tratamiento químico en semillas de variedades de arroz con diferentes niveles de infección.

La erradicación del patógeno (100% de control) se obtuvo mediante el tratamiento combinado térmico-químico a 50° C y 1 hora de exposición, pero con reducción del poder germinativo y vigor de la semilla.

CAPITULO 10. DISCUSION GENERAL

La importancia que tiene el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) en la producción mundial de alimentos y la significancia que tiene la transmisión por semilla de varios patógenos importantes de este cereal, constituye una preocupación constante para los investigadores con el objetivo de obtener mayor producción y mejores alimentos. Ya que la agricultura ha alcanzado un nivel alto de tecnificación, es esencial obtener una buena calidad de semilla. Un gran número de microorganismos son transportados e introducidos en otras áreas a través de las semillas de arroz, siendo los hongos los que causan el mayor número de enfermedades en las plantas, y que ocurren con mayor frecuencia que las bacterias y nemátodos (Castaño, 1985).

Las semillas de arroz son portadoras de numerosos patógenos que causan enfermedades importantes en el cultivo, además de ser un eficiente medio de sobrevivencia de esos patógenos en la naturaleza; su potencial epidémico varía entre especies, razas y ecosistemas (Morato de Amaral *et al.*, 1985, Jayaweera *et al.*, 1988, Mew & Gonzales, 2002, Mew & Misra, 1994, Ou, 1985, Webster & Gunnell, 1992, Winter *et al.*, 1974). Según Mew & Gonzales (2002) más de 80 especies de hongos fueron detectados en semillas de arroz; entre estos patógenos se encuentran *Alternaria padwickii* y *Microdochium oryzae*, objeto de estudio del presente trabajo de tesis (Gutiérrez *et al.*, 2002).

El hongo *A. padwickii* es el agente causal de la alternariosis o mancha foliar del arroz, además de integrar el complejo causal del manchado del grano de arroz. En la región del nordeste argentino, fue detectado en semillas, hojas y granos manchados (Gutiérrez, 2002, 2004, Gutiérrez *et al.*, 2002, Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1989, 1991, 1999, 2001, Rigonatto & Gutiérrez, 2006).

La escaldadura de la hoja del arroz, causada por *M. oryzae*, es considerada actualmente una enfermedad de amplia distribución en toda la región del nordeste argentino; se caracteriza por producir síntomas en hojas, vainas foliares y granos de arroz (Mazzanti de Castañón & Gutiérrez de Arriola, 1989, 1999, 2001, Gutiérrez *et al.*, 2002, Rigonatto & Gutiérrez, 2006).

El análisis de rutina de la sanidad de semillas tiene como objetivo la evaluación de la calidad de lotes de semillas en cultivos de importancia económica, debido a que éstas transportan patógenos que afectan la germinación, o cuando son transmitidas hacia los órganos aéreos, ocasionan enfermedades en el cultivo afectando a la producción (Moraes, 1995). Según Richardson (1990) y Mew & Gonzales (2002), los

hongos forman el principal grupo de organismos patogénicos que pueden asociarse a las semillas de arroz, y por lo tanto deben ser perfectamente identificados en los lotes de semillas.

Morato de Amaral *et al.*, (1985) expresa que el empleo de técnicas de detección de patógenos en semillas de arroz es de gran utilidad para evitar la entrada de nuevos organismos en regiones aún no contaminadas y la comercialización de lotes de semillas infectadas de una región a otra. Además, permitirá conocer la cantidad de inóculo inicial y los cuidados a ser tomados para evitar la transmisión de enfermedades. Por lo tanto, es necesario disponer de métodos de detección de patógenos en semillas, que sea eficientes, reproducibles y de alta sensibilidad, y, además que posibilite su utilización en los programas de certificación de semillas, cuarentena o estudios de transmisión y control químico.

Al respecto, se realizaron estudios *in vitro* comparando cuatro métodos (papel de filtro, agar papa glucosado, agar extracto de malta y agar poroto) para la detección de *A. padwickii* y *M. oryzae*, en semillas de diferentes variedades de arroz, procedentes de la provincia de Corrientes.

Todos los métodos analizados permitieron detectar a los dos patógenos en las semillas de arroz; no obstante, el método de AP resultó ser el más sensible; *A. padwickii* se manifestó con 3.7 a 76% de incidencia y en el 100 % de los lotes analizados, indicando así la importancia que representa la presencia de éste patógeno en las semillas de arroz producidas en la región. Aun cuando el ISTA (2004) ha propuesto como método validado al del papel de filtro para su detección en semillas de arroz, el método de AP utilizado en éste estudio, permitió revelar una mayor infección en todas las semillas analizadas.

En el análisis de semillas para la detección de *M. oryzae*, según el método de AP utilizado, la incidencia del patógeno fue hasta 55% según las variedades y procedencias, con una prevalencia de 90%. Con respecto a dicho método, es importante resaltar que no existen antecedentes sobre su utilización en análisis de rutina de semillas de arroz.

Estos resultados obtenidos demostraron la aceptación de la hipótesis 1, en la cuales se expresa que existen diferencias significativas en la sensibilidad de detección de *A. padwickii* y *M. oryzae* según el método de detección utilizado.

Los estudios de transmisión realizados con *A. padwickii*, permitieron confirmar que este patógeno se transmite hacia la parte aérea de plántulas de arroz, a los 7, 11,

20 y 30 días DDS, con diferentes valores. El tipo de sustrato utilizado influyó en la manifestación de los síntomas en las plántulas durante dicho proceso, observándose que el sustrato de arena estéril favoreció la manifestación de síntomas en las plántulas, mientras que en el otro sustrato utilizado, la transmisión fue asintomática. Esta situación fue diferente a lo observado por Alizaga *et al.*, (1983) quienes comprobaron que el sustrato no tiene efecto importante sobre la infección de patógenos transportados en la semilla de arroz, si bien la temperatura estuvo estrechamente relacionada con la infección y su efecto sobre el desarrollo de las plántulas; por el contrario, Malavolta *et al.*, (2002) observaron que el sustrato esterilizado permitió un aumento en la transmisión de *B. oryzae*, además de comprobar que existen diferencias en la ET entre variedades de arroz, y que la misma no presentó relación con el porcentaje de incidencia del patógeno en las semillas. En tanto Lima *et al.*, (1985), concluyeron que la edad de la planta, en el momento de la infección es uno de los factores que puede afectar la transmisión.

En cuanto a la transmisión de *M. oryzae*, la ET fue de 2.18 % en plántulas asintomáticas, a los 30 días DDS; sin embargo no se produjo transmisión del patógeno a los 15 DDS.

Los resultados obtenidos constituyen la primera evidencia en Argentina sobre el pasaje de *A. padwickii* y de *M. oryzae*, desde las semillas infectadas hacia las plántulas de arroz, demostrando así que la semilla de arroz puede constituirse en una importante fuente de inóculo para las enfermedades que ellos ocasionan. Ambos patógenos pueden transmitirse sin manifestar síntomas en los órganos aéreos. Por lo expuesto, se acepta la segunda hipótesis enunciada.

Reis *et al.*, (1999) expresaron que disponer de esta información (incidencia del patógeno en semillas y su eficiencia de transmisión) es necesario e importante, principalmente cuando un cultivo se implanta por primera vez en una determinada región, o en aquellos campos donde se realiza la rotación de cultivos.

Con respecto a la transmisión asintomática, Machado (1988), considera que desde el punto de vista sanitario las inspecciones o monitoreos de un cultivo, deben ser conducidos con conocimiento sólido sobre la presencia y desarrollo de las enfermedades que pueden comprometer la calidad de las semillas. La tarea de juzgar la condición de un campo de producción de semillas, en cuanto a la manifestación de ciertas enfermedades, es de suma importancia en el caso de no disponerse de índices de tolerancia correctamente establecidos para cada tipo de enfermedad. Cuando se

observan plantas sin síntomas visibles, puede suceder que estén infectadas (infección latente) por un determinado patógeno, por lo que se recomienda la realización de un examen sanitario de las semillas en laboratorio. De modo general, la realización de inspecciones (o monitoreos) en las fases de floración y previo al momento de la cosecha del cultivo, son necesarias principalmente, si se tiene en cuenta que en determinadas circunstancias las plantas pueden ser muy susceptibles al ataque de determinados organismos, los cuales pueden alcanzar rápidamente a las semillas. Respecto a esto, Manandhar (1999) observó que cuando las plántulas de arroz, infectadas por *Pyricularia grisea* crecieron en condiciones de bajas temperaturas, no manifestaron síntomas, pero cuando las mismas fueron transferidas a un ambiente con altas temperaturas, se detectaron síntomas de la enfermedad; de esta manera, dicho autor confirma la presencia de una infección latente causada por el patógeno, y concluye que la ausencia de síntomas foliares bajo condiciones de campo, no necesariamente indicarán que las semillas están sanas. Esta situación es importante de considerar, especialmente en programas de certificación de semillas, en el cual determinados lotes de semillas son certificadas sobre la base de la inspección a campo.

Según lo informan los trabajos de Agarwal & Sinclair (1985), Barba *et al.*, (2002), Machado (1988) y Neergaard (1979), el proceso de transmisión puede ser afectado por factores del ambiente, y por características inherentes al patógeno y al hospedante.

Para el cultivo de arroz el proceso de transmisión aun no está bien esclarecido, debido a que los estudios realizados con algunos de los patógenos que infectan las semillas, no han contemplado todos los factores involucrados en dicho proceso.

En lo referente a los métodos utilizados para el control de *A. padwickii* y *M. oryzae*, aplicados a las semillas de arroz, se realizaron tratamientos químico, térmico y combinando térmico-químico. Se evaluaron productos químicos (fungicidas) con diferentes dosis. De éstos fungicidas, los más eficientes para *A. padwickii* fueron iprodione, iprodione + triticonazole y tebuconazole, pero sin lograr la erradicación del patógeno. Similares resultados fueron obtenidos por Suryanarayana *et al.*, (1963), Vir *et al.*, (1971), Salazar & Alizaga (1996) e Islam *et al.*, (2000) quienes también lograron reducir la incidencia del patógeno, sin lograr su erradicación.

Con respecto a *M. oryzae*, debido a que los fungicidas se evaluaron en dos variedades de arroz (Taim y Supremo 13), la eficacia de los productos fue diferente

según las variedades e incidencia del patógeno en las semillas; se obtuvo un control de 100% en la variedad Taim, mientras que en la variedad Supremo 13, el porcentaje de control del hongo, varió entre 77-70% entre los fungicidas que mejor respondieron al tratamiento. Los resultados obtenidos coincidieron con los trabajos realizados por Parisi *et al.*, (2001), Filippi *et al.*, (2005), Schuch *et al.*, (2006) y Silva-Lobo (2008) en Brasil, y por Gutiérrez *et al.*, (2005) en nuestro país, quienes lograron disminuir la incidencia del patógeno utilizando fungicidas curasemillas. Con respecto al iprodione, Pereira *et al.*, (2002) observaron que dicho producto puede inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de *M. oryzae*, si bien el mismo está indicado para el control de Dematiaceas, se desconoce su efectividad en el control de *M. oryzae*. Al respecto, Machado (2000) informó que el fungicida iprodione posee un periodo de protección prolongado y actúa en forma preventiva y curativa, pero aun es necesario realizar estudios para conocer el espectro de control de este fungicida para los hongos asociados a las semillas de arroz. Por otro lado, en el presente estudio se observó que el tratamiento combinando iprodione + triticonazole sobre las semillas de arroz, tuvo un comportamiento diferente según las variedades de arroz y la incidencia del patógeno en la semilla; fue muy eficiente para la variedad Taim (con 5% de incidencia), permitiendo un control de 100% mientras que para la variedad Supremo 13, con 22% de infección, solamente se obtuvo un control de 54%. Analizando estos resultados, se puede apreciar que al aumentar la incidencia del patógeno en las semillas, los mismos fungicidas en dosis semejantes resultan ser menos eficientes. Esta situación implica la necesidad de realizar curvas con dosis de fungicidas, en muestras de semillas con diferentes porcentajes de infección.

Si bien el cultivo de arroz es de importancia económica para la región nordeste de Argentina, los trabajos realizados sobre la aplicación de fungicidas en semillas y en cultivo para el control de las enfermedades son escasos. Además, no es una práctica común realizada por los productores de la región; las empresas semilleras realizan el tratamiento de las mismas principalmente con carboxin + tiram o carbendazim + tiram, las que en las dosis utilizadas, no resultarían ser eficientes para su control. Esta situación ha llevado a un aumento en la incidencia de patógenos en semillas, así como en la prevalencia e incidencia de algunas enfermedades fúngicas, ya observado por Gutiérrez *et al.*, (2002), Mazzanti de Castañón y Gutiérrez de Arriola (2001) y Rigonatto & Gutiérrez (2006) en monitoreos realizados en cultivos de la región.

Según los trabajos realizados por Schuch *et al.*, (2006), en la efectividad de un tratamiento actúan varios factores, por ejemplo, dosis y cobertura del producto sobre las semillas, nivel de infección en las semillas, volumen de agua utilizado, existencia de pilosidad en la cáscara de las semillas de arroz, que puede resultar en una mayor retención del fungicida, etc. Por lo tanto, del estudio realizado sobre el efecto de fungicidas curasemillas en arroz, se destaca la posibilidad de reducir la incidencia de *A. padwickii* y *M. oryzae* en las semillas de arroz, por lo que se propone continuar con la investigación y utilizar otros principios activos con diferentes dosis, para lograr la erradicación de los patógenos presentes en las semillas.

Existen varios investigadores que resaltan la importancia del empleo de algún método de control para los patógenos presentes en las semillas de arroz, tales como Celmer *et al.*, (2007), Morato de Amaral *et al.*, (1985), Ribeiro (1996), Prabhu & Filippi (1997) y Sofiatti & Schuch (2005), entre otros. Al mismo tiempo, consideran que la utilización de fungicidas en la parte aérea de las plantas, es aconsejable para cultivos situados en regiones con presencia de enfermedades, o cuando las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de las mismas, y precisamente, en el caso de lotes destinados a la producción de semillas, el empleo de alguna práctica de control es muy importante.

Con respecto a la otra metodología de tratamiento aplicado a las semillas para el control de *A. padwickii*, se observaron diferencias significativas en la incidencia, en el TT y TTQ, en las tres temperaturas evaluadas y su interacción con los tres tiempos. La erradicación del patógeno se obtuvo en el TT y en el TTQ a 60° C, pero en estas condiciones las semillas no germinaron. Similares resultados fueron obtenidos por Suryanarayana *et al.*, (1963), quienes lograron reducir la infección de *A. padwickii* al tratar las semillas con agua caliente a 52° C por 10 minutos, y Mendez *et al.*, (1992) que al utilizar calor seco en las semillas de arroz, también obtuvieron menor incidencia de *Phoma*, *B. oryzae* y *B. sorokiniana*, pero al mismo tiempo se redujo el porcentaje de germinación y del vigor. Por lo expuesto, la erradicación de *A. padwickii* es difícil de ser obtenida y por lo tanto deberían ser evaluados otros métodos de control.

Con respecto a *M. oryzae*, si bien en el tratamiento a 50° C y 60° C se obtuvo la erradicación del patógeno en las semillas con 5% de infección, se observó una disminución en el poder germinativo y vigor. Similares resultados fueron obtenidos por Mendez *et al.*, (1992) que observaron que el calor seco aplicado a las semillas, disminuyó la infección de *M. oryzae*, pero al mismo tiempo afectó al poder

germinativo y vigor de las semillas. De la misma manera, Mendez & Fonseca (1992) también evaluaron el efecto del calor húmedo en las semillas de arroz, observando una reducción en la incidencia del patógeno; en ambos experimentos, no lograron su erradicación.

Estos estudios aplicando diferentes tipos de tratamientos, para el control de ambos patógenos presentes en las semillas de arroz, confirman la tercer hipótesis planteada, sobre la existencia de diferencias en cuanto a la eficiencia de control obtenida, de acuerdo a la metodología utilizada.

El tratamiento de semilla no debe ser utilizado como una medida de control aislada, sino que debe formar parte de un conjunto de prácticas en la lucha contra los fitopatógenos; un producto o mezcla de fungicidas es considerado eficiente cuando es capaz de erradicar un determinado patógeno asociado con la semilla. Teóricamente lo ideal es la erradicación, pero lo que interesa en la práctica es la reducción de la infección a niveles que evite la transmisión. En este caso, el patógeno, aún presente, pero en un nivel muy bajo, no pasará desde las semillas a las plantas (Reis *et al.*, 1999).

Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, es necesario desarrollar métodos capaces de erradicar los patógenos necrotróficos de las semillas, independientemente del nivel de infección. No obstante, existen dificultades para lograr la eliminación del patógeno que pueden ser atribuidas a la íntima asociación del microorganismo con el hospedante localizado, generalmente en el interior de la semilla y a la similar sensibilidad fisiológica del embrión y del micelio del patógeno. De un modo general, un producto químico o un método físico que tienda a erradicar un patógeno puede provocar la muerte del embrión, o disminuir la germinación a un nivel que torna el proceso inviable en la práctica; sin embargo, aun cuando los métodos no afecten la germinación, el control puede no ser satisfactorio (Reis *et al.*, 1999).

Con respecto a los patógenos asociados a semillas de arroz en la región nordeste, considerando que el cultivo de arroz se encuentra en expansión, además de la incorporación de nuevos campos destinados a la siembra de arroz y donde se practica la rotación de cultivos, y dado que año a año se introducen al país nuevas líneas vegetales originarias de países productores de arroz con fines de mejoramiento, la introducción de patógenos podría ser evitado por el tratamiento erradicante de las semillas.

La realización de este trabajo de tesis doctoral, permitió comprender la importancia fundamental de implementar medidas para suprimir la enfermedad orientadas a las fuentes de inóculo primario que son las semillas. Por lo tanto, las estrategias de manejo de la enfermedad que sean preferenciales y económicas para el productor, deben ser aplicadas antes de la siembra, y la técnica del tratamiento con fungicidas curasemillas u otro método de control, deben formar parte de un conjunto de prácticas en la lucha contra los patógenos.

Los hongos en estudio, *A. padwickii* y *M. oryzae* son necrotróficos, por lo que pueden establecer una asociación de duración indefinida con el hospedante, y también sobrevivir en rastrojos (Ou, 1985, Padwick, 1950, Webster & Gunnell, 1992). En este caso, la rotación de cultivos constituye una excelente medida de control, porque puede eliminarlos. Bajo esta situación (rotación), el uso de fungicidas en semillas constituye una técnica esencial de control de patógenos necrotróficos, orientada para complementar la rotación de cultivos. Si no se realizara la rotación (monocultivo), los rastrojos infectados constituirán una fuente de inóculo muy importante anulando el efecto del tratamiento de semilla (Reis *et al.*, 1999).

Finalmente es preciso destacar que si bien los resultados logrados en este trabajo de tesis constituyen un avance inédito en la comprensión de la epidemiología y el manejo de estos patógenos, muchos aspectos relacionados con la biología, supervivencia, y ambiente deberán ser abordados en próximas investigaciones para profundizar aun más las alternativas de manejo. A modo de ejemplo, será preciso conocer como la profundidad de siembra, la temperatura del suelo y los sistemas de producción, influyen sobre la transmisión de los patógenos aquí estudiados. Asimismo, analizar cual es el rol de los rastrojos en la supervivencia y fuente de inóculo bajo diferentes ambientes. Similarmente, será preciso estudiar alternativas químicas y no químicas para lograr su erradicación.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, V.K., Sinclair, J.B. 1985. Principles of Seed Pathology. CRC Press: Boca Raton, FL. Vol I, 176 pp., Vol II, 168 pp.
- Alizaga, R., Flores, J., Chavarría, C. 1983. Efecto de la temperatura y del sustrato sobre la manifestación de hongos patógenos durante el ensayo de germinación en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.). Agronomía Costarricense 7(1/2): 63-67.
- Amu Singh, S., Sen Gupta, P.K. 1980. *Echinochloa crus-galli* L. Beauv. A new host for *Rhynchosporium oryzae* Hashioka and Yokogi. International Rice Research Notes 5: 5.
- Amu Singh, S., Sen Gupta, P.K. 1981. Transmission of *Rhynchosporium oryzae* Hashioka and Yokogi by seed. International Rice Research Notes 6 2:11.
- Ancalmo, O, Davis,W.C. 1962. Diseases of rice new to El Salvador, Plant Disease Reporter 46: 293.
- Asociación Correntina de Plantadores de Arroz, ACPA, <http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar>
- Arguissain, G., Cattaneo, F., Perez, F. 2000. Control de enfermedades en semillas de arroz. Evaluación de productos fungicidas. En: PROARROZ-Resultados Experimentales 99/00, vol. 9: 52-55.
- Arguissain, G., Durand, A., Delcanto, R. 1999. Control de *Pyricularia grisea*: número y momentos de aplicaciones. En: PROARROZ – Resultados Experimentales 98/99, vol. 8: 36-38.
- Arias, S.M.S., Filippi, M.C., Bazzoni, R., Prabhu, A.S. 2000. Eficiência do tratamento de sementes no controle da brusone em arroz. Fitopatologia Brasileira. Brasilia 25 sup., p.356-357.
- Bakr, M.A., Miah, S.A. 1975. Leaf scald of rice, a new disease in Bangladesh. Plant Disease Reporter 59(11): 909.
- Bali Redy, A., Khare, M.N. 1978. Seed-borne of rice in Madhya Pradesh and their significance. Indian Phytopathology 31: 300-303.
- Barba, J.T., Reis, E.M., Forcelini, C.A. 2002. Efeito da temperatura e de fungicida na transmissão de *Bipolaris sorokiniana* da semente para plântulas de cevada. Fitopatol. Bras. 27(5): 500-507.

- Barrera, V., Gutiérrez, S., Altuve, S., Gasoni, L., Cúndom, M., Figueroa, A. 2005. El complejo *Rhizoctonia* en cultivos de arroz de Argentina. En: Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Villa Carlos Paz, Córdoba, p. 394.
- Bedendo, I.P. 1983. Transmissibilidade de *Rhynchosporium oryzae* a través de sementes de arroz. Fitopatol. Bras. 8:574.
- Bedendo, I.P., Prabhu, A.S. 2005. Doenças do arroz (*Oryza sativa*) Capítulo 12. Em: Kimati, H., Amorin, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. Vol 2. Doenças das plantas cultivadas. 4ª. Ed. São Paulo SP. Editora Agronomica Ceres. pp. 79-90.
- Bonman, J.M., Mackill, A.O., Glaszmann, J.C. 1990. Resistance to *Gerlachia oryzae* in rice. Plant Disease 74: 306-309.
- Boratynski, T.N. 1979. La escaldadura de la hoja de arroz *Rhynchosporium oryzae* Hashioka e Ikegami, en Costa Rica. Agronomia Costarricense 3: 21-27.
- Carmona, M.A., Barreto, D.E., Reis, E.M. 2000. Detection, transmission and control of *Drechslera teres* in barley seed. Seed. Sci. & Technol. 27: 761-769.
- Carmona, M., Ferrazini, M., Barreto, D. 2006. Tan spot of wheat caused by *Drechslera tritici-repentis*: detection, transmission and control in wheat seed. Cereal Research Communications 34 (2-3): 1043-1049.
- Carrera A., M.H. 1974. Patología debida a hongos y tratamiento de la semilla de arroz. En: Primer Seminario Nacional de Semillas, San José, Costa Rica.
- Castaño Z, J. 1985. Microorganismos asociados con el manchado del grano. ARROZ, 34(336): 22-25.
- Castaño Z, J., Nurdin, F., Hasan, N. 1990. Major diseases and insect pests of upland rice in Sumatra. Sukarami Research, West Sumatra, Indonesia 38 p.
- Celmer, A., Madalosso, M.G., Debortoli, M.P., Navarini, L., Balardín, R.S. 2007. Controle químico de doenças foliares na cultura do arroz irrigado. Pesq. Agropec. Bras. 42(6): 901-904.
- Costa, J.L.Da. S. 1991. *Alternaria padwickii* e *Curvularia lunata*: patogenicidade e transmissão por sementes de arroz irrigado. Fitopatol. Bras. 16(1): 15-18.
- Dhingra, O.D., Muchojev, J.J., Cruz Filho, J. da. 1980. Tratamento de sementes (controle de patógenos). Viçosa: Imprensa Universitaria/UFV. 121 p.

- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 608 p.
- Ellis, M.B., Holliday, P. 1972. *Alternaria padwickii*. CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 345.
- Faiad, M.G.R., Machado, J. Da C., Vieira, M.G., Cornélio, V.M. de O. 1993. Efeitos e transmissibilidade de *Gerlachia oryzae* (Hash. & Yok.) Gams em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.). Ciên. e Prát. 17(4): 357-362.
- Faiad, M.G.R., Machado, J. Da C., Vieira, M.G., Cornélio, V.M. de O. 1994. Efeitos e transmissibilidade de *Pyricularia oryzae* Cav. em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) sob condições controladas. Revista Brasileira de sementes, Brasília, 16(1): 45-49.
- Faria, J.C., Prabhu, A.S. 1980. A screening technique to evaluate resistance of rice to *Rhynchosporium oryzae*. Plant Disease Reporter 64: 845-846.
- Farias, C.R.J, Afonso, A.P.S, Brancão, M.F, Pierobom, C.R. 2007. Ocorrência de *Alternaria padwickii* (Ganguly) em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) (Poaceae) produzidas em quatro regiões orizícolas do Rio Grande do Sul e seu efeito sobre plântulas. Arq. Inst. Biol. 74(3): 245-249.
- Farr, D.F., Rossman, A.Y., Palm, M.E., McCray, E.B. 2007. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved November 17, 2007, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Farr, D.F., Rossman, A.Y., Palm, M.E., McCray, E.B. 2008. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved April 10, 2008, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Filippi, M.C., Prabhu, A.S., da Silva, G.B. 2005. Escaldadura do Arroz e seu controle. Circular Técnica 72 Embrapa Arroz e Feijão. Goiás 4p.
- Forcelini, C.A. 1995. Tratamento de sementes de trigo no Brasil. In: Menten, J.O.M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. São Paulo: Ciba Agro, p. 247-264.
- Forcelini, C.A., Reis, E.M. 1997. Doenças da aveia. In: Kimati, H, Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. Manual de fitopatologia, vol 2: Doenças de plantas cultivadas. 3ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p.105-111.

- Fortugno, C., Rossi, L.A. 1984. *Nakataea sigmoidea* (*Helminthosporium sigmoideum*) en relación con la “Podredumbre del tallo del arroz”. IDIA 421-424: 84-86.
- Gams, W., Müller, E. 1980. Conidiogenesis of *Fusarium nivale* and *Rhynchosporium oryzae* and its taxonomic implications. Neth. J. Pl. Path. 86: 45-53.
- Goulart, A.C.P. 1991. Eficiência do tratamento químico de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) no controle de *Pyricularia oryzae*. Summa Phytopathologica 17(3-4): 252-256.
- Groth, D.E., Rush, M.C., Hollier, C.A. 1991. Rice diseases and disorders in Louisiana. Baton Rouge: Agricultural Experiment Station 37 p. (Bulletin, 828).
- Guerrero, F.C., Mathur, S.B., Neergaard, P. 1972. Seed health testing of rice V. Seed-borne fungi associated with abnormal seedlings of rice. Proc. Int. Seed Test. Ass. 37(3): 985-997.
- Gutiérrez, S.A. 2002. Micoflora asociada a granos manchados de arroz. En: XI Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Río Cuarto, Córdoba, p. 29.
- Gutiérrez, S.A. 2004. *Alternaria padwickii*, patógeno de semillas de arroz. En: XV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, FCA, Corrientes.
- Gutiérrez, S.A. 2005. Detección del estado esclerótico de *Magnaporthe salvinii* en semillas de arroz de la provincia de Corrientes, Argentina. Summa Phytopathologica 31(3): 279-281.
- Gutiérrez, S.A. 2006. Presencia de *Bipolaris sorokiniana* y *Exserohilum rostratum* en semilla de arroz. En: XVII Reunión de Comunicaciones Científicas-Técnicas y de Extensión, FCA, Corrientes.
- Gutiérrez, S.A. 2007. *Sclerotium hydrophilum* en cultivos de arroz de Argentina. Summa Phytopathologica 33(1): 100.
- Gutiérrez, S.A., Mazzanti de Castañón, M.A. 2002. Obtención *in vitro* de *Magnaporthe salvinii* agente causal de la podredumbre del tallo de arroz. Fitopatología 37(2): 128-132.
- Gutiérrez de Arriola, S.A., Mazzanti de Castañón, M.A. 1994. Mancha de la vaina por *Rhizoctonia oryzae*, en arrozales del nordeste de la Argentina. Fitopatología 29(1): 41 (Resumen).

- Gutiérrez de Arriola, S.A., Mazzanti de Castañón, M.A. 1998. Los carbones del arroz en el nordeste de la Argentina. *Fitopatología* 33(4): 232-236.
- Gutiérrez, S.A., Cúndom, M.A., Mazzanti de Castañón, M.A. 2000. Falso carbón (*Ustilaginoidea virens*), en cultivos de arroz de Argentina. *Summa Phytopathologica* 26(4): 471-473.
- Gutiérrez, S.A., Cúndom, M.A., Mazzanti de Castañón, M.A. 2002. Hongos en semillas de arroz del noreste de Argentina. *Fitopatología* 37(4): 156-163.
- Gutiérrez, S.A., Mazza, S.M., Wojszko, A. 2005. Efecto de fungicidas *in vitro* en semillas de arroz. En: XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Córdoba, p. 282.
- Hastings de Gutiérrez, L. 1960. Leaf scald of rice, *Rhynchosporium oryzae*, in Costa Rica. *Plant Disease Reporter* 44: 294-295.
- Index Fungorum: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>
- InfoStat. 2006. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. 1980. Standard Evaluation Systems for Rice. International Rice Testing Program (IRTP). Los Baños, Philippines, IRRI. 44 p.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 2004. International Rules for Seed Testing. Anexe to Chapter 7 Seed Health Testing Methods. CH-Switzerland, ISTA.
- Islam, M.S., Jahan, Q.S.A., Bunnarith, K., Viangkum, S, Merca, S.D. 2000. Evaluation of seed health of some rice varieties under different conditions. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41: 293-297.
- Jayaweera, K.P., Wijesundera, R.L.C., Medis, S.A. 1988. Seed-borne fungi of *Oryza sativa*. *Indian Phytopathology* 41(3): 355-358.
- Kimati, H., Amorin, A., Bergamin Fihlo, A., Camargo, L.E.A., Rezende, J.A.M. 2005. Manual de Fitopatologia Vol. 2. Doenças das Plantas Cultivadas, 4ª ed. São Paulo SP, Agronômica Ceres, 663 p.
- Kulik, M. 1975. Comparison of blotter and guayacol agar for detection of *Helminthosporium oryzae* and *Trichoconis padwickii* in rice seeds. *Phytopathology* 65: 1325-1326.

- Lamey, H.A., Williams, R.J. 1972. Leaf scald of rice in West Africa, Plant Disease Reporter 56(2): 106-107.
- Ligier, D., Kurtz, D., Perucca, A.R., Matteio, H. 2004. Relevamiento arrocero 2003-2004, con apoyo de escenas Landsat en Corrientes. En: Proyecto Arroz, Campaña 2003-04, Estación Experimental Agropecuaria INTA, vol. XIV: 7-18.
- Lima, E.F., Carvahlo, J.M.F.C., Carvahlo, L.P., costa, J.N. 1985. Transporte e transmissibilidade de *Colletrotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* através da semente do algodoeiro. Fitopatologia Brasileira 10: 99-109.
- Lucca Filho, O.L. 1985. Importancia da sanidade na produção de sementes de alta qualidade. Revista Brasileira de Sementes 71(1): 113-124.
- Machado, J. Da C. 1988. Patologia de sementes. Fundamentos e aplicações. Brasilia: MEC/ESAL/FAEPE, 107 p.
- Machado, J. Da C. 2000. Tratamento de sementes no controle de doenças. Lavras:UFLA/FAEPE, 138 p.
- Machado, J.C., Langerak, C.J., Jaccoud-Filho, D.S. 2002. Seed-borne fungi: a contribution to routine seed health analysis. Zürich: ISTA, 138 p.
- Malavolta, V.M.A., Bedendo, I.P. 1999a. Resistencia de cultivares de arroz a manchas de grãos causadas pelos fungos *Bipolaris oryzae*, *Microdochium oryzae* e *Phoma sorghina*. Summa Phytopathologica 25(4): 313-318.
- Malavolta, V.M.A., Bedendo, I.P. 1999b. Danos devidos a manchas de grãos em arroz causadas pelos fungos *Bipolaris oryzae*, *Microdochium oryzae* e *Phoma sorghina*. Summa Phytopathologica 25(4): 324-330.
- Malavolta, V.M.A., Parisi, J.J.D., Takada, H.M., Martins, M.C. 2002. Efeito de diferentes niveis de incidencia de *Bipolaris oryzae* en sementes de arroz sobre aspectos fisiológicos, transmissão do patógeno às plântulas e produção. Summa Phytopathologica 28(4): 336-340.
- Mamone, C., Gaetán, S. 1999. Patógenos asociados a la semilla de arroz. En: X Jornadas Fitosanitarias Argentinas, San Salvador de Jujuy, Jujuy, p. 26.
- Manandhar, B. 1999. Isolation of *Microdochium oryzae* and *Pinatubo oryzae* from rice seeds and their survival on stored seeds. European Journal of Plant Pathology 105: 139-145.

- Manandhar, H.K., Lings Jorgensen, H.J., Smedegaard-Petersen, V., Mathur, S.B. 1998. Seedborne infection of rice by *Pyricularia oryzae* and its transmission to seedlings. *Plant Diseases* 82(10): 1093-1099.
- Marchionatto, J.B. 1943. El “manchado” de los granos de arroz y los hongos que lo acompañan. *Revista Argentina de Agronomía* 10: 114-116.
- Mathur, S.B, Neergaard, P. 1967. Seed health testing of rice. II Seed-borne fungi of rice in Philippines, India, Portugal and Egypt. *Investigations on Trichoconis padwickii*. In: First International Symposium on Plant Pathology, New Delhi, India. p. 69-81.
- Mathur, S.B., Kongsdal, O. 2003. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. 3rd. Copenhagen, Denmark. 427 p.
- Mathur, S.B, Mallya, J.I., Neergaard, P. 1972. Seed-borne infection of *Trichoconis padwickii* in rice, distribution and damage to seeds and seedlings. *Proc. Int. Seed. Test. Ass.* 37(3): 803-810.
- Maude, R.B. 1996. *Seedborne Diseases and Their Control: Principle and Practice*. CAB International: Wallingford, UK. 293 p.
- Mazzanti de Castañón, M.A. 1972. Enfermedades de las plantas registradas en la provincia de Corrientes. IDIA. Suplemento N° 28: 7-27.
- Mazzanti de Castañón, M.A., Gutiérrez de Arriola, S.A. 1989. Hongos fitopatógenos del arroz (*Oryza sativa*), presentes en el nordeste de Argentina. En: 4to. Congreso Argentino de Micología, Huerta Grande, Córdoba, p. 44.
- Mazzanti de Castañón, M.A., Gutiérrez de Arriola, S.A. 1991. Avances en el conocimiento de la patogenicidad de hongos que atacan al arroz en el nordeste de Argentina. En: 2da. Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, Corrientes, p. 59.
- Mazzanti de Castañón, M.A., Gutiérrez de Arriola, S.A. 1993. Podredumbre de la vaina de arroz (*Sarocladium oryzae*) en la Argentina. *Fitopatología* 28(2): 70-76.
- Mazzanti de Castañón, M.A., Gutiérrez de Arriola, S.A. 1995. Contribución al conocimiento de la podredumbre castaño rojiza de la vaina de arroz. *Boletín Micológico* 10(1-2): 47-52.
- Mazzanti de Castañón, M.A., Gutiérrez de Arriola, S.A. 1999. Contribución al conocimiento de las enfermedades transmisibles del arroz en Argentina. En:

Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, SGCYT, UNNE. Tomo V. Ciencias Agrarias, 147-149.

- Mazzanti de Castañón, M.A., Gutiérrez de Arriola, S.A. 2001. Enfermedades del culivo del arroz en Argentina. *Fitopatología Bras. Supl.* 26: 482 (Abstract).
- Mazzanti de Castañón, M.A., Mazza de Gaiad, S.M., Gutiérrez de Arriola, S.A. 1994. Reacción *in vitro* a *Sclerotium oryzae*. *Fitopatología* 29(3): 172-177.
- Mazzanti de Castañón, M.A., Mazza de Gaiad, S., Gutiérrez de Arriola, S.A. 1997. Variabilidad patogénica de *Sclerotium oryzae* en la Argentina. *Fitopatología* 32(1): 58-63.
- Melvilla, D.T, Mayango D., Wilhelmetta, O. 1985. Supression and elimination of *Rhynchosporium oryzae* in rice foliage and seed in Liberia. *Plant Disease Reporter* 69(10): 884-886.
- Mendez, M.S.A., Castro, C., Neto, E.G., Almeida, M.F., Fonseca, J.N.L. 1992. Efeito do calor seco no controle de fungos em sementes de arroz. *Fitopatol. Bras.* 17(2): 169.
- Mendez, M.S.A., Fonseca, J.N.L. 1992. Efeito do tratamento térmico e químico para fungos de sementes de arroz. *Fitopatol. Bras.* 17(2): 169.
- Menten, J.O.M. 1996. Tratamento de sementes. En: Soave, J., Oliveira, M.R.M. e Menten, J.O.M. eds. Tratamento químico de sementes. Simpósio Brasileiro de Patologia de sementes, 4, Gramado, Anais Campinas: Fundação Cargill, 1996, p. 3-23.
- Menten, J.O.M., Bueno, J.T. 1987. Transmissão de doenças pelas sementes. En: Soave, J., e M.M. Veloso Da Silva Wetzel eds. Patología de sementes. Campinas, SP, Brasil, Fundação Cargill. p. 164-191.
- Mew, T.W., Gonzales, P. eds. 2002. A handbook of rice seedborne fungi. Los Baños, Laguna, International Rice Research Institute. 83p.
- Mew, T.W., Misra, J.K. eds. 1994. A Manual of Rice Seed Health Testing. Manila, Philippines, International Rice Research Institute. 113 p.
- Mia, M.A.T., Safeeulla, K.M. 1984. Leaf scald disease of rice in Karnataka, India. *International Rice Research Notes* 9(1): 19-20.
- Mia, M.A.T., Safeeulla, K.M., Shetty, H.S. 1986. Seed-borne nature of *Gerlachia oryzae*, the incitant of leaf scald of rice in Karnataka. *Indian Phytopathology* 39: 92-93.

- Misra, A. K., Vir, E. 1990. Efficacy of fungicides-XLVI: Effect of fungicidal of treatment against heavy inoculum pressure of certain fungi causing discolouration of paddy seeds. *Indian Phytopathology* 43(2): 175-178.
- Moraes, M.H.D. 1995. Testes de sanidade de sementes em rotina no Brasil: situação atual, contribuições e perspectivas. In: Menten, J.O.M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. São Paulo: Ciba Agro, p. 37-51.
- Moraes, M.H.D., Menten, J.O.M. 1987. Possibilidades de termoterapia no tratamento de sementes de hortaliças. *Summa Phytopathologica* 13(-2): 17. (Res.).
- Morato de Amaral, H. 1981. Efeito da aplicação de fungicidas em testes de germinação e de sanidade em sementes de arroz IAC-25. In: Congresso Brasileiro de Sementes. Recife, Resumos, Abrates. p. 22.
- Morato de Amaral, H. 1987. Testes de sanidade de sementes de arroz. En: Soave, J., e M.M. Veloso Da Silva Wetzel eds. *Patologia de sementes*. Campinas, SP, Brasil, Fundação Cargill, Capítulo XV: 358-370.
- Morato de Amaral, H., Sallaberry Ribeiro, A., Lucca Filho, O. 1985. Diagnóstico da patologia de sementes de arroz no Brasil. *Revista Brasileira de Sementes* 7(1): 183-188.
- Neergaard, P. 1967. Seed pathology of rice. In: First International Symposium on Plant Pathology, New Delhi, India. p. 57-68.
- Neergaard, P. 1979. *Seed Pathology Vol 1*. The MacMillan Press Ltd: London, UK, 861 p.
- Neergaard, P., Saad, A. 1962. Seed health testing of rice; a contribution to development of laboratory routine testing methods. *Indian Phytopathology* 15: 85-111.
- Ojeda, A.H., Subero, L.J. 2004. Ubicación, sobrevivencia y transmisión de *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Schoem. en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Fac. Agron.* 30: 27-37.
- Ou, S.A. 1985. *Rice diseases*. 2nd. ed., Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute. 380 p.
- Ou, S.A., Nuque, F.L., Vergel de Dios, T.I. 1978. Perfect stage of *Rhynchosporium oryzae* and the symptoms of leaf scald disease. *Plant Disease Reporter* 62: 524-528.

- Padwick, G.W. 1950. Manual of rice diseases. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute. 198 p.
- Padwick, G.W, Ganguly, D. 1945. Stackburn disease of rice in Bengal. Current Science 14: 328-329.
- Parisi, J.J.D, Malavolta, V.M.A., Leonel, F. 2001. Controle químico de fungos em sementes de arroz (*Oryza sativa*). Summa Phytopathologica 27(4): 403-409.
- Parkinson, V.O. 1980. Cultural characteristics of the rice leaf scald fungus, *Rhynchosporium oryzae*. Transactions of the British Mycological Society 74: 509-514.
- Parkinson, V.O., Sivanesan, A., Booth, C. 1981. The perfect state of the rice leaf scald fungus and the taxonomy of both the perfect and imperfect states. Transactions of the British Mycological Society 76: 59-69.
- Pedraza, M.V. 2005. Principales actividades sobre enfermedades del cultivo en la EEA Concepción del Uruguay del INTA. Resultados Experimentales 2004-2005, vol XIV, 117-127.
- Pereira, L.A., Coutinho, W.M., Machado, J.C., Linhares Magalhaes, F.E., Marques Pena, R.C. 2002. Fungitoxicidade *in vitro* de iprodione sobre o crescimento micelial de fungos que se associam a sementes de arroz. Revista Brasileira de Sementes 24(1): 67-70.
- Pereira, D.D., Pierobom, C.R. 2004. Detection of *Monographella albescens* in rice seeds. Revista Científica Rural 9(1): 38-47.
- Pineda, J.B., Colmenárez, O., Méndez, N., Gutiérrez, L. 2007. Niveles de inóculo de hongos fitopatógenos asociados a la semilla de arroz (*Oryza sativa*). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 24: 481-500.
- Portapuglia, A., Di Giambattista, G., Infantino, A. 1996. First report of *Alternaria padwickii* on rice seeds. Plant Disease 80(10): 1208.
- Prabhu, A.S., Bedendo, I.P. 1982. Reações de diversos gêneros e espécies de gramíneas à infecção por *Rhynchosporium oryzae*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 17: 703-708.
- Prabhu, A.S., Bedendo, I.P. 1990. Avaliação de germoplasma de arroz para resistência a *Gerlachia oryzae*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 25:1093-1100.

- Prabhu, A.S., Filippi, M.C. 1997. Arroz (*Oryza sativa* L.) Controle de Doenças. Capítulo 2. En: Ribeiro do Vale, F.X., Zambolin, L. Eds. 1997. Controle de Doenças de plantas: grandes culturas. Vol 1., Viçosa, M.G.,UFV, Departamento de Fitopatología, Brasilia. 554 p.
- Prabhu, A.S., Vieira, N.R.A. 1989. Sementes de arroz infectadas por *Drechslera oryzae*: germinação, transmissão e controle. Goiânia:EMBRAPA-CNPAF, 39 p (Boletim de Pesquisa 7).
- Rao, P.S., Hasanuddin, A., Shagir, S. 1977. Leaf scald of rice, a new disease in Indonesia. Plant Disease Reporter 61: 294-295.
- Reis, E.M. 1983. Selective medium for isolating *Cochliobolus sativus* from soil. Plant Disease 67: 68-70.
- Reis, E.M., Barreto, D., Carmona, M. 1999. Patología de semillas de cereales de invierno. Gráfica Condal SRL. Buenos Aires, Argentina 94 p.
- Reis, E.M., Casa, R.T., 1998. Patologia de sementes de cereais de inverno. Passo Fundo (Brasil): Aldeia Norte Editora. 88 p.
- Reis, E.M., Casa, R.T. 2004. Sobrevivência de fitopatógenos. In: Vale, F.X.R. do, Jesus Junior, W.C. de & Zambolin, L. Epidemiología aplicada ao manejo de doenças de plantas. Belo Horizonte: Editora Perfil, 2004. p. 337-364.
- Reis, E.M., Casa, R.T., Segalin, M., Deuner, E., Carmona, M. 2009. Estratégias para a produção de material de propagação vegetal livre de patógenos. Informativo Abrates, 19: 19-36.
- Ribeiro, A.S. 1984. Doenças do arroz irrigado. Circular Técnica N° 19. EMBRAPA, Pelotas, RS. 56 p.
- Ribeiro, A.S. 1996. Fungicidas recomendados para el tratamiento de sementes de arroz. En: Soave, J, Oliveira, M.R.M., Menten, J.O.M. eds. Tratamento químico de sementes. Simpósio Brasileiro de Patologia de sementes, 4, Gramado, Anais Campinas: Fundação Cargill, 1996, p. 64-68.
- Richardson, M.J. 1990. An annotated list of seed-borne diseases. 4ed. International Seed Testing Association, Zurich. 387 p.
- Rigonatto, R.E., Gutiérrez, S.A. 2006. Enfermedades determinadas en cultivos de arroz, campaña 2005-2006. En: Proyecto Arroz Campaña 2006-2007, Estación Experimental Agropecuaria INTA, vol XIV:25-28.

- Roy, A.K. 1977. Effect of *Rhynchosporium oryzae* on germination of rice. International Rice Research Notes 2:6.
- SAGPyA. 2008. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Estadísticas agrícolas. Arroz: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>
- Salazar, J., Alizaga, R. 1996. Evaluación de fungicidas en dos métodos de aplicación sobre el control de patógenos asociados a las semillas de arroz. En: X Congreso Nacional y III Congreso de Fitopatología, Costa Rica. p. 171.
- Sartorato, A., Penteado, M.F.P., Menten, J.O.M. 1990. Controle químico de *Phoma sorghina* em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) Revista Brasileira de Sementes 12(2): 59-65.
- Shetty, S.A., Shetty, H.S. 1985. New methods to detect seedborne *Trichoconiella padwickii*. International Rice Research Notes 10(4): 9.
- Shetty S.A., Shetty, H.S. 1988. Development and evaluation of methods for the detection of seed-borne fungi in rice. Seed Science and Technology 16: 693-698.
- Schieber, E. 1962. *Rhynchosporium* leaf scald of rice in Guatemala. Plant Disease Reporter 46: 202.
- Schuch, J.Z., Lucca Filho, O.A., Peske, T.S., Costa Dutra, L., Brançao, M., D'Avila Rosenthal, M. 2006. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de arroz con diferentes graus de umidade e tratadas com fungicida. Revista Brasileira de Sementes 28(1): 45-53.
- Silva-Lobo, V.L. 2008. Efeito do tratamento químico de sementes de arroz no controle da brusone nas folhas e na qualidade sanitária e fisiológica das sementes. Tropical Plant Pathology 33(2): 162-166.
- Singh, K., Mathur, S.B. 1992. Further evidence of transmission of *Sarocladium oryzae* through rice seeds and its quarantine significance. Indian Phytopathology 45(4): 454-456.
- Sisterna, M.N., Ronco, L. 1994. Efficacy of three fungicides for controlling growth of five seedborne fungi associated with rice grain spotting. International Rice Research Notes 19(2): 25-26.
- Sivanesan, A. 1982. *Monographella albescens*. Commonwealth Mycological Institute, Description of Pathogenic Fungi and Bacteria N° 729.

- Soave, J., Moraes, S.A. 1987. Medidas de controle das doenças transmitidas por sementes. En: Soave, J., e M.M. Veloso Da Silva Wetzel eds. Patologia de sementes. Campinas, SP, Brasil, Fundação Cargill, Capítulo VIII: 192-259.
- Soave, J., Oliveira, M.R.M., Menten, J.O.M. 1996. Tratamento químico de sementes. En: 4to. Simposio Brasileiro de Patologia de Sementes, Eds. Ríó Grande do Sul, Brasil.
- Soave, J., Prabhu, A.S., Ricci, T.M.T. de, Barros, L.G. de, Souza, N.R.G., Curvo, R.C.V., Ferreira, R.P., Sobral, C.A.M. 1997. Etiologia de manchas de sementes de cultivares de sequeiro no Centro-Oeste Brasileiro. Summa Phytopathologica 23(2): 122-127.
- Sofiatti, V., Schuch, L.O.M. 2005. Efeitos de regulador de crescimento e controle químico de doenças na qualidade fisiológica e sanitária de sementes de arroz. Revista Brasileira de Sementes 27(2): 102-110.
- Sreeramulu, T., Vittal, B.P.R. 1966. Some aerobiological observations on the rice stackburn fungus, *Trichoconis padwickii*. Indian Phytopathology 14: 215-221.
- Suryanarayana, D., Nath, R., Prabha Lal, S. 1963. Seed-borne infection of stackburn disease of rice, its extent and control. Indian Phytopathology 16:232-233.
- Thomas, M.D. 1981. Preliminary studies on isolation and means of spread of the rice leaf scald fungus in Sierra Leone. International Rice Research Notes 6: 13-14.
- Thomas, M.D. 1984. Dry-season survival of *Rhynchosporium oryzae* in rice leaves and stored seeds. Mycologia 76(6): 1111-1113.
- Thomas, M.D., Mayngo, D., Overly, W. 1985. Supression and elimination of *Rhynchosporium oryzae* by benomyl in rice foliage and seed in Liberia. Plant Disease 69(10): 884-886.
- Tisdale, W.E. 1922. Seedling blight and stackburn of rice and the hot water treatment. Technical Bulletin, United States Departament of Agriculture N° 1116, 11p.
- Tullis, E.C. 1936. Fungi isolated from discoloured rice kernels. Technical Bulletin, United States Departament of Agriculture N° 540, 12 p.

- Valarini, P.J., Lasca, C.C., Ciba, S. 1988. Eficiência de fungicidas em tratamento de sementes de arroz para controle de *Helminthosporium oryzae*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 23(1): 41-44.
- Vir, E., Mathur, S.B., Neergaard, P. 1971. Efficacy of certain fungicides against seed-borne infection by *Trichoconis padwickii*. Indian Phytopathology 24: 343-346.
- Webster, R.K., Gunnell, P.S. eds. 1992. Compendium of Rice Diseases. St. Paul, Minnesota, USA, The American Phytopathological Society. 92 p.
- Winter, W.E., Mathur, S.B., Neergaard, P. 1974. Seed-borne organism of Argentina: A survey. Plant Disease Reporter 58(6): 507-511.
- Zambolim, L. 2004. Importância do tratamento de sementes no manejo integrado de doenças. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes 8, João Pessoa, Palestras e resumos, p. 94-100.