



Facultad de Ciencias Agrarias

Trabajo Final de Graduación

**“CARACTERIZACIÓN SINTOMÁTICA Y ETIOLOGÍA DEL MANCHADO DEL
GRANO DE ARROZ”**

Modalidad Tesina

AUTOR: MONFARDINI JOANA LORENA

DIRECTORA: DRA. ING. AGR. GUTIÉRREZ SUSANA

Año 2019

Índice

	Página
Portada	1
ÍNDICE	2
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
Manchado del grano	3
Etiología del manchado del grano	4
Síntomas de la enfermedad	4
OBJETIVOS	6
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Trabajos de campo	6
Trabajos de laboratorio	6
Trabajos de invernáculo	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
CONCLUSIONES	15
BIBLIOGRAFÍA	15-17

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El arroz es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia Poácea. Existen 19 especies, siendo el arroz común (*Oryza sativa L.*), la especie más importante para la alimentación humana. Este cereal es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial; se considera el más importante del mundo por la extensión de la superficie en que se cultiva y la cantidad de personas que dependen de su cosecha (FAO, 2004).

La producción y consumo mundial de arroz se concentra principalmente en Asia. En Argentina, se produce mayormente en las provincias de Corrientes, Entre Ríos y Santa Fe. En la campaña 2017/2018 se produjeron 1.370 mil toneladas de arroz en 202 mil hectáreas sembradas (CREA, 2018).

Es un cultivo de importancia económica para Corrientes, considerada la principal provincia arrocera de Argentina. Actualmente su producción en la provincia comprende cuatro grandes zonas productivas según se detalla en la Figura 1 (ACPA, 2019). <http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar>.

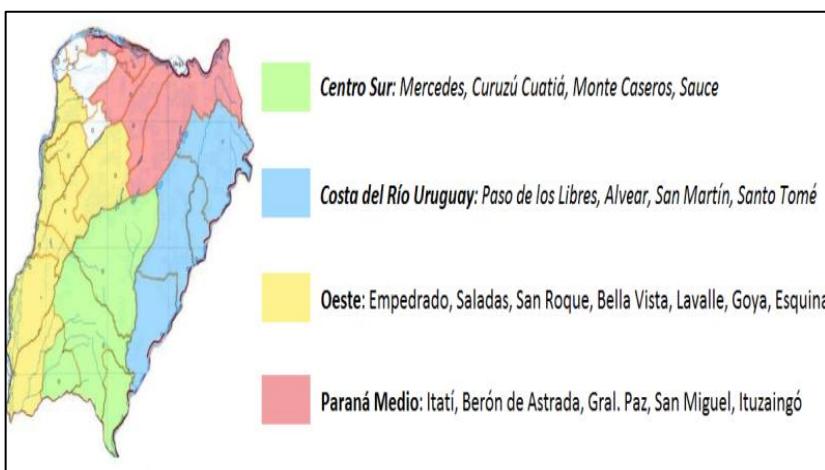


Fig. 1. Zonas productivas de la Provincia de Corrientes.

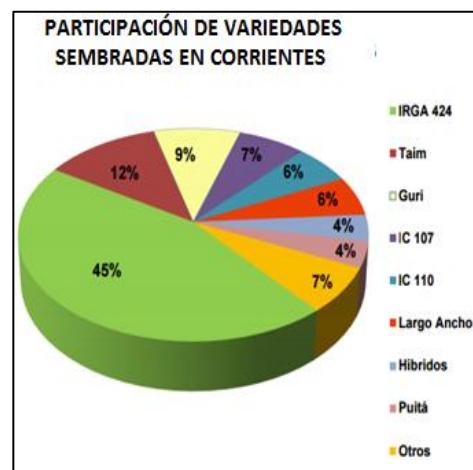


Fig. 2. Variedades sembradas en la Provincia de Corrientes

Manchado del Grano

Entre los factores que inciden en los rendimientos y calidad de la producción del arroz se encuentran las enfermedades parasitarias que afectan al cultivo desde la germinación hasta la madurez fisiológica (Ou, 1985; Webster, 1992).

Entre estas el manchado del grano (MG), que en idioma inglés se designa con varios nombres vulgares, descriptivos de las características sintomáticas, a saber: spotted rice, brown spot, dirty rice, stackburn, red blotch, black kernel, pecky rice, bunt, scab, black rot, glume discoloration, grain discoloration. En condiciones de campo el manchado del grano es un problema complejo, ocasionado por la interacción de hospedante-patógeno-ambiente, que se manifiesta en el período que comprende desde la floración hasta la maduración del arroz.

La importancia económica de la enfermedad radica en que incide directamente en los componentes del rendimiento provocando alto porcentaje de vaneo, disminución de la germinación entre un 26 y 41%; en el vigor y tamaño de las plántulas; en el número de granos por panoja; peso de los granos hasta un 40%; llenado de los granos en un 30%, disminución del poder germinativo, y también afecta la calidad del grano para consumo porque se tornan quebradizos durante la molienda (Chandramani, 2007, Bodalkar y Awadhiya, 2014, Behera, 2011, Pincioli et al., 2003, Mew y Gonzales, 2002, Malavolta y Bedendo, 1999, Ou, 1985, Castaño, 1985a,b).

Entre los factores predisponentes de la enfermedad, se encuentran la resistencia de la variedad, la nutrición y el estado fenológico porque se manifiesta en el período que comprende desde la floración hasta la maduración del grano de arroz pero si se produce al emergir la panoja, provoca los mayores perjuicios (Mew y Gonzales, 2002, Castaño et al. 1998, Rodríguez et al., 1992, Webster y Gunnell, 1992, Rodríguez, 1988, Castaño, 1985, Ou, 1985, Huber, 1981).

La incidencia de la enfermedad depende del microorganismo causal, de factores predisponentes del cultivo y sumado a esto, los factores ambientales que ejercen un rol notorio puesto que el MG es más común en suelos infértilles, típicos de las zonas tropicales asociado con períodos lluviosos y humedad relativa alta (Castaño 1998, Huber, 1993, Misra et al., 1992, Rodríguez et al., 1992).

Etiología del manchado del grano

Con respecto a la etiología de la enfermedad, ésta es compleja, porque involucra varios géneros de hongos y/o bacterias que ocurren simultáneamente sobre los granos de arroz. Los estudios realizados sobre los agentes causales refieren a una amplia población de microorganismos, los cuales varían según las diferentes regiones de cultivo, en cuanto a su prevalencia, incidencia, susceptibilidad de variedades, condiciones ambientales, etc. (Ibrahim y Abo El-Dahab, 2014, Mew y Gonzales, 2002, Rodríguez et. al., 1988).

Con pocas excepciones, es imposible determinar el microorganismo involucrado en el manchado de grano, sin previo examen microscópico, incluso a veces es necesario realizar aislamientos (Padwick, 1950). Con respecto al tema, Carrera (1974), afirma que los análisis de granos enfermos han demostrado que uno o más géneros pueden ser responsables del MG, y que habitualmente algunos de ellos se comportan como predominantes sobre los restantes.

Por lo general en cada región de cultivo, a nivel mundial o local, siempre se detecta más de un microorganismo asociado a la enfermedad; en Colombia por ejemplo, Castaño (1985), identificó a *Helminthosporium oryzae*, *Rhynchosporium oryzae*, *Phyllosticta* sp., *Alternaria padwickii*, *Curvularia* spp., *Helicoceras oryzae*, *Fusarium* spp., *Pyricularia oryzae*, *Chaetomium* sp., *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., algunas bacterias, y hongos no identificados (sin esporular); así mismo para Cuba se han identificado alrededor de 99 especies, pertenecientes a 59 géneros fúngicos (Nenínger et al., 2003), también Rivero et al., (2012), determinaron, asociados a los granos de arroz manchados 19 géneros, siendo los de mayor incidencia *Bipolaris*, *Sarocladium* y especies de los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Curvularia* y *Phoma*.

En Argentina, Marchionatto (1943) fue el primero que estudió el problema; en muestras de semillas que tenían las cáscaras manchadas, determinó varios géneros de hongos (*Helminthosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Brachysporium* sp., y *Phoma* sp.), predominando *Alternaria* sp., y *Curvularia* sp. Del mismo modo, Winter et al. (1974) identificaron 13 especies de hongos transmitidos por la semilla, varios de ellos asociados con la disminución de la viabilidad y el problema del manchado del grano; algunas de las muestras estudiadas procedían de la provincia de Corrientes.

Actualmente existen 18 enfermedades de origen fúngico que afectan al cultivo de arroz en Corrientes; entre ellas, el MG es una de las enfermedades de importancia creciente debido a su amplia distribución y por afectar diferentes variedades de arroz, con valores de incidencia que varían desde 5 a 40% (Dirchwolf, et al., 2018, Velozo y Gutiérrez, 2012, Gutiérrez y Cúndom, 2008, Gutiérrez y Mazzanti de Castañón, 2003). Así también Dirchwolf (2015), García y Gutiérrez (2008), Gutiérrez (2003), Gutiérrez y Cúndom (2008 a, b), determinaron la presencia de varios géneros de hongos y/o especies causando el manchado de los granos de arroz. Entre éstos se mencionan a *Curvularia* sp., *Bipolaris* sp., *B. oryzae*, *Fusarium* sp., *Microdochium oryzae*, *Phoma* sp., *Alternaria* sp., *A. padwickii*, *Aspergillus* sp., *Epicoccum* sp., *Nigrospora* sp., *Tilletia* sp., *Gelasinospora* sp., *Sordaria* sp., *Chaetomium* sp., *Exserohilum* sp., *Gaeumannomyces* sp., *Nakataea* sp., *Helicoceras* sp., *Melannoma glumarum*, *Podospora* sp., *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia* sp., *Thielavia* sp., *Ulocladium* sp., *Pestalotia* sp., *Penicillium* spp., *Periconia* sp., y *Rhizopus* sp.

De ésta población de hongos, *M. oryzae*, *B. oryzae* y *A. padwickii*, se destacan por su alta incidencia y prevalencia (Dirchwolf, et al., 2018, Velozo y Gutiérrez, 2012, Lovato et al., 2011, Gutiérrez y Cúndom, 2008, Gutiérrez y Mazzanti de Castañón, 2003).

Síntomas de la enfermedad

En relación a la sintomatología del MG, comprende manchas en las glumas que varían desde pequeños puntos oscuros, a extensas áreas de diferentes coloraciones que pueden alcanzar hasta el 100 % de su superficie; la decoloración puede profundizar afectando el endosperma y a veces el embrión (Mew y Misra, 1994, Webster y Gunnell, 1992, Castaño, 1985a, b, Ou, 1985, Agarwal et al., 1989).

Según la bibliografía consultada, para describir el síntoma de esta enfermedad es frecuente el uso de la terminología “decoloración”, que según la tonalidad y la forma puede ser atribuida a uno o varios géneros y/o especies de hongos y/o bacterias, según se describe a continuación:

Tabla 1. Diversidad de síntomas del manchado del grano de arroz.

Síntoma: Decoloración en glumas	Géneros y/o especie de hongo asociado al síntoma decoloración	Referencias
Decoloración gris ceniza	<i>Alternaria alternata</i> .	(Sachan y Agarwal, 1995)
Decoloración oscura, manchas castañas oscuras	<i>Helminthosporium oryzae</i> .	(Sachan y Agarwal, 1995)
Mancha ocular	<i>Curvularia lunata</i>	(Sachan y Agarwal, 1995)
Decoloración rosa claro	<i>Fusarium spp.</i>	(Sachan y Agarwal, 1995)
Decoloración castaño claro	<i>Sarocladium oryzae</i>	(Sachan y Agarwal, 1995) (Ibrahim y Abo El-Dahab, 2014)
Decoloraciones gris ceniza, castaño oscuro, rosa y/o amarillo claro.	<i>Alternaria padwickii</i>	(Ibrahim y Abo El-Dahab, 2014)
Decoloraciones castaño claro, castaño oscuro, puntos negros, manchas castañas y/o amarrillo pálido.	<i>Bipolaris spp.</i>	(Ibrahim y Abo El-Dahab, 2014)
Manchas castaño oscuro	<i>Curvularia oryzae</i>	(Ibrahim y Abo El-Dahab, 2014)
Decoloraciones amarillo pálido a rosa claro.	<i>Fusarium spp.</i>	(Ibrahim y Abo El-Dahab, 2014)
Decoloración castaño oscuro y alto porcentaje de esterilidad	<i>Helminthosporium oryzae y Curvularia sp.</i>	(Castaño, 1985)
Oscurecimiento y manchado del grano	<i>Curvularia, Bipolaris, Exserohilum y Drechslera</i>	(Neninger et al., 1993)
Emblanquecimiento de las glumas	<i>C. lunata</i> .	(Marchionatto, 1943)

Otros trabajos realizados en el país corresponden a Sisterna et al., (1994), quiénes encontraron manchas de bordes indefinidos, color castaño claro a oscuro que podían abarcar desde un 25% de las glumelas hasta la totalidad de las mismas, así como también otras manchas circulares de centro castaño claro y borde definido castaño oscuro. Posteriormente, Pincioli et al. (2003), asociaron tres tipos de manchas en granos de arroz: (a) manchas circulares y pequeñas semejantes a puntuaciones o picaduras de insectos, b) manchas grandes, oblongas con el centro grisáceo, y c) mancha que cubre casi la totalidad del pericarpio, sin aclarar un agente causal específico.

Con respecto a la patogenicidad de los agentes causales de la enfermedad, Bodalkar y Awadhiya (2014) en la India, comprobaron la capacidad patógena de los hongos *Sarocladium oryzae*, *Drechslera oryzae*, *Fusarium moniliforme* y *Curvularia lunata* infectando las panojas de arroz; en China, Huang et al., (2011), completaron los postulados de Koch atribuyendo la enfermedad a un conjunto de patógenos fúngicos.

En nuestro país los estudios de patogenicidad son escasos. Al respecto, García y Gutiérrez (2008), lograron reproducir los síntomas del MG, mediante inoculaciones en plantas adultas con suspensiones de esporas de *Exserohilum* sp., y *Curvularia lunata*; mientras que Lovato et al., (2015) reprodujeron los síntomas de la enfermedad al inocular plantas de arroz con *A. padwickii*, observando oscurecimientos progresivos, granos vanos y lesiones de coloración castaño oscuro (variando desde minúsculas puntuaciones hasta cubrirlo en su totalidad).

Considerando estos antecedentes, se comprobó que la mayoría de estos trabajos realizados en el país, solamente han descripto una sintomatología muy general, asociada a una micoflora diversa, causante de la enfermedad, pero sin demostrar la patogenicidad de cada uno de agentes identificados, de tal manera de

asociar cada uno a un síntoma en particular (Dirchwolf, 2015, Velozo y Gutiérrez, 2012, Gutiérrez et al., 2008, Pincioli et al., 2003, Sisterna et al., 1994).

Teniendo en cuenta la importancia de la enfermedad, su frecuencia de aparición y la etiología compleja, se efectuó este trabajo a fin de identificar algunos microorganismos presentes y caracterizar la sintomatología asociada mediante la ejecución de pruebas de patogenicidad.

OBJETIVOS

- Obtener muestras de panojas, con granos manchados en cultivos de arroz.
- Caracterizar las diferentes sintomatologías asociadas.
- Identificar los principales microorganismos asociados a los síntomas observados y determinar la incidencia de cada uno de ellos.
- Probar la patogenicidad de los principales organismos identificados, en plantas adultas de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio comprendió trabajos de campo, laboratorio e invernáculo que fueron realizados en la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE).

Trabajos de campo

Durante la campaña agrícola 2014-2015, se recolectaron 30 panojas de arroz al azar de parcelas experimentales de cultivos ubicado en la Estancia Doña Marina, de la localidad de Itá Ibaté, Corrientes.

Trabajos de laboratorio

Una vez recolectadas las panojas de arroz, fueron herborizadas en papel de diario aquellas que presentaban granos manchados. Posteriormente fueron desgranadas y envasadas en bolsas de papel estéril, y sus granos se agruparon según sintomatologías similares.

Se realizaron observaciones macroscópicas de síntomas de la enfermedad en los granos de arroz, y su descripción correspondiente.

Posteriormente, con previa desinfección de los granos de arroz en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% por 10 minutos y lavadas a continuación 3 veces con agua estéril (5 minutos cada uno); se procedió a realizar la siembra in vitro de granos sintomáticos, que fueron sembrados en cajas de Petri con agar papa glucosa (APG) 1,5%, pH 6 con el agregado de un antibiótico (sulfato de estreptomicina). Se depositaron 10 semillas por caja y fueron incubadas a temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ con fotoperíodo de 12 h luz, 12 h oscuridad (Mathur y Kongsdal, 2003). A partir de las colonias desarrolladas se identificaron los microorganismos mediante sus características culturales y estructuras vegetativas y reproductivas, utilizando bibliografía específica: Ellis, (1971), Mew y Gonzales, (2002), Mew y Misra, (1994), Watanabe (2002). Se realizó un recuento de las colonias de cada microorganismo resultante, determinando los valores de incidencia de cada uno de ellos, mediante la fórmula (Malavolta et al., 2007):

Incidencia (%) del microorganismo: $(\text{N}^{\circ} \text{ de colonias del microorg.}/\text{N}^{\circ} \text{ granos totales sembrados}) \times 100$



Fig. 3, 4 y 5 siembras de granos manchados en APG

Se re aislaron los microorganismos obteniéndose colonias puras (Postulados de Koch), para ser usadas en las correspondientes inoculaciones (Castaño, 1985) y además obtener colonias puras para conservación, para ello se utilizó tubos de ensayo con el mismo medio de cultivo en pico de flauta.

Trabajos de invernáculo

Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron plantas de las variedades de arroz (Irga424, Puitá, IC20, IC110 y Taim), cuyas semillas fueron sembradas en macetas de 17x15cm de alto (20 semillas/maceta). Se efectuaron dos raleos a fin de lograr diez panojas efectivas por macetas. Se utilizaron en total 20 macetas (Fig. 6).

El inóculo consistió en suspensiones de esporas de los diferentes géneros de hongos (aislados a partir de los síntomas estudiados), utilizando una concentración de 4×10^7 esporas/ml de agua, aplicando dos métodos de inoculación: 1) Inyección de suspensión de esporas en estado de embuchamiento, y 2) Aspersión de suspensión de esporas en estado de emergencia de la panoja.

Las suspensiones se prepararon mediante raspado de la parte superficial de cada colonia fúngica, con agregado de dos gotas del dispersante "Twin" diluyendo en agua estéril, se realizó el conteo de esporas (hematocímetro) hasta alcanzar la concentración recomendada (García y Gutiérrez, 2008, Castaño, 1985).

Panojas y vainas embuchadas se cubrieron con bolsas plásticas para evitar la contaminación de tratamientos lindantes y conservar el ambiente de cámara húmeda (Fig.7). Se realizaron tres repeticiones por variedad, de cada tratamiento (inóculo) y se registraron los porcentajes de incidencia de granos enfermos, según fórmula (García y Gutiérrez, 2008, Malavolta et al., 2007):

$$\text{Incidencia en granos Ig (\%)} = \frac{\text{Número Gm}}{\text{Tg} \times 100}$$

donde (Gm: granos manchados, Tg: total granos).



Fig.6. Macetas con plantas de arroz en invernáculo



Fig. 7. Panoja días posteriores a la inoculación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la campaña agrícola 2014-2015, se recolectaron panojas de plantas de arroz de las variedades Irga 424, Taim, Puitá, IC110 e IC20 procedentes de la estancia Doña Marina (Itá Ibaté), Corrientes.

En observaciones macroscópicas de granos de arroz enfermos, se diferenciaron síntomas (decoloraciones) variados en forma, color y tamaño, que desarrollaron sobre las glumas de los granos. A tal efecto, los mismos fueron agrupados en cuatro categorías de síntomas (Figs. 8, 9, 10, 11) los cuales se describen a continuación: a) Síntoma 1: Decoloración castaño-rojiza cubriendo toda la gluma del grano, o parte de la misma, sin un borde definido, esto fue observado en granos de arroz enteros y vanos, predominando en éstos últimos); b) Síntoma 2: Decoloración grisácea sobre glumas de granos vanos mayormente, a veces de color rosa pálido; c) Síntoma 3: Decoloración castaño rojiza sobre la base del grano, y blanquecina hacia el ápice, tanto en granos vanos y enteros (50% y 50% respectivamente); d) Síntoma 4: Decoloración parcial del grano; la misma se inicia en la parte media con una franja color castaño-rojizo que va perdiendo su tono hacia la base del grano, la parte basal del grano coloración normal del grano (zona que no parece ser afectada).



Fig. 8. Síntoma 1.



Fig. 9. Síntoma 2.



Fig. 10. Síntoma 3.



Fig. 11. Síntoma 4.

A partir de la siembra de los granos sintomáticos desarrollaron colonias correspondientes a los siguientes géneros de hongos: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia lunata*, *Curvularia clavata*, *Exserohilum* sp., *Fusarium* sp., y una especie no identificada (NN) (Fig. 12).



Fig. 12. Recuento de colonias de microorganismos en cada tipo de síntoma.

En la Tabla 2, se mencionan los géneros de hongos y sus incidencias asociadas a cada tipo de síntoma. Se observó que un síntoma está asociado a varios géneros de hongos, aunque prevaleciendo siempre uno de ellos sobre los restantes géneros; así mismo, un género de hongo está asociado a distintos tipos de síntomas.

En relación a los géneros descriptos, para el síntoma 1, (Fig.25), el de mayor incidencia fue *Bipolaris* sp., seguido por *Alternaria* sp.; asociado al síntoma 2, *Curvularia clavata*, fue quién registró el mayor valor de incidencia; mientras que el síntoma 3, estuvo asociado principalmente a especies de *Curvularias clavata* y *lunata*; y el síntoma 4, fue relacionado a *C. lunata* y *Exserohilum* sp. (Tabla 2). No obstante, se constató la presencia de otros géneros de hongos pero con menores incidencias. Para el síntoma 4, ocurrió que algunos granos no desarrollaron hongos.

Tabla 2. Porcentaje de Incidencia de microorganismos asociados a los diferentes tipos de síntomas.

SÍNTOMA 1	SÍNTOMA 2	SÍNTOMA 3	SÍNTOMA 4
¹ <i>Bipolaris</i> sp. 51%	⁷ <i>Curvularia clavata</i> . 55%	⁷ <i>Curvularia clavata.(negra)</i> 56%	⁸ <i>Curvularia lunata(marrón)</i> 38%
² <i>Alternaria padwickii</i> 21,1%	⁶ NN 20%	⁸ <i>Curvularia lunata</i> 22%	⁹ <i>Exserohilum</i> sp. 36%
³ <i>Exserohilum</i> sp. 6,6%	² <i>Alternaria padwickii</i> 7,5%	⁵ <i>Fusarium</i> sp. 12%	⁴ <i>Aspergillus</i> sp. 14%
³ <i>Aspergillus</i> sp. 4,4%	¹ <i>Bipolaris</i> sp. 5%	⁴ <i>Aspergillus</i> sp. 6%	⁵ <i>Fusarium</i> sp. 8%
⁴ <i>Fusarium</i> sp. 4,4%	³ <i>Exserohilum</i> sp. 2,5%	⁶ NN 4%	⁷ <i>Curvularia clavata.(negra)</i> 2%
	⁵ <i>Fusarium</i> sp. 2,5%		Sin colonias 2%

A continuación se detallan características culturales y morfológicas de los géneros identificados (Fig.25):

- Alternaria padwickii* Colonias de color gris blanquecino de crecimiento radial, aspecto algodonoso, con micelio parcialmente superficial o inmerso; hifas septadas, con formación de esclerocios esféricos negros, sumergidos; conidios hialinos, con septos transversales (Fig. 15).
- Aspergillus* sp. Colonias de coloración verdosa con abundante esporulación de conidios hialinos, unicelulares, ubicados sobre fiáldes uniseriadas, en conidióforos hialinos (Fig. 18).
- Bipolaris* sp. Colonias con micelio aéreo, algodonoso, color negro y bordes gris, reverso oscuro de aspecto aterciopelado, de crecimiento rápido cubriendo la superficie de la caja de Petri en 5 días (4,5cm). Conidios rectos a ligeramente curvos con 8 tabiques de color castaño oscuro, de pared gruesa, sobre conidióforos tabicados, castaños, geniculados (Figs. 13 y 14).
- Curvularia clavata* Colonias de coloración negra, a veces con centro blanco, aterciopelada, con hifas septadas, presentando abundantes conidios, rectos o ligeramente curvos con forma claviforme de color castaño claro, con tres tabiques transversales; conidióforos castaño oscuro, simples, erectos, de pared gruesa, conteniendo conidios apicales y laterales (Figs. 16 y 17).
- Curvularia lunata* Desarrolló micelio aéreo e inmerso en el sustrato, color castaño, algodonoso o aterciopelado. Conidios usualmente curvos o rectos a veces elipsoidales; estructura micelial grande; conidióforo geniculado, castaño pálido a castaño oscuro, con las células de los extremos más pálidas que las otras (Figs. 22 y 23).
- Exserohilum* sp. Colonias de crecimiento radial, de color oscuro al inicio, adquiriendo posteriormente colores castaño, con abundante micelio aéreo, algodonoso, reverso oscuro, con hifas septadas; conidios solitarios, ligeramente rectos con hilo sobresaliente, tabicados (9 septos), color castaño oscuro, con células desigualmente coloreadas, siendo las células de ambos extremos, de color más claro que las intermedias (Fig. 21).
- Fusarium* sp. Colonias de color blanco tornándose a rosa pálido. Hifas despigmentadas en la vista microscópica. Conidióforos hialinos, simples o ramificados, portadores de conidios en

Micelio estéril

masas de esporas en sus ápices; conidios hialinos, de dos tipos: macroconidios fusiformes en masas de esporas de 4 tabiques, y microconidios hialinos, elipsoidales, apiculados en un extremo (Fig. 24).

Este género desarrolló micelio aéreo algodonoso abundante, de coloración violáceo; hifas con citoplasma denso, pigmentadas, que no lograron esporular y formación de clamidosporas (Figs. 19 y 20).



Fig. 13. *Bipolaris* sp.



Fig. 14. *Bipolaris* sp.



Fig. 15. *Alternaria padwickii*



Fig. 16. *Curvularia clavata*



Fig. 17. *Curvularia clavata*.

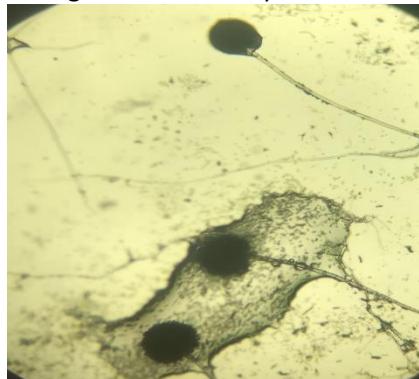


Fig. 18. *Aspergillus* sp.



Fig. 19. NN. Hifas



Fig. 20. NN. Clamidospora



Fig. 21. Conidios de *Exserohilum* sp.



Fig. 22. *Curvularia lunata*



Fig. 23. *Curvularia lunata*



Fig. 24. *Fusarium* sp.

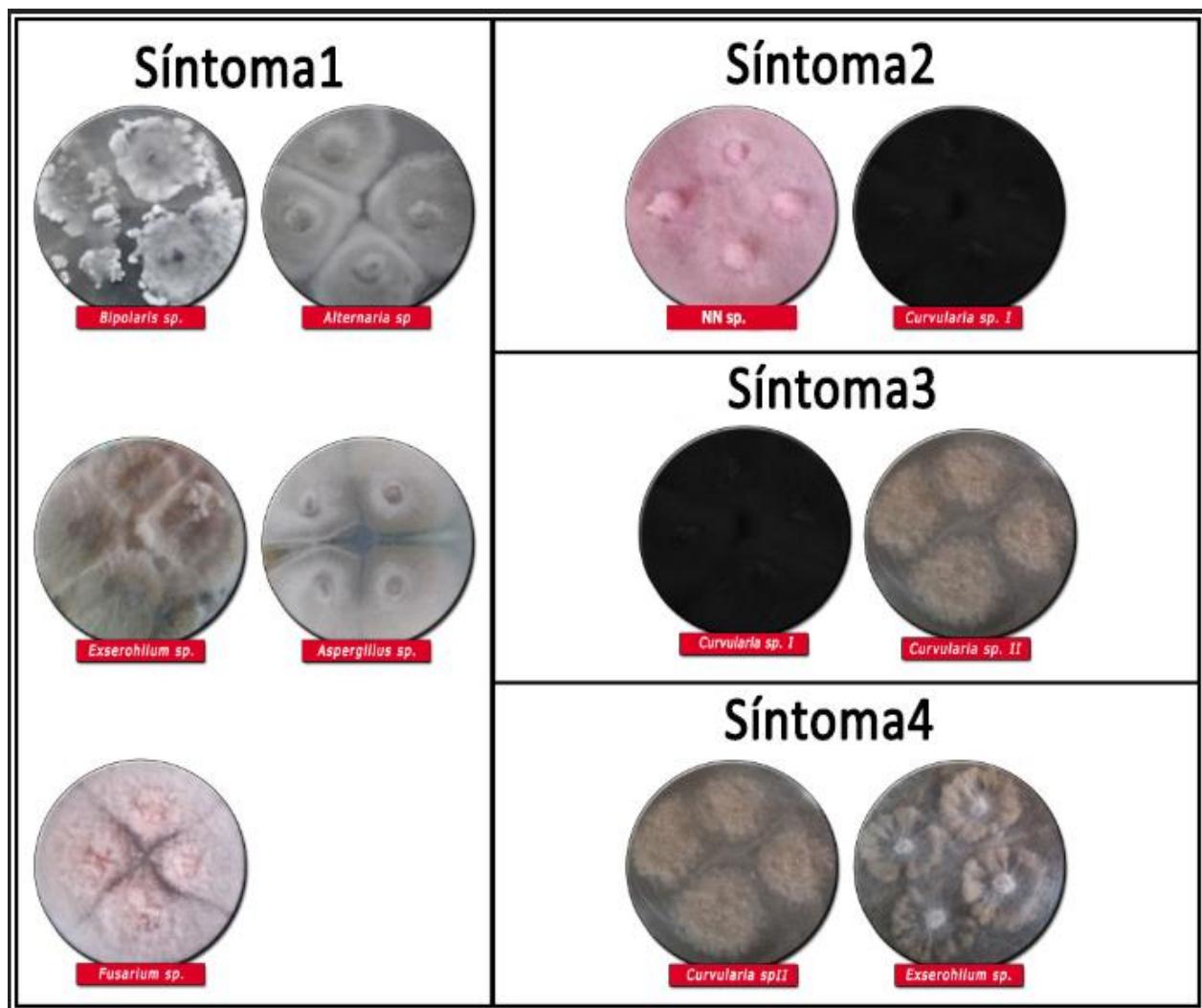


Fig. 25. Colonias aisladas en APG resultantes de la siembra de granos sintomáticos

A partir de los diferentes géneros de hongos purificados, se realizó la preparación de suspensiones de esporas para las pruebas de patogenicidad.

Veinte días posteriores a la inyección y aspersión, las panojas se recolectaron y desgranaron observándose detalladamente los síntomas.

Los resultados obtenidos mostraron que cada uno de los microorganismos inoculados, reprodujo algunos de los síntomas diferenciados inicialmente.

Al respecto, los géneros de hongos aislados a partir del síntoma 1, fueron capaces de ocasionar decoloraciones en las glumas, algunas similares al síntoma inicial, áreas manchadas parcialmente, hasta simples puntos con bordes bien definidos color castaño oscuro y centro más claro. Por ejemplo; el género *Bipolaris* sp., desarrolló el síntoma original pero, acompañado de otros síntomas tales como áreas puntiformes con bordes bien definidos, color castaño (Figs. 34 y 35). *Bipolaris* fue el género que provocó mayor semejanza al síntoma 1; en cuanto a coloración y forma, además la incidencia registrada fue 51%, superando ampliamente a otros patógenos.

En los granos inoculados con *A. padwickii*, se reprodujo el síntoma inicial 2, generando en las glumas de los granos de todas las variedades, áreas de color castaño oscuro a claro, y, áreas grisáceas, abarcando a veces la totalidad del grano según la variedad, sin poder definir donde comienza o termina el síntoma, debido a sus bordes difusos (Figs. 40 y 41).

Para las inoculaciones realizadas con *Exserohilum* sp., se registraron granos con áreas de color castaño en toda la superficie (Taim, IC20, Puitá) y decoloraciones parciales y puntos (IC110, Irga424), sin bordes definidos (Figs. 36,37, 38 y 39).

En los granos resultantes de las inoculaciones con *Aspergillus* sp., presentaron únicamente manchas localizadas, pálidas, color castaño muy claro (Figs.43 y 44), si bien la cantidad de granos manchados fue numerosa, el tamaño y cobertura de los síntomas ha sido de reducidas dimensiones; esta condición se repitió en todas las variedades excepto Taim que manifestó síntomas severos. Cabe mencionar que este género es considerado un hongo de almacenamiento, aunque algunos autores lo mencionan como agente causal del manchado del grano (Carrera, 1974; Gutiérrez et al., 2008a, b).

Las inoculaciones realizadas con *Fusarium* sp., manifestaron coloraciones oscuras grisáceas algunas veces sobre todo el grano y otras solo de manera parcial, a excepción de Irga424 que presentó escasos síntomas parciales sobre áreas muy reducidas (Figs. 46, 47 y 48).

Para el caso del síntoma 2, en las inoculaciones con *C. clavata*, solo la variedad Taim exhibió decoloraciones oscuras en la totalidad del grano, con características similares a la del síntoma original. Las restantes variedades mostraron síntoma solo en algunas áreas de las glumas.

Con respecto a las inoculaciones realizadas con el aislamiento NN, en las glumas de los granos se observó coloración grisácea en las variedades Taim y Puitá, y escasos granos por panoja. En las demás variedades las áreas manchadas fueron escasas (Figs. 50 y 51).

En las inoculaciones con *Fusarium* sp., se reprodujo el síntoma 2 (coloración oscura sobre la totalidad del grano, recubierta de un color grisáceo) en cuatro variedades a excepción de Irga 424, pero resulta clave mencionar que este microorganismo presentaba baja incidencia sobre los granos sintomáticos iniciales (Figs. 46, 47 y 48).

Con respecto a *A. padwickii* se logró reproducir el síntoma 2 inicialmente estudiado, aunque la incidencia de este microorganismo para el síntoma fue solo del 7%. En relación a esto, también Lovato (2015) observó oscurecimientos progresivos, aborto de flores, granos vanos y lesiones de coloración castaño oscuro en granos enteros de arroz (variando desde minúsculas puntuaciones hasta cubrirlo en su totalidad (Figs. 40 y 41).

Para el caso del síntoma 3, ningún microorganismo logró reproducir el síntoma inicial.

Con respecto a *C. clavata* (quién presentó mayor valor de incidencia), ocasionó manchas que avanzaron desde el ápice de la espiguilla hacia la base, situación ocurrida en todas las variedades. Los síntomas mas severos se presentaron en la variedad Taim, afectando en su totalidad a la espiguilla. No se logró reproducir la decoloración blancquecina observada en el síntoma inicial (Figs. 49, 50 y 51).

En las panojas inoculadas con *C. lunata*, los síntomas variaron desde coloraciones oscuras en el ápice, hasta áreas con puntuaciones según la variedad (Figs. 52,53 y 54).

En cuanto al síntoma 4, las sintomatologías reproducidas por *C. lunata* fueron similares a las observadas inicialmente, mientras que *Exserohilum* sp., ocasionó síntomas localizados en la parte apical de la espiguilla y en forma de puntuaciones dispersas. A pesar de la similitud de los síntomas, tanto de *C. lunata* como de *Exserohilum* sp., no se logró reproducir la decoloración blanquecina del ápice que presentaba el síntoma inicial (Figs. 36, 38, 39, 52,53 y 54).

A continuación se detallan los síntomas resultantes de las inoculaciones de microorganismos fúngicos en plantas adultas de arroz de distintas variedades:



Fig. 34. *Bipolaris* sp. (IC20)



Fig. 35. *Bipolaris* sp. (Puitá).



Fig. 36. *Exserohilum* sp. (IC110).



Fig. 37. *Exserohilum* sp. (IC20).



Fig. 38. *Exserohilum* sp. (IC110).



Fig. 39. *Exserohilum* sp (Puitá).



Fig. 40. *Alternaria padwickii* (IC110).



Fig. 41. *Alternaria padwickii* (IC20).



Fig. 42. NN (Taim).



Fig. 43. *Aspergillus* sp. (Taim).



Fig. 44. *Aspergillus* sp. (IC110).



Fig. 45. NN (Irga424).



Fig. 46. *Fusarium* sp. (Puitá).



Fig. 47. *Fusarium* sp. (IC20).



Fig. 48. *Fusarium* sp. (Irga424).



Fig. 49. *Curvularia clavata* (IC110).



Fig. 50. *Curvularia clavata* (Puitá).



Fig. 51. *Curvularia clavata* (Taim).



Fig. 52. *Curvularia lunata* (IC20).



Fig. 53. *Curvularia lunata* (Puitá).



Fig. 54. *Curvularia lunata* (Taim).

A partir de la siembra en APG de granos sintomáticos procedentes de las variedades de arroz inoculadas, se lograron re-aislar los microorganismos identificados, cumpliendo de esta manera con los postulados de Koch. Esto fue verificado a través de la comparación de las características culturales y morfológicas de cada uno de ellos.

En base a los resultados obtenidos se comprobó que los síntomas del manchado del grano, no fueron causados por un único microorganismo, sino por la acción de la presencia de varios de ellos; esto fue coincidente con los trabajos realizados por Ibrahim y Abo El-Dahab, (2014), Mew y Gonzales, (2002), Castaño et al. (1998), Webster y Gunnell, (1992), Castaño, (1998), Ou, (1985), Huber, (1981).

Asimismo se constató que el MG es causado por numerosos hongos, cuya presencia está relacionada a la susceptibilidad de la variedad y/o condiciones ambientales predisponentes, y a la variabilidad propia del microorganismo asociado. Según Carrera (1974), ésta situación puede condicionar la predominancia de un microrganismo sobre otros, lo cual fue observado al determinar los valores de incidencia de los diferentes hongos, que desarrollaron a partir de un síntoma.

También se comprobó que un microorganismo puede ocasionar más de un síntoma sobre las glumas de granos de arroz, tal como lo describen varios autores (Ibrahim y Abo El-Dahab, 2014, Sachan y Agarwal, 1995).

Los síntomas más severos se registraron en las variedades Taim y Puitá, lo cual podría estar relacionado a la susceptibilidad de la variedad, según lo manifiestan varios autores (Mew y Gonzales, 2002, Castaño et al., 1998, Webster y Gunnell, 1992, Ou, 1985, Huber, 1981).

Por lo expuesto se considera necesario profundizar los estudios sobre la patogenicidad de los numerosos géneros de hongos que pueden estar asociados a esta enfermedad.

CONCLUSIONES

- En granos manchados de arroz se diferenciaron cuatro tipos de síntomas.
- Se identificaron nueve géneros de hongos asociados a granos manchados de arroz en las variedades Taim, IC110, IC20, Irga424 y Puitá, a saber: *Bipolaris* sp., *Curvularia clavata*, *C. lunata*, *Exserohilum* sp., *Alternaria padwickii*, *Fusarium* sp, *Aspergillus* sp., y una especie no identificada (NN).
- Los géneros de hongos que presentaron mayor incidencia fueron: *C. clavata* (76 a 100%), *C. lunata* (70 a 100%), NN (70 a 100%), y *Bipolaris* sp. (62 a 98%).
- Las pruebas de patogenicidad cumplidas en las variedades de arroz estudiadas, permitieron reproducir algunos de los 4 tipos de síntomas diferenciados.
- Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, no se puede afirmar que un síntoma determinado es causado por un único patógeno. Pueden estar involucrados varios hongos predominando uno o dos sobre el resto.
- Se puede afirmar que la etiología de la enfermedad del manchado del grano del arroz es de naturaleza compleja.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, P.C. , Mortensen, C.N., Mathur, S.B. 1989. Seed-borne diseases and seed health testing of rice. New Delhi, India. Phytopathological Papers 30: 106.
- Asociación Correntina de Plantadores de Arroz, ACPA, <http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar>.
- Behera, B. 2011. Thesis advisor. Studies on etiology of fungi associated with grain discoloration disease of rice and their management. Department of Plant Pathology, Orissa University of Agriculture and Technology, Bhubaneswar- 751 003,Orissa.
- Carrera, M.H. 1974. Patología debida a hongos y tratamiento de la semilla de arroz. En: Primer Seminario Nacional de Semillas, 5 y 6 de agosto de 1974, San José, Costa Rica.
- Castaño, J. 1985a. Microorganismos asociados con el manchado del grano del arroz en Colombia. Arroz. 34: 22-25.
- Castaño, J. 1985b. Efecto del manchado del grano de arroz sobre algunos estados de desarrollo de la planta de arroz Arroz. 34 (338): 22-26.
- Castaño, J. 1998. Etiología del manchado del grano en arroz de secano en Colombia e Indonesia. Nº12 FITOPATOLOGIA - Universidad de Caldas .
- Chandramani R. 2007. Thesis: Studies on grain discoloration of rice. 104p.
- Bodalkar, C., G.K. Awadhya. 2014. Assessment of Percent Grain Discoloration in Important Rice Varieties. International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology. 1(4): 61-64.
- CREA. Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola. 2018. Informe macroeconómico N°249. p1. recuperado de: <https://www.crea.org.ar/wp-content/uploads/2018/11/Informe-Macroeconomico-N%C2%BA249.pdf>
- Dirchwolf, P. 2015. Monitoreo de enfermedades en el cultivo de arroz campaña 2014/2015. ACPA.
- Dirchwolf, P.M, Gutiérrez, S.A., Carmona, M.A. 2018. Assessment of grain discoloration in the main rice genotypes of Corrientes Province, Argentina. Summa Phytopathologica. 44(3): 271-273.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 608p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2004. recuperado de: <http://www.fao.org/rice2004/es/rice-us.htm>
- García, A., Gutiérrez, S. 2008. Patogenicidad de hongos asociados a granos manchados de arroz. En A. A. Fitopatólogos., 1º Congreso Argentino de Fitopatología, Libro de Resúmenes. 382p.
- Gutiérrez, S.A., Cúndom, M.A. 2008a. Situación actual de las enfermedades del arroz en Argentina. En: Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas, SGCYT, UNNE.
- Gutiérrez, S.A., Cúndom, M.A. 2008b. Incidencia y prevalencia de hongos en semillas de arroz. En: VI Congreso Latinoamericano de Micología, Mar del Plata.

- Gutiérrez, S.A., Mazzanti de Castañón, M.A. 2003. Hongos Asociados a granos manchados de arroz. Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas, SGCYT, UNNE.
- Huang, S., Ling, W., Lian-Meng L., Shao-Qing T., De-Feng Zhu, Serge S. 2011. Rice spikelet rot disease in China e 2. Pathogenicity tests, assessment of the importance of the disease, and preliminary evaluation of control options. Crop Protection 30: 10-17.
- Huber, D.M. 1981. The role of mineral nutrition in defense. In: J. G. HORSFALL and E. B.COWLING (Eds). Plant Disease: An Advanced Treatise. (5): 381p.
- Huber, DM. 1993. Soil plant pathogens. Managament of diseases with macro and microelements. APS. Press: 1-8
- Ibrahim, E., Abo El-Dahab, M.S. 2014. Seed discoloration and their effect on seedlings growth of egypcia hybrid rice. Research Journal of Seed Science 7(3): 63-74.
- ISTA International Seed Testing Association. 1985. International Seed Testing Association rules book. Seed Sci. and Technology. 13(2): 299-520.
- Lee, S.C., Alvenda, M.E., Bonman, J.M., Heinrich, H. A. 1986. Insects and Pathogens Associated with Rice Grain Dicoloration and Their Relationship in Philippines, Korean Journal of Plant Protection 25(2): 107-112.
- Lovato, A.D., Gutiérrez, S.A, Carmona M.A. 2011. Ubicación de *Alternaria padwickii* en semillas de arroz. En: II Congreso Argentino de Fitopatología, Resumen. Mar del Plata, Argentina. 259p.
- Malavolta, V.M.A., Bedendo, I.P. 1999. Daños debidos a manchas de granos de arroz causadas por hongos. Summa Phytopatologica 25 (4): 324-330.
- Malavolta, V.M.A., Arruda Soligo, E., Dias, D.D., Azzinni, L.E., Bastos, C.R. 2007. Incidência de fungos e quantificação de danos em sementes de genótipos de arroz. Summa Phytopathologica 33 (3): 280-286.
- Marchionatto, J.B. 1943. El "manchado" de los granos de arroz y los hongos que lo acompañan. Revista Argentina de Agronomía. 10 (2): 114-116.
- Mathur, S.B., Kongsdal, O. 2003. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. 3°. Copenhagen, Denmark. 427 p.
- Mew, T.W., Gonzales, P. 2002. A handbook of rice seedborne fungi. Los Baños, Laguna, International Rice Research Institute. 14-42.
- Mew, T.W., Misra, J.K. 1994. A Manual of Rice Seed Health Testing. Manila, Philippines, International Rice Research Institute. 76-89.
- Misra, A.K., Vir, D. 1992. Effect of different agronomic practices on the incidence of seed discoloration in paddy. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology 22: 44-48.
- Neninger, L.H., Hidalgo E.I., Barrios, L.M., Pueyo, M. 2003. Hongos presentes en semillas de arroz (*Oryza sativa L.*) en Cuba. Revista Fitosanidad 7 (3): 7-11
- Ou, S.H. 1985. Rice Diseases. 2d ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, UK, 368 p.
- Padwick, G.W. 1950. Manual of Rice diseases. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute. 198p.
- Pincioli, M., Sisterna, M., Bezas, R., Vidal, A.A. 2003. Manchado del grano de arroz: efecto de la fertilización nitrogenada. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 105 (2): 88-96.
- Rigonatto, R.E., Gutiérrez, S.A. 2006. Enfermedades determinadas en cultivos de arroz, campaña 2005-2006. En: Proyecto Arroz Campaña 2006- 2007, Estación Experimental INTA, vol. 14: 25-28.
- Rivero Gonzales, D., Cruz Triana, A., Rodriguez Pedroso A.T., Echevarría Hernández, A., Martínez Coca, B. Hongos asociados al manchado del grano en la variedad de arroz INCA LP-5 (*Oryza sativa L.*) en Cuba. Revista de la Sociedad Venezolana Microbiología 32(2): 131-138.
- Rodríguez, H. A., Nass, H. A., Ortiz, Z. M. 1992. Enfermedades del arroz y su manejo en Venezuela. Centro Internacional de Agricultura Tropical Vol.3: 67p.
- Rodríguez, H.A., Nass, H., Aleman, L. 1988. Incidencia y control del manchado del grano de arroz. Fitopatología Venezolana 1(1): 5-7.
- Sachan I.P., Agarwal V.K. 1995. Seed discolouration of rice: location of inoculum and influence on nutritional value. Indian Phytopathology 48 (1): 14-20.

- Sisterna, M.N., Lori, G.A., Marassi, J. 1994. Sintomatología y hongos asociados al manchado del grano de arroz en el genotipo Irga409. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata, 70: 13-21.
- Velozo, Lucia E., Gutiérrez, Susana A. 2012. Incidencia y severidad del manchado del grano en tres variedades de arroz. XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas, SGCYT, UNNE.
- Webster, R.K., Gunnell, P.S. eds. 1992. Compendium of Rice Diseases. St. Paul, Minnesota, USA. The American Phytopathological Society. 92 p.
- Watanabe, T. 2nd Ed. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi - Morphologies of cultured Fungi and Key to Species. 506 p.
- Winter, W. E., Mathur, S.B., and Neergaard, P. 1974. Seedborne organisms of Argentina: A Survey. Plant Disease Reporter 58 (6): 507-511.