

Concentración de inóculo adecuada para estudiar la relación entre plántulas de café y *Rhizoctonia solani* o *Myrothecium roridum*¹

Wanda I. Mercado² y Rocío del P. Rodríguez³

J. Agric. Univ. P.R. 83(3-4):181-188 (1999)

RESUMEN

Se determinó el nivel adecuado de inóculo de *Rhizoctonia solani* y *Myrothecium roridum* para la inducción de síntomas en plántulas de café (*Coffea arabica* L.) basado en el porcentaje de mortandad y la incidencia de la enfermedad. Se encontró que para *R. solani* y *M. roridum* el nivel de inóculo adecuado fue 15 y 10%, respectivamente. *Myrothecium roridum* fue más virulento que *R. solani* ocasionando mayor mortandad en las plántulas de café. Para ambos patógenos, a medida que aumenta la concentración del inóculo disminuye el peso seco de las plántulas. Hay relación directa positiva entre la incidencia de la enfermedad y la concentración del inóculo, donde a medida que aumenta la concentración aumenta la incidencia de la enfermedad. Se encontró que *R. solani* es más persistente que *M. roridum* en el suelo inoculado.

ABSTRACT

Level of inoculum suitable for studies on the relationship of coffee seedlings and *Rhizoctonia solani* or *Myrothecium roridum*

Suitable levels of inoculum of *Rhizoctonia solani* and *Myrothecium roridum* for the induction of symptoms in coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings were determined in greenhouse tests based on the percentage of seedling mortality and disease incidence. Best inoculum level for *R. solani* and *M. roridum* was 15 and 10%, respectively. *Myrothecium roridum* was more virulent than *R. solani*, and thus caused higher mortality of coffee seedlings. For both pathogens, as the inoculum concentration increased, the dry weight of plants decreased. A direct positive relation between incidence of the disease and concentration of the inoculum was detected. It was found that *R. solani* is more persistent than *M. roridum* in the inoculated soil.

Key words: root rot, canker, *C. arabica*, nurseries

INTRODUCCION

En los semilleros y viveros de café, la producción de plantas se afecta severamente por los hongos *Rhizoctonia solani* Kühn y *Myrothecium*

¹Manuscrito sometido a la Junta Editorial el 11 de agosto de 1998.

²Asociado de Investigaciones, Depto. Protección de Cultivos.

³Investigadora, Depto. Protección de Cultivos, UPR-Recinto de Mayagüez, Apdo. 9030, Mayagüez, PR 00681.

roridum Tode ex. Fr., causantes de canchros del tallo y podredumbre de la raíz. Estos organismos han ocasionado hasta un 100% de pérdidas a los productores de estas plantas en viveros (Rodríguez et al., 1996). Los síntomas de estas enfermedades son más evidentes durante la época lluviosa de septiembre a noviembre, y se caracterizan por la presencia de canchros en la base o los entrenudos del tallo, pudrición de las raíces y reducción de la masa radicular de los cafetos (Rodríguez et al., 1996).

En los estudios con organismos patógenos generalmente se intenta reproducir las etapas del ciclo de la enfermedad de manera similar a lo que ocurre bajo condiciones naturales. Uno de los aspectos más importantes para reproducir los síntomas causados por estos organismos es conocer el nivel adecuado de inóculo. Con el fin de conocer el nivel adecuado de inóculo de *R. solani* y *M. roridum* se examinaron varias concentraciones de inóculo para la inducción de los síntomas.

MATERIALES Y METODOS

Para determinar los niveles adecuados de infestación del suelo con *Rhizoctonia solani* y *Myrothecium roridum* en café se realizaron varias pruebas de invernadero. En todos los ensayos se utilizó un diseño de bloques completos aleatorizados con tres replicaciones. Los tratamientos consistieron de diferentes concentraciones de inóculo y un testigo.

La producción del inóculo de *R. solani* y *M. roridum* se hizo mediante una modificación del método utilizado por Vicente et al. (1989). Se colocó arroz en una bandeja con agua y se dejó embebiendo por 12 h, luego se eliminó el agua y se lavó tres veces en agua corriente. El arroz se transfirió a matraces Erlenmeyer de 1,000 ml y se esterilizó por 50 min a 121°C y 1.03×10^5 Pa. Se dejó enfriar y en cada matraz se colocaron 10 discos de agar papa-dextrosa acidulado (APD ac.) previamente colonizados por los hongos. Estos frascos se incubaron por un mes a temperatura de salón ($22.2 \pm 5^\circ\text{C}$).

El inóculo se incorporó a la mezcla de suelo recomendada para los viveros de café, proveniente de la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas. Esta mezcla consistía de cachaza, suelo y aluvión en una proporción de 1:1:1. La mezcla de suelo se esterilizó previamente por 30 min por dos días consecutivos a 121°C y 1.03×10^5 Pa. El inóculo se incorporó a 500 g de esta mezcla en tiestos de cuatro pulgadas.

Para ambos patógenos se evaluaron las concentraciones de 2, 4, 6 y 8% (múltiplos de 2) y 5, 10, 15 y 20% (múltiplos de 5) de inóculo en ensayos separados. Los testigos consistieron de suelo mezclado con arroz solamente, en una proporción de 8 y 20% de arroz, dependiendo del ensayo a realizarse. Cada ensayo se repitió dos veces en fechas diferentes. En la primera prueba se trasplantaron tres plántulas de cafetos cv. Ca-

turra, en etapa de chapola (hojas cotiledonáreas) en cada tiesto y se observaron cada 48 horas por 30 días. Al finalizar este período se removieron las plántulas del suelo y se evaluaron los síntomas. Se colocó una plántula en una cámara húmeda y se incubó por 15 días a $22 \pm 5^\circ\text{C}$ para corroborar la presencia de los hongos. Las plántulas restantes se secaron en un horno de aire forzado a 60°C por 48 h y luego se pesaron. En el suelo remanente se trasplantaron nuevas plántulas y se repitió el procedimiento de la primera prueba.

Al comienzo y al final de cada prueba se determinó la densidad poblacional de estos hongos. Para *R. solani* se utilizó el método de trampas con semillas de remolacha (*Beta vulgaris* L.) las cuales se mezclaron con las muestras de suelo correspondientes y donde se determinó el porcentaje de semillas colonizadas por *R. solani* (Papavizas et al., 1975). Con *M. roridum* se utilizó la técnica de diluciones de suelo donde se distribuyó un mililitro de cada una de las suspensiones en platos de petri con APD ac. Los platos se incubaron por 15 días a temperatura de salón o hasta observar el crecimiento característico de *M. roridum*. Se determinó la densidad poblacional basada en el número de unidades formadoras de colonias (UFC), estimado a partir del número de colonias que se desarrollaron multiplicado por la dilución de suelo correspondiente.

En ambos ensayos se midió el porcentaje de mortandad y la incidencia de la enfermedad. Las variables se examinaron con un análisis de varianza combinado, las medias se compararon con la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) y se realizaron comparaciones ortogonales.

RESULTADOS

En el suelo infestado con *R. solani*, las plántulas comenzaron a manifestar síntomas entre el segundo y cuarto día después de la siembra, dependiendo de la concentración de inóculo. La sintomatología presentada fue marchitez, canchales en la base del tallo, producción de raíces adventicias y muerte de la planta. En algunos casos, las plantas aparentaban estar sanas pero al momento de removerlas se observaban pequeños canchales en la base del tallo.

El porcentaje de plantas enfermas a los niveles de inóculo de 2, 6 y 8% fue de 72, 61 y 61% respectivamente (Cuadro 1). Cuando la concentración de inóculo fue de 5 a 20% los niveles más efectivos para la inducción de síntomas fueron 15 y 20% con 67 y 72% de plantas enfermas, respectivamente. En las plantas testigo no se observaron síntomas. Se encontró una tendencia lineal altamente significativa entre el efecto de la concentración del inóculo y la incidencia de la enfermedad (Cuadro 2). No hubo diferencias significativas para la variable ensayo, lo que nos indica que no hay diferencia en la incidencia

CUADRO 1.—Efecto de la concentración del inóculo de *Rhizoctonia solani* en la incidencia de la enfermedad (I), la mortandad (M) y el peso seco (PS) de plántulas de café.

Concentración	Prueba 1 ¹			Concentración	Prueba 2 ¹		
	I (%)	M (%)	PS (mg)		I (%)	M (%)	PS (mg)
2%	72 a ²	11 a	178 a	5%	50 ab	0 b	250 ab
4%	44 a	11 a	214 a	10%	33 bc	0 b	222 b
6%	61 a	11 a	176 a	15%	67 ab	5 b	202 b
8%	61 a	22 a	168 a	20%	72 a	39 a	117 c
Testigo ³	0 b	0 a	177 a	Testigo ⁴	0 c	0 b	280 a
CV	50.37	200.02	23.4	CV	62.08	141.87	20.48

¹Análisis combinado de dos ensayos con tres repeticiones.

²Promedios en columnas con la misma letra no difieren estadísticamente (P=0.05) con la prueba de Diferencia Mínima Significativa (LSD).

³Testigo = suelo más arroz al 8%.

⁴Testigo = suelo más arroz al 20%.

de la enfermedad en las plantas sembradas en inóculo fresco o aquellas sembradas en inóculo de un mes (Cuadro 2). El porcentaje de plantas muertas fue significativamente mayor solamente a la concentración de inóculo de 20% (Cuadro 1). Se encontró una tendencia lineal altamente significativa entre el efecto de la concentración del inóculo de 0 a 20% y el porcentaje de mortandad (Cuadro 2).

La densidad poblacional de *R. solani* en el suelo infestado con 6% de inóculo fue de 100%, mientras en aquellos suelos con nivel de inóculo de 2, 4 y 8% fue de 82, 74 y 75%, respectivamente. En los niveles de inóculo de 5 a 20% el 100% de las semillas de remolacha fueron colonizadas.

No hubo diferencias significativas en el peso seco de las plántulas de café con niveles de 0 a 8% de inóculo (Cuadro 1). Sin embargo, cuando el nivel de infestación fue de 0 a 20%, el peso seco de las plantas desarrolladas en suelo infestado con 10, 15 y 20% de inóculo fue significativamente menor al peso seco de las plantas testigo. Se encontró una tendencia lineal altamente significativa entre la concentración del inóculo de 0 a 20% y el peso seco (Cuadro 2).

En las pruebas con *M. roridum* los síntomas comenzaron a manifestarse entre el segundo y cuarto día después de la siembra, dependiendo de la concentración del inóculo. La sintomatología presentada fue de quemazón en los bordes de las hojas, cancro, poca producción de raíces y en algunos casos la muerte de la planta.

El porcentaje de plantas enfermas fue igual o menor de 50% con los niveles de inóculo de 2 a 8%, mientras que en los niveles de inóculo de 5

CUADRO 2.—Valores de *F* para la significancia del efecto de la concentración del inóculo de *R. solani* en la incidencia de la enfermedad (I), porcentaje de mortandad (M) y el peso seco (PS) usando comparaciones ortogonales.

Fuente de variación	Valor de F					
	0-8%			0-20%		
	I	M	PS	I	M	PS
Ensayo	0.02	0.73	0.10	1.34	4.46	2.92
Concentración	8.42**	0.76	0.42	6.68**	10.84**	11.98**
Lineal	6.26*	2.42	0.00	20.39**	26.21**	42.22**
Cuadrática	3.29	0.00	2.70	0.87	14.08**	2.29
Conc. × Ensayo	1.54	0.45	0.27	1.59	5.50**	0.68

* $P \leq 0.05$.

** $P \leq 0.01$.

a 20% la mayor incidencia se obtuvo a concentraciones de 10, 15 y 20% con 61, 83 y 89% de plantas afectadas, respectivamente. El porcentaje de plantas enfermas fue significativamente mayor cuando la concentración fue de 15 y 20%. Las plantas testigo no presentaron síntomas (Cuadro 3). Se encontró una tendencia lineal altamente significativa entre el efecto de concentración del inóculo y la incidencia de la enfermedad (Cuadro 4). Se encontraron diferencias significativas entre los ensayos. El porcentaje de plantas enfermas en suelo recién inoculado fue mayor que en las plantas trasplantadas un mes después de inoculado el suelo.

El porcentaje de plantas muertas fue significativamente mayor al testigo en suelo con 8% de inóculo y cuando los niveles fueron de 5, 10, 15 y 20% (Cuadro 3). Se detectó una tendencia lineal altamente significativa entre el efecto de la concentración y el porcentaje de mortandad (Cuadro 4).

Al finalizar cada prueba se recuperó un gran número de colonias de *M. roridum*, que no se pudieron contabilizar. Se observó que a la concentración de inóculo de 0 a 8% el número de UFC fue menor que a la concentración de 0 a 20%.

El peso seco de las plantas desarrolladas en el suelo infestado con 20% de inóculo de *M. roridum* fue significativamente menor que en las testigo (Cuadro 3). Se encontró una tendencia lineal altamente significativa entre la concentración de inóculo de 0 a 20% y el peso seco (Cuadro 4).

DISCUSION

En la relación *Rhizoctonia solani*—cafeto, el nivel de inóculo más adecuado para infestar el suelo fue 15%. Con esta concentración se garantizó

CUADRO 3.—Efecto de la concentración del inóculo de *Myrothecium roridum* en la incidencia de la enfermedad (I), la mortandad (M) y el peso seco (PS) en las plántulas de café.

Concentración	Prueba 1 ¹			Concentración	Prueba 2 ¹		
	I (%)	M (%)	PS (mg)		I (%)	M (%)	PS (mg)
2%	33 a ²	17 ab	213 ab	5%	50 b	22 c	257 a
4%	33 a	33 ab	208 ab	10%	61 b	44 bc	238 a
6%	33 a	33 ab	222 a	15%	83 a	56 ab	238 a
8%	50 a	39 a	196 ab	20%	89 a	72 a	128 b
Testigo ³	0 b	0 b	167 b	Testigo ⁴	0 c	0 d	280 a
CV	74.45	112.46	20.16	CV	29.35	52.64	25.17

¹Análisis combinado de dos ensayos con tres repeticiones.

²Promedios en columnas con la misma letra no difieren estadísticamente ($P = 0.05$) con la prueba de Diferencia Mínima Significativa.

³Testigo = suelo más arroz al 8%.

⁴Testigo = suelo más arroz al 20%.

la inducción de síntomas, una infestación del suelo relativamente uniforme y una mortandad no muy alta. Esta concentración es diferente a la informada por Papavizas y Davey (1962) quienes recomiendan 4% (v/v) de inóculo desarrollado en "sand corn meal". También difiere de Venkatasubbaiah et al. (1983) quienes en pruebas con plántulas de café utilizaron 10% (w/w) de inóculo producido en "oatmeal sand medium". Posiblemente el sustrato utilizado para incrementar el inóculo sea el factor determinante en las diferencias encontradas.

Para estudiar la relación de *Myrothecium roridum*—café, el nivel de inóculo más adecuado en el suelo es 10%. A esta concentración la incidencia de la enfermedad fue mayor de 60% y la mortandad de las plántulas menor de 44%. Indistintamente de la concentración del inóculo, la mayor mortandad de plántulas ocurrió en presencia de *M. roridum*. Estos resultados confirman lo informado por Rodríguez et al. (1996), quienes indican que *M. roridum* es más virulento que *R. solani*, y ocasiona mayor mortandad en las plántulas de café.

Para ambos hongos el efecto de la concentración de inóculo en la incidencia de la enfermedad fue altamente significativo. El peso seco de las plántulas que sobrevivieron a la inoculación fue menor que el de las plantas no expuestas a ambos patógenos a concentraciones de 0 a 20%. La relación entre el peso seco de las plántulas y el nivel de inóculo en el suelo fue negativa y significativa indicando que a medida que aumenta la concentración de inóculo disminuye el peso seco de las plántulas. Similar a lo informado por Bautista y Rodríguez (1996), el

CUADRO 4.- Valores de *F* para la significancia del efecto de la concentración del inóculo de *M. roridum* en la incidencia de la enfermedad (I), porcentaje de mortandad (M) y el peso seco (PS) usando comparaciones ortogonales.

Fuente de variación	Valor de F					
	0-8%			0-20%		
	I	M	PS	I	M	PS
Ensayo	20.29**	17.14**	86.76**	72.46**	52.87**	0.10
Concentración	4.00**	2.04	1.70	27.28**	11.45**	6.26**
Lineal	11.96**	7.10**	1.33	96.81**	45.09**	20.97**
Cuadrática	0.96	0.85	3.49	9.36**	0.52	3.39
Conc. × Ensayo	4.00**	2.04	1.70	6.51**	3.88	0.11

* $P \leq 0.05$.

** $P \leq 0.01$.

vigor de las plántulas disminuye aún en ausencia de síntomas, lo que podría afectarlas adversamente al momento del trasplante.

Se pudo examinar la persistencia de los patógenos en el suelo, evaluando el desarrollo de la infección en las plantas trasplantadas en suelo recién inoculado y un mes después de inoculado. La incidencia de plantas enfermas con *R. solani* no fue significativamente diferente en la repetición del ensayo. Sin embargo, la incidencia de plantas enfermas con *M. roridum* fue mayor cuando las plantas se trasplantaron en suelo recién inoculado que cuando se trasplantaron un mes después de la inoculación. Este resultado indica que la persistencia de ambos patógenos en el suelo varía, siendo *R. solani* más persistente que *M. roridum*. *Myrothecium roridum* puede sobrevivir en residuos de tejido enfermo (Srivastava y Singh, 1985) pero en suelo esterilizado e inoculado desaparece gradualmente (Nishat y Manoharachary, 1985). *Rhizoctonia solani* es un patógeno que puede sobrevivir saprofiticamente en el suelo por mucho tiempo en forma de hifa o esclerocio, asociado a los desechos orgánicos en el suelo (Boosalis y Scharen, 1959). El grado de persistencia del patógeno es un factor importante en la selección de estrategias de control. Las diferencias encontradas en la persistencia de *M. roridum* y *R. solani* en el suelo deberán ser consideradas para el manejo de las enfermedades que ocasionan estos hongos en los cafetos de semilleros y viveros.

LITERATURA CITADA

- Bautista, F. y R. P. Rodríguez, 1996. Dinámica poblacional de *Myrothecium roridum* Tode ex. Fr. y *Rhizoctonia solani* Kuhn en viveros comerciales de cafetos. *J. Agric. Univ. P.R.* 80(3):145-156.

- Boosalis, M.G and A. L. Scharen, 1959. Methods for microscopic detection of *Aphanomyces euteiches* and *Rhizoctonia solani* and for isolation of *R. solani* associated with plant debris. *Phytopathology* 49:192-198.
- Papavizas, G. C., P. B. Adams, R. D. Lumsden, J. A. Lewis, R. L. Dow, W. A. Ayers and J. G. Kantzes, 1975. Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. *Phytopathology* 65(8):871-877.
- Papavizas, G. C. and C. B. Davey, 1962. Isolation and pathogenicity of *Rhizoctonia* saprophytically existing in soil. *Phytopathology* 52:834-840.
- Rodríguez, R. P., L. Sánchez, W. González y O. Bosques, 1996. Patogenicidad de *Myrothecium roridum* y *Rhizoctonia solani* en cafetos en el vivero. *J. Agric. Univ. P.R.* 80(3):135-143.
- Srivastava, M. P. and S. Singh, 1985. Studies on survival of *Myrothecium roridum* Tode ex. Fr. *National Academy of Sciences Letters* 8(1):3-4.
- Venkatasubbaiah, P., K. M. Safeulla and H. S. Shetty, 1983. Phenolic content of coffee seedlings as influenced by *Rhizoctonia solani*. *Indian Phytopathology* 36(4):754-755.
- Vicente, N. E., N. Acosta y L. Sánchez, 1989. Sustratos de arroz (*Oryza sativa* L.) y el crecimiento del hongo biocontrolador de nematodos, *Paecilomyces lilacinus*. *J. Agric. Univ. P.R.* 73(1):79-82.