

RESPUESTA AL GLIFOSATO DE UN AISLAMIENTO DE *Rhizoctonia solani*, AGENTE CAUSAL DEL AÑUBLO DE LA VAINA DEL ARROZ, Y DE CUATRO AISLAMIENTOS DE *Trichoderma*, BAJO CONDICIONES *in vitro*¹

In vitro response of one isolate of *Rhizoctonia solani*, the pathogen of the rice sheath blight and four isolates of *Trichoderma* to glyphosate

Amparo Vargas de Álvarez², Cilia L. Fuentes³ y Enrique Torres-Torres³

RESUMEN

El añublo de la vaina del arroz (*Oryza sativa* L.), cuyo agente causal es *Rhizoctonia solani* Kuhn, es una de las enfermedades más importantes en el cultivo del arroz en Colombia. En los cultivos de arroz con frecuencia se aplica glifosato ((ácido N-(fosfonometil) glicina) para controlar las malezas, particularmente el arroz rojo (*O. sativa*), antes de la siembra del arroz. Observaciones de campo anteriores parecían indicar relación entre el uso intensivo del glifosato y el incremento en la incidencia del añublo de la vaina del arroz. Por tanto, se propuso el presente trabajo con el fin de dilucidar los posibles efectos del glifosato sobre *R. solani* y *Trichoderma* sp., conocido éste como antagonista de *R. solani*. Se determinó, bajo condiciones de laboratorio, el efecto del glifosato en el crecimiento, en medio líquido y sólido PDA, de *R. solani* y de *Trichoderma*. Se encontró que la dosis más alta de glifosato sin efecto detrimental sobre *R. solani*, fue de 300 mg/L y la dosis más baja del herbicida que causó la mayor inhibición del crecimiento del hongo fue de 2500 mg/L. Por otra parte, no se encontró que el glifosato estimulara el crecimiento de *R. solani*. En teoría, en una aplicación comercial de glifosato de 1,5 Kg ia/ha y asperjando directamente al suelo sin vegetación, el glifosato en el suelo estaría a una concentración de 0,75 mg/Kg de suelo (suponiendo que la capa arable de una hectárea de suelo pesa 2.000.000 de Kg); por tanto, la concentración de glifosato después de una aplicación comercial, está muy por debajo de la concentración a la cual se inicia la reducción del crecimiento de *R. solani*. Por su parte, la respuesta de *Trichoderma* al glifosato fue similar a la de *R. solani*; además, se encontró que el glifosato no afecta la capacidad antagonista de *Trichoderma* sobre *R. solani*. Estos resultados no apoyan la hipótesis que el glifosato, bajo las condiciones de uso en cultivos de arroz para el control de las malezas, estuviera afectando el crecimiento de *R. solani* o de su antagonista *Trichoderma*. Una posible relación entre el uso intensivo del herbicida y la incidencia del añublo de la vaina del arroz, debería investigarse en términos de supervivencia y germinación de esclerocios del patógeno.

Palabras claves: epidemiología, herbicidas, hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

Rhizoctonia solani Kuhn is the causal agent of the sheath blight of rice (*Oryza sativa* L.), one of the most important rice diseases in Colombia. Glyphosate (N-phosphonomethyl glycine acid) is sprayed in rice fields as a preplant herbicide, specially aimed at red rice (*O. sativa*). Preliminary field observations in Tolima, Colombia suggested a relationship between intensive use of glyphosate and sheath blight incidence. Thus, the present study was undertaken to shed light on the effect of glyphosate on *R. solani* and *Trichoderma* sp., a putative antagonist, under laboratory conditions. The effect of the herbicide was assessed on the growth of *R. solani* in submerged culture and solid media and of *Trichoderma* on solid media. *R. solani* withstood up to 300 mg L⁻¹ without expressing reduction in growth.

Increasing concentrations of the herbicide caused growth reduction, and the detrimental effect reached a plateau at 2500 mg L⁻¹. *Rhizoctonia* growth was not enhanced at any herbicide concentration. The expected concentration of glyphosate in the soil after spraying at commercial dosages would be 0,75 mg Kg⁻¹, which is well below the observed in vitro threshold. The response of *Trichoderma* was similar to that of *R. solani*. Glyphosate did not affect the antagonistic ability of *Trichoderma* against *R. solani*. These results do not support the view that glyphosate, as an herbicide treatment in rice field, may affect in any way the population densities of *R. solani* or its antagonist *Trichoderma* sp. Therefore, the postulated connection between intensive herbicide use and increased sheath blight incidence is not substantiated on mycelial growth alone. This relationship should be explored in terms of sclerotial survival and germination.

Key words: epidemiology, herbicides, fungal plant pathogens.

¹Basado en la tesis de grado M. Sc. de AVA.

²Profesora de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Agronomía, Bogotá, Colombia.

³Profesores Asociados. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. A.A. 14490. Bogotá, Colombia. E-mail: cilia_fuentes@lettera.net

INTRODUCCION

El añublo de la vaina, cuyo agente causal es *Rhizoctonia solani* Kuhn, grupo de anastomosis AG 1 (Silva, 1996) (estado perfecto *Thanatephorus cucumeris* Frank (Donk)), es una de las enfermedades más importantes en el cultivo de arroz en Colombia, ya que ataca las plantas en cualquier estado de desarrollo y reduce drásticamente los rendimientos y la calidad en molinería (Schreiber y Hernández, 1992). En los cultivos de arroz en Colombia, con frecuencia se aplica glifosato para controlar las malezas emergidas antes de la siembra del arroz. En los últimos años, se ha observado alguna relación entre el uso intensivo del glifosato y el incremento en la incidencia del añublo de la vaina del arroz.

Los conceptos y los registros de interacciones entre herbicidas, microorganismos y enfermedades de plantas, así como la protección o predisposición de cultivos a las enfermedades observadas después del uso de herbicidas han sido ampliamente revisadas por varios autores (Lévesque y Rahe, 1992, entre otros). De acuerdo con Lévesque y Rahe (1992), los herbicidas pueden alterar el ecosistema del suelo, debido al efecto directo sobre varios componentes de la microflora, como patógenos de plantas, antagonistas o micorrizas, efectos que pueden resultar en incremento o reducción de la incidencia de enfermedades en plantas. Sin embargo, las revisiones de Fletcher en 1960 y Bollen en 1961 (citados por Rodríguez-Kabana et al., 1966), revelaron que casi todos los herbicidas desarrollados antes de 1961, han tenido poco efecto sobre microorganismos del suelo.

Rodríguez-Kabana et al. (1966) determinaron el efecto de atrazina, diuron, EPTC y paraquat, representantes de diferentes grupos químicos de herbicidas, sobre el crecimiento de *R. solani* en cultivo líquido. En los tratamientos de atrazina y paraquat, el hongo presentó un retraso de 8 a 10 días, el cual atribuyeron los autores a un período de adaptación del hongo, seguido de crecimiento acelerado; este retraso no se observó en el testigo.

Se ha encontrado que la densidad de *Fusarium* spp. en suelos tratados con el herbicida atrazina fue menor que en suelos tratados con simazina, pero la atrazina estimulaba el crecimiento de *Trichoderma* sp, conocido hongo antagonista de *Fusarium*. Por su parte, herbicidas fenilúreas redujeron las poblaciones de *Fusarium* spp. en suelos cultivados con soya, pero no en suelos cultivados con maíz (Rodríguez-Kabana et al. 1966).

Lévesque et al. (1987) estudiaron el efecto del glifosato sobre varias malezas colonizadas por *Fusarium* spp. y observaron que el uso de este herbicida para el control de malezas incrementaba la densidad de propágulos de *Fusarium* en el suelo. Los autores se basaron en las siguientes razones que les permitieron llegar a dicha conclusión. (1) *In vitro*, glifosato inhibía el crecimiento de muchos patógenos incluyendo *Fusarium*; (2) Cuando se incorporó glifosato en los diferentes tipos de suelos, no tuvo efecto significativo sobre el número total de micro-

organismos, emisión de CO₂ o N; (3). La movilidad de glifosato es muy limitada en el suelo, y además, una fracción muy pequeña del producto aplicado es exudado por las raíces de las malezas tratadas. Cuando se aplica glifosato a la dosis estándar bajo condiciones de campo, es difícil que inhiba más a los antagonistas o competidores de *Fusarium* que al mismo *Fusarium*; (4) El incremento de *Fusarium* se observó en sitios con condiciones diferentes; (5) Después de la aplicación de glifosato se incrementó la proporción de plantas colonizadas por *Fusarium* en la mayoría de las malezas estudiadas. Como todas las plantas murieron, las especies de *Fusarium* probablemente explotaron su ventaja como colonizadoras pioneras para construir su propia densidad de inóculo.

Lévesque y Rahe (1992) observaron que la colonización de las raíces de plántulas de frijol y trigo por *Pythium* spp. tuvo un incremento 24 horas después de la aplicación de glifosato. Por su parte, Johal y Rahe (1984), demostraron claramente que la muerte de plantas de frijol tratadas con glifosato se debió a la colonización de raíces, principalmente por *Pythium* spp. y *Fusarium* spp. Lévesque y Rahe (1992), aceptaron que el daño inducido a la planta por el herbicida, puede predisponerla a la infección por patógenos facultativos.

En un ensayo realizado bajo condiciones de laboratorio, se evaluaron los herbicidas glifosato, paraquat, met-sulfuron-metil, picloran, 2-4 D sal-amina, oxidazon y butaclor, solos y en mezcla, con el fin de conocer el efecto de estos productos sobre la viabilidad de los esclerocios de *R. solani*; se encontró que todos los productos estimulaban la germinación de los esclerocios, excepto la mezcla paraquat + butaclor (Guzmán y Nieto, 1992).

Black et al. (1996), evaluaron el efecto de acifluorfen, alaclor, glufosinato, glifosato, paraquat y pendimetalina, en el crecimiento micelial y la producción de esclerocios en medio de cultivo de *R. solani* AG-1 IA y IB, obtenidos de soya. Todos estos herbicidas redujeron el tamaño de la colonia de *R. solani*. Las reducciones de crecimiento para AG-IB fueron más grandes que para AG-IA, en presencia de pendimetalina, alaclor y acifluorfen, pero glufosinato redujo el crecimiento de AG-1A más que el de AG-1B. Glifosato redujo el tamaño de la colonia en los aislamientos AG-1A y AG-1B en un 11 y 23 % respectivamente. La producción de esclerocios en los dos grupos de anastomosis se suprimió con paraquat, se redujo notoriamente con glufosinato y fue menos afectado con los demás herbicidas evaluados.

El presente trabajo tuvo como objetivos, determinar bajo condiciones de laboratorio: (1) El efecto del glifosato en el crecimiento de *R. solani* y de *Trichoderma* sp., conocido antagonista de *R. solani*; (2) Establecer la concentración del herbicida a la cual se inicia reducción en el crecimiento de *R. solani* (dosis umbral), y la concentración que causa la máxima inhibición en el crecimiento del hongo (dosis de estabilización); (3) Determinar la persistencia de efectos detrimentales causados por glifosato en subcultivos sucesivos de *R. solani* provenien-

tes de cultivos tratados con el herbicida, en términos de crecimiento y patogenicidad del hongo; y (4) Evaluar el efecto del herbicida sobre la capacidad antagonista de *Trichoderma*.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en los laboratorios de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional, sede Bogotá entre 1997 y 1999.

Obtención de aislamientos de *Rhizoctonia*.

Se colectaron de plantas de arroz de la variedad Oryzica 1 de 110 días de edad afectadas por el añublo de la vaina, en un lote comercial localizado en la vereda "El Cairo", municipio de Purificación, Tolima, Colombia. En este cultivo se había aplicado glifosato a la dosis comercial para el control de malezas.

Para aislar *Rhizoctonia* se cortaron trozos de 4 cm de hojas afectadas de plantas de arroz, y se colocaron adheridos con cinta transparente, en la tapa de cajas de petri con medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar), las cuales se incubaron a 27°C. El micelio desarrollado se purificó en el mismo medio.

Determinación del número de núcleos.

Los aislamientos de *Rhizoctonia* se cultivaron en cajas de petri con una capa delgada (aproximadamente 7 mL por caja) de agar-agua al 2%. A los dos días de crecimiento y con la ayuda de un sacabocado, se cortaron discos de 1 cm de diámetro de las márgenes de las colonias, los cuales se fijaron, durante 10 minutos, en una mezcla 3:1 de etanol del 95%:ácido acético glacial, seguido de las siguientes transferencias: Etanol del 95% (15 minutos), Acetona (20 minutos), y 15 minutos en cada solución de Etanol del 95%, Etanol del 70%, Etanol del 50%, Etanol del 25% y Agua destilada. Luego se hidrolizaron los discos sumergidos en una solución de HCl 1N por 8 minutos en incubadora a 60°C. Después de la hidrólisis, los discos se lavaron con agua destilada mediante tres cambios de 5 minutos cada uno. Posteriormente se colocaron, durante 5 minutos, en una mezcla 1:1 de buffer fosfato pH 6,8: agua destilada, y luego otros por 10 minutos en el mismo buffer. Este buffer se preparó como una mezcla 1:1 de NaHPO₄ (2,8 g/1000 mL de agua destilada):KH₂PO₄ (2,4 g/1000 mL de agua destilada).

Para la tinción del micelio, los discos se sumergieron durante 2 horas en una solución colorante de Giemsa (15 mL de buffer fosfato con 1 mL de solución stock colorante). La solución stock de tinción se preparó mezclando 3,8 g de Giemsa en polvo, con 250 mL de glicerina pura y 250 mL de alcohol metílico absoluto. Después de la tinción, los discos se colocaron en agua destilada, de 2 a 5 minutos, para finalmente dejarlos en el buffer fosfato durante 1 a 3 horas, tiempo determinado por chequeos

periódicos de diferenciación de núcleos en el microscopio, con un aumento de 100X. Este proceso de tinción, es el indicado por Herr (1979) y el Commonwealth Mycological Institute (CMI, 1968).

Obtención de aislamientos de *Trichoderma*.

El procedimiento para aislar *Trichoderma*, hongos antagonistas de *R. solani*, consistió en preparar diluciones seriadas de suelo procedente del lote comercial donde se tomaron las muestras de material vegetal (1 g de suelo en 10 mL de agua hasta obtener una dilución 10⁻⁴), y se colocaron 9 gotas de cada dilución por caja de petri en agar acuoso (agar 2%: extracto de malta 2%: estreptomina 1 g/L (Rifai, 1969), con 3 repeticiones por dilución. De los aislamientos obtenidos, se seleccionaron cuatro con las características de *Trichoderma* sp. los cuales se llamaron arbitrariamente A1, A2, A3 y A4.

Efecto del glifosato sobre el crecimiento de *R. solani*, en medio líquido y sólido.

Se efectuaron varias pruebas con el fin de evaluar el efecto de concentraciones variables de glifosato, desde muy altas a muy bajas, sobre el crecimiento de *R. solani*.

Determinación del efecto del herbicida a concentraciones entre 1 y 100.000 mg/L en medio líquido y sólido. Se evaluó el efecto de siete concentraciones de glifosato (Glifosol SL®, 480 g i.a. /L): 0, 1, 10, 100, 1.000, 10.000 y 100.000 mg/L, sobre el crecimiento de *R. solani* en medio líquido. El glifosato se diluyó en medio líquido esterilizado de peptona: dextrosa: fosfato ácido de potasio: sulfato de magnesio pentahidratado (10:15:0,50:0,25 g/L), utilizando frascos erlenmeyers de 500 cc con 200 mL de medio líquido y 3 repeticiones por tratamiento, en un diseño completamente al azar.

En cada frasco con 200 mL de la mezcla de glifosato en medio líquido, se depositó un disco de cultivo de *R. solani* de 1 cm de diámetro de cinco días de crecimiento en PDA, y los frascos se dejaron en agitación durante cinco días, a 28°C y 60 RPM en un agitador de ambiente controlado marca Lab-Line. Después de cinco días, se recuperó el crecimiento micelial filtrando el contenido de cada frasco, a través de papel filtro Whatman No. 1 colocado sobre un filtro microporo Wheaton No. 40/35, mediante la acción de una bomba de vacío marca Buchi modelo B-169. Se realizaron dos lavados con agua destilada con el fin de extraer residuos de medio. El micelio se pesó cuando se interrumpió la caída de líquido a través del papel filtro.

Con el objeto de conocer el efecto del glifosato sobre el tiempo que se requiere para que *R. solani* forme esclerocios en medio líquido, se realizaron observaciones bajo concentraciones entre 0 y 100.000 mg/L del herbicida. Los frascos se dejaron en observación hasta la aparición de esclerocios.

También se realizó una prueba de dosis de respuesta de

R. solani a las mismas concentraciones de glifosato antes indicadas, pero en medio sólido PDA en cajas de petri. Se colocó en el centro de cada caja de petri un disco de medio más micelio de 1 cm de diámetro, obtenido de un cultivo de 5 días del hongo en medio sólido. Se tomó la medida del diámetro de la colonia a las 24, 48 y 72 horas.

Determinación del efecto del herbicida a concentraciones entre 100 y 1.000 mg/L en medio líquido. Con el fin de determinar la concentración más alta del herbicida sin que cause efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo, se evaluaron seis concentraciones de glifosato: 0, 100, 300, 600, 900 y 1.000 mg/L, en erlenmeyers con 200 mL de medio líquido. Se colocaron discos de cultivo de *R. solani* de 1 cm de diámetro, obtenidos de colonias de cinco días de crecimiento en PDA, y se dejaron en agitación durante cinco días a 28 C y 60 RPM, en el mismo agitador mencionado anteriormente. Después de la extracción del líquido con la ayuda de la bomba de vacío, se pesó el micelio.

Determinación del efecto del herbicida a concentraciones entre 100 y 10.000 mg/L en medio líquido. Esta prueba tenía como objetivo determinar la dosis más baja del herbicida que causa la mayor inhibición del crecimiento del hongo. Se prepararon soluciones de glifosato a concentraciones de 0, 1.000, 2.500, 5.000, 7.500 y 10.000 mg/L, en frascos erlenmeyers, con 200 ml de medio líquido. Los frascos se dejaron en agitación durante cinco días, y se pesó el micelio siguiendo el procedimiento antes descrito.

Determinación del efecto del herbicida a concentraciones entre 0,0001 y 1,0 mg/L en medio líquido. En teoría, en una aplicación comercial de glifosato de 1,5 Kg ia/ha y asperjando directamente al suelo sin vegetación, el glifosato en el suelo estaría a una concentración de 0,75 mg/Kg de suelo en la capa arable (20 cm superiores) de una hectárea de terreno, suponiendo que la capa arable de una hectárea de suelo pese 2.000.000 de Kg. Para examinar el posible efecto deletéreo o estimulante de glifosato sobre el crecimiento de *R. solani* a concentraciones inferiores a 1 mg/L, que podrían ocurrir en el suelo bajo aplicaciones comerciales del herbicida, se evaluaron concentraciones del compuesto de 0, 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} y 1 mg/L, en frascos erlenmeyers con medio líquido. Al igual que en las pruebas anteriores, se pesó el micelio a los cinco días.

En todos los ensayos se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones. La variable de respuesta fue el peso del micelio del hongo. Se efectuó análisis de varianza por separado para cada experimento.

Una vez se constató que las varianzas de los experimentos con *R. solani* en medio líquido eran homogéneas, se combinaron los datos de estos experimentos. Posteriormente, se ajustó un modelo exponencial para el crecimiento en peso, respecto al logaritmo de la dosis de glifosato.

Evaluación de la persistencia del efecto de glifosato sobre *R. solani*. Para examinar la persistencia del efecto del glifosato en el micelio, se colocaron en cajas de petri con PDA, trozos del micelio recuperado del medio líquido proveniente de los tratamientos con glifosato a concentraciones de 1, 10 y 100 mg/L. Se midió el diámetro de la colonia a las 24, 48, 72 y 96 horas. Del micelio obtenido en estas cajas con PDA, el cual se denominó arbitrariamente Ciclo 1, se tomaron discos de 1 cm de diámetro, se colocaron en cajas de petri con PDA y se registró nuevamente el diámetro de la colonia a las 24, 48, 72 y 96 horas, fase que se denominó Ciclo 2. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza para cada subcultivo por separado, denominados Ciclo 1 y Ciclo 2. Se consideraron como factores, la dosis de glifosato y el tiempo de evaluación.

Efecto del glifosato sobre el crecimiento de *Trichoderma* sp.

Se preparó medio de cultivo agar-malta con glifosato en concentraciones de 0, 1, 10, 100, 1.000, 10.000 y 100.000 mg/L, y se sirvió en cajas de Petri. En el centro de la caja se colocó un disco de 1 cm de diámetro de cada uno de los cuatro aislamientos de *Trichoderma* sp. de 10 días de crecimiento en medio agar-malta; se tuvieron 4 repeticiones por tratamiento. Se tomaron medidas del diámetro de la colonia a las 24, 48 y 72 horas, y los datos se sometieron a análisis de regresión. Treinta días después de someter los aislamientos de *Trichoderma* al herbicida, se efectuó una segunda lectura del diámetro de la colonia y se observó la esporulación.

Efecto del glifosato sobre la capacidad antagonista de *Trichoderma*.

Para examinar el comportamiento del antagonismo de *Trichoderma* sobre *R. solani* bajo el efecto de diferentes concentraciones de glifosato, se emplearon las técnicas de aislamientos enfrentados y del papel celofán.

Prueba de aislamientos enfrentados. Se tomaron discos de 1 cm de diámetro de aislamientos de *R. solani* con cinco días de crecimiento en PDA, y se colocaron en cajas de petri con medio PDA con el herbicida, a una distancia de 4,5 cm de un disco de 1 cm de diámetro obtenido de cultivos de cada uno de los cuatro aislamientos de *Trichoderma*, A1, A2, A3 y A4. Las concentraciones de glifosato fueron de 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10, 1 y 0 mg/L, con cuatro repeticiones por tratamiento. Se midió el diámetro de las colonias de *R. solani* y *Trichoderma*, a las 24, 48 y 72 horas. Los datos de esta prueba se sometieron a análisis de varianza y regresión.

Con base en los resultados del aislamiento A3 de *Trichoderma*, se calculó un índice de crecimiento relativo, dividiendo el valor del diámetro de la colonia de *R. solani* entre el valor del diámetro de la colonia de *Trichoderma* sp.

Prueba con papel celofán. En cajas de petri con medio

PDA y glifosato, se colocó un disco de papel celofán de 9 cm de diámetro, previamente humedecido con agua destilada estéril. Un día después, al lograr completa adhesión del papel con el medio y evaporación del agua del papel celofán, se colocó un disco de 1 cm de diámetro de cada uno de los cultivos de *Trichoderma* con 10 días de crecimiento en PDA. El papel celofán se retiró 10 días después, cuando se logró obtener abundante crecimiento de micelio y esporulación del hongo.

Enseguida, se colocó en el centro de la caja un disco de 1 cm de diámetro de un cultivo de cinco días de *R. solani* en PDA. Se consideraron concentraciones del herbicida de 1.000, 100, 10, 1 y 0 mg/L, con 4 repeticiones por tratamiento; concentraciones de 100.000 y 10.000 mg/L no se incluyeron en este caso, pues en la experiencia anterior se observó inhibición completa del crecimiento de ambos hongos a estas concentraciones de glifosato. Se tomaron medidas del diámetro de las colonias a las 24, 48 y 72 horas.

RESULTADOS

Aislamiento de *Rhizoctonia*.

En el aislamiento obtenido se observó ramificación cercana al septo distal en las hifas vegetativas, constricción de la ramificación y doliporo presente en el septo, características que corresponden a la señalada para el género *Rhizoctonia*, según Parmeter *et al.* (1969), Sherwood (1969) y Ogoshi (1987).

Determinación del número de núcleos. La tinción de núcleos con Giemsa, permitió constatar la condición de multinucleado (6 a 8 núcleos), lo cual permite aseverar que corresponde a un aislamiento de *R. solani* (Herr,

1979).

Aislamiento de *Trichoderma*.

En todas las diluciones de suelo, se obtuvo el crecimiento de colonias con micelio compuesto de hifas hialinas, septado, muy ramificado, conidióforos altamente ramificados, con anillos concéntricos en las zonas de producción de conidias, identificadas por la clave de Rifai (1969) como *Trichoderma* sp. en casi en todos los sitios de la caja, donde se colocó la gota de suspensión.

Respuesta de *R. solani* a concentraciones variables de glifosato en medio líquido.

Los análisis de varianza detectaron diferencias significativas del peso del micelio de *R. solani* debidas a la dosis de glifosato, excepto en las dosis bajas entre 0 y 1 mg/L, en las cuales las diferencias no fueron significativas. Se ajustó una curva de respuesta considerando todas las pruebas que se realizaron con los diferentes rangos de dosis del herbicida (Figura 1). El intervalo de concentración de glifosato estuvo entre 100 y 2.500 mg/L, pues dosis mayores causaron inhibición total del crecimiento del hongo (Figura 1). Los pesos de 0,2 g en la prueba con rango de 0 a 100.000 mg/L y de 0,1 g en la prueba con rango de 0 a 10.000, correspondieron al peso del disco de medio con micelio, colocado inicialmente como inóculo (Cuadro 1). En el tratamiento de 1.000 mg/L del herbicida, el crecimiento se redujo entre el 84 y el 65 % respecto al testigo. En los tratamientos con dosis de 300 mg/L o inferiores el crecimiento del hongo no fue inhibido, si se compara con el testigo sin tratar. Se registró completa inhibición del crecimiento de las colonias del hongo cultivado en medio líquido, a partir de 2.500 mg/L del herbicida (Cuadro 1, Figura 1).

Cuadro 1. Respuesta de *R. solani* a dosis variables de glifosato creciendo en medio líquido, medida como el peso (g) del micelio a los 5 días.

Rango de concentración (mg/L)	Concentración de glifosato (mg/L)	Peso de micelio + medio PDA (g)	
0 - 100.000	0	1,83	
	1	1,70	
	10	1,70	
	100	1,76	
	1.000	0,30	
	10.000	0,20	
	100.000	0,20	
	0 - 10.000	0	1,23
		1.000	0,43
		2.500	0,10
5.000		0,10	
7.500		0,10	
10.000		0,10	
0 - 1.000	0	5,30	
	100	5,00	
	300	5,40	
	600	3,50	
	900	1,50	
	1.000	1,30	
	0 - 1,0	0	1,26
0,0001		1,13	
0,001		1,23	
0,01		1,40	
0,1		1,20	
1,0		1,16	

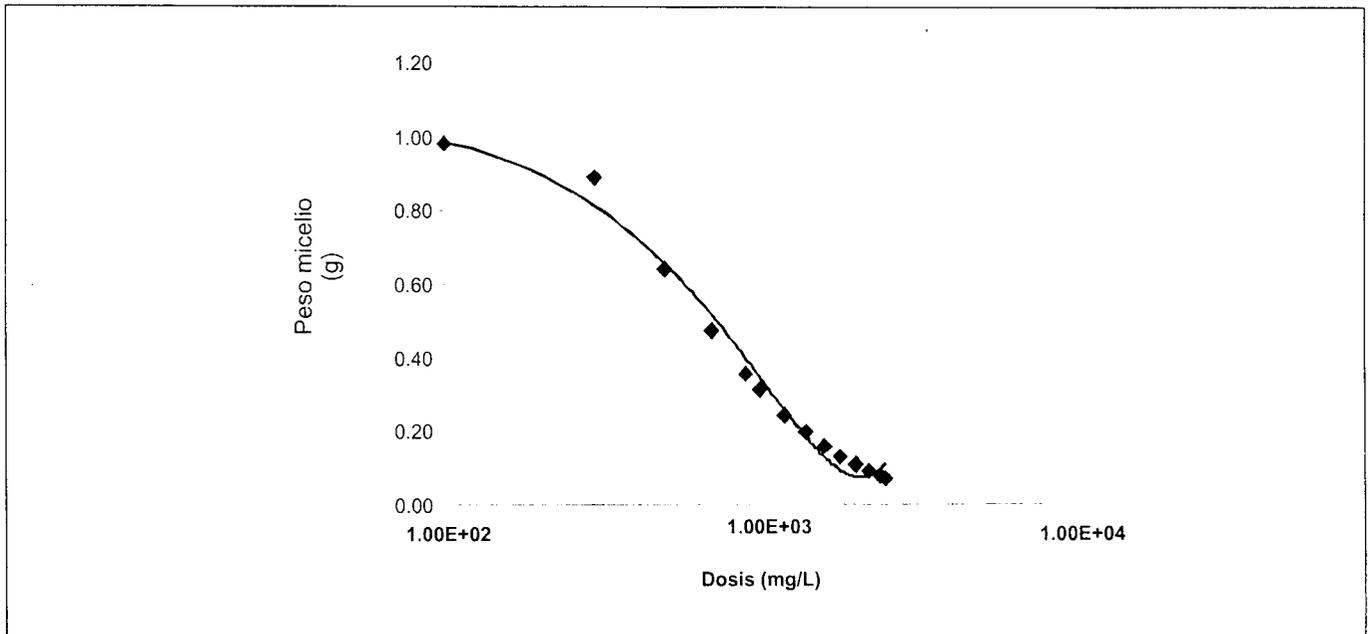


Figura 1. Respuesta de *R. solani* a concentraciones variables de glifosato, creciendo en medio líquido. La curva de respuesta de peso de micelio (y) respecto a dosis de glifosato (x), se ajustó al modelo: $Y = e^{-3,456270 + 3,385788 \ln x - 0,337275 (\ln x)^2}$; $R^2 = 0,96$.

Así, se puede decir que la dosis más baja del herbicida que causó máxima inhibición del crecimiento del hongo, estuvo alrededor de 2.500 mg/L del herbicida, y la concentración de cerca de 300 mg/L, sería la dosis más alta sin efecto sobre el crecimiento de *R. solani*. En cuanto al aspecto de la masa micelial, cinco días después del tratamiento y antes de la extracción, se observó un crecimiento más redondeado y de textura aparentemente más suave en los tratamientos de 1.000, 900 y 600 mg/L, comparados con 300, 100 y 0 mg/L, bajo los cuales no hubo efecto del herbicida sobre el crecimiento del hongo. En la prueba con concentraciones bajas, entre 0 y 1 mg/L, no hubo diferencias entre estos tratamientos en el crecimiento de las colonias (Cuadro 1), lo cual podría explicar el desarrollo de la enfermedad en presencia de concentraciones muy bajas del herbicida, que corresponden a las concentraciones del herbicida en el suelo esperadas después de una aplicación comercial.

Formación de esclerocios de *R. solani* en medio líquido.

Después de 36 días, se registró formación normal de esclerocios bajo tratamientos de glifosato en dosis de 0 a 100 mg/L. A partir de 1.000 mg/L no se formaron estas estructuras.

Respuesta de *R. solani* a concentraciones variables de glifosato en medio sólido.

Se realizó análisis de varianza considerando como factores la concentración del herbicida y el tiempo de exposición. El análisis de varianza indicó que el glifosato afecta el diámetro de las colonias del hongo. Para los tres

momentos de observaciones, el análisis de regresión fue significativo para las 24 y 48 horas. La curva de respuesta se ajustó a un modelo cuadrático semilogarítmico de tipo $y = a + b (\ln x)^2$ donde y es el crecimiento en diámetro de la colonia, y x es la concentración de glifosato, a un tiempo determinado de exposición al compuesto (Figura 2). El crecimiento de las colonias de *R. solani*, mostraron completa inhibición del crecimiento a concentraciones superiores a 10.000 mg/L (Figura 2), resultados similares a los obtenidos en medio líquido (Cuadro 1).

A las 24 y 48 horas, las colonias de *R. solani* a concentración de 100 y 1000 ppm de glifosato tenían un diámetro inferior a las del testigo sin tratar, pero a las 72 horas todos los tratamientos fueron similares (Figura 2).

Evaluación de la persistencia del efecto del glifosato sobre *R. solani*.

En los dos ciclos, el análisis de varianza indicó efecto significativo de la concentración del herbicida, del tiempo de evaluación y de la interacción de estos dos factores; se analiza la interacción (Figura 3). En los dos ciclos, el tamaño de las colonias del hongo que provenían de tratamientos con glifosato a 100 mg/L, fue reducido durante las primeras 72 horas, si se compara con los tratamientos entre 0 y 10 mg/L del herbicida.

Sin embargo, este efecto desapareció a las 96 horas de incubación, y el crecimiento de las colonias bajo cualquier dosis del herbicida fue igual al testigo sin tratar. Por otra parte, el diámetro de las colonias hasta las 48 horas después de la incubación, en el Ciclo 2 en todas las dosis fue entre 2 y 3 cm menor respecto al Ciclo 1 (Figura 3).

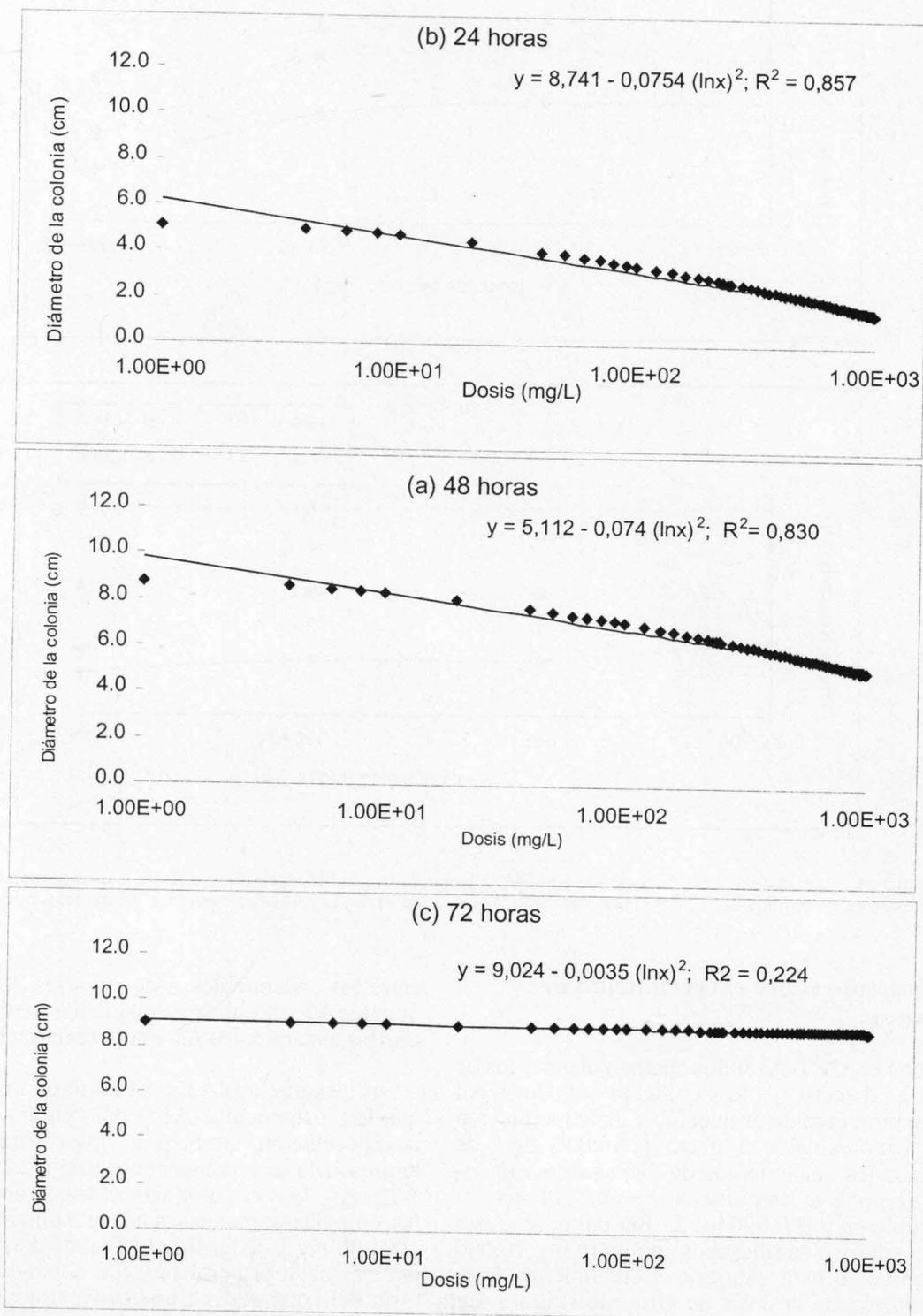


Figura 2. Respuesta de *R. solani* a concentraciones variables de glifosato, creciendo en medio sólido PDA, 24, 48 y 72 horas después del tratamiento; se expresa como diámetro de la colonia (cm) del hongo, que se ajustó a los modelos especificados en las gráficas. La respuesta a las 72 horas no fue significativa.

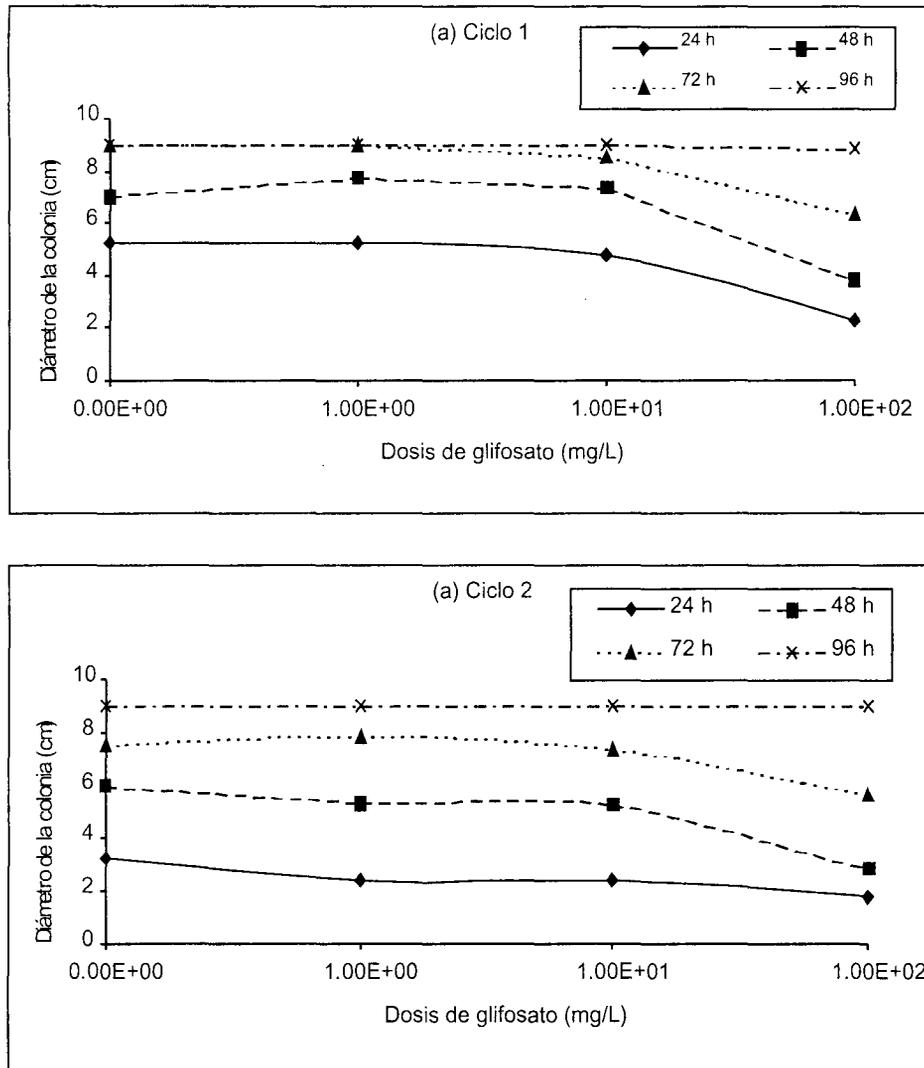


Figura 3. Diámetro de colonias de *R. solani* creciendo en PDA, a partir de micelio recuperado que había sido expuesto directamente a dosis variables de glifosato en medio líquido, en dos ciclos, (a) Ciclo 1 y (b) Ciclo 2). En la gráfica se especifica los modelos que se ajustaron en cada caso.

Efecto de glifosato sobre el crecimiento de *Trichoderma sp.*

De acuerdo con el ANOVA, en los cuatro aislamientos de *Trichoderma* se detectó efecto significativo de dosis del herbicida, del momento de evaluación y de la interacción de estos dos factores. Bajo el efecto de 10.000 mg/L de glifosato, todos los aislamientos de *Trichoderma* tuvieron solamente un leve crecimiento de sus colonias, y completa inhibición a 100.000 mg/L. Por tanto, se ajustó un modelo cuadrático semilogarítmico entre 0 y 10.000 mg/L del herbicida, para expresar el crecimiento de la colonia en función de la dosis de glifosato (Figura 4 y Cuadro 2). Los modelos propuestos se presentan en el Cuadro 2. Las colonias de *Trichoderma* sometidas a dosis inferiores a 100 mg/L tuvieron un crecimiento similar al testigo a las 24, 48 y 72 horas, pero a partir de 1.000 mg/L del herbicida se inicia inhibición del crecimiento en diámetro de las colonias del hongo. Hubo diferencias

entre los aislamientos; esto es, a las 72 horas los aislamientos A1 y A2 alcanzaron un diámetro de 9,0 cm mientras los aislamientos A3 y A4 crecieron hasta 6,5 cm.

Los aislamientos A3 y A4 tuvieron menor crecimiento que los aislamientos A1 y A2 (Figura 4). En cuanto a la esporulación, también se observaron diferencias por la presencia de círculos concéntricos en los aislamientos A3 y A4. Los círculos concéntricos no se formaron en las colonias sometidas a los tratamientos de 10.000 y 100.000 mg/L de glifosato. Treinta días después del tratamiento con el herbicida, fue notable el efecto inhibitorio del compuesto a una concentración tan alta como de 100.000 mg/L, sobre el diámetro de las colonias y la producción de esporas en los cuatro aislamientos; así, el diámetro de las colonias fue de 1,0 cm. Bajo concentraciones de 10.000 mg/L e inferiores, el diámetro de las colonias y la esporulación fue similar al testigo sin tratar (los datos presentados no muestran estas observaciones).

Cuadro 2. Modelos de crecimiento en diámetro de las colonias de cuatro aislamientos de *Trichoderma* bajo el efecto de glifosato, incubadas en PDA durante 24, 48 y 72 horas.

Aislamiento	Tiempo de Incubación (horas)	Modelo*	R ²
A1	24	$Y = 3,105 - 0,0251. (\ln x)^2$	0,805
	48	$Y = 7,782 - 0,0824. (\ln x)^2$	0,922
	72	$Y = 9,686 - 0,1019. (\ln x)^2$	0,938
A2	24	$Y = 2,939 - 0,0218. (\ln x)^2$	0,820
	48	$Y = 7,334 - 0,0701. (\ln x)^2$	0,905
	72	$Y = 9,640 - 0,0916. (\ln x)^2$	0,945
A3	24	$Y = 1,525 - 0,0063. (\ln x)^2$	0,546
	48	$Y = 4,629 - 0,0410. (\ln x)^2$	0,863
	72	$Y = 7,043 - 0,0664. (\ln x)^2$	0,911
A4	24	$Y = 1,430 - 0,0053. (\ln x)^2$	0,477
	48	$Y = 4,637 - 0,0412. (\ln x)^2$	0,873
	72	$Y = 6,900 - 0,0646. (\ln x)^2$	0,914

*Todos los parámetros fueron significativamente diferentes de cero según la prueba de t al 5%.

Efecto del glifosato sobre la acción antagonista de *Trichoderma* sp.

Prueba de antagonismo con aislamientos enfrentados. El crecimiento de *R. solani* se inhibió ante la presencia de los cuatro aislamientos de *Trichoderma* sp., y en algunos casos se observó el halo de inhibición. Con esta prueba de aislamientos enfrentados se logró establecer la capacidad antagonista de los cuatro aislamientos de *Trichoderma*, aún en presencia de glifosato.

La Figura 4 contiene los resultados que se obtuvieron con el Aislamiento A3 de *Trichoderma*. Se observó completa inhibición del crecimiento de los dos hongos, creciendo solos, en los tratamientos de 100.000 y 10.000 mg/L de glifosato. Bajo la concentración de 1.000 mg/L se registraron diámetros de las colonias de *Trichoderma* del orden de 4,3 cm, mientras que en *R. solani* solamente se alcanzaron diámetros de 2,2 cm. No hubo diferencias en el crecimiento de las colonias de los hongos bajo los tratamientos de 10 y 1 mg/L del herbicida, con relación al tratamiento sin glifosato. Para cada tiempo de evaluación, se ajustaron modelos del diámetro de la colonia de *R. solani* con y sin la presencia de *Trichoderma* (Figura 5). La misma tendencia en la respuesta del crecimiento de *R. solani* con relación a las diferentes concentraciones de glifosato se pudo apreciar a las 24, 48 y 72 horas cuando *R. solani* creció solo (Figura 5 a) como enfrentado a *Trichoderma* (Figura 5 b). Así, bajo el efecto del glifosato hasta una concentración de 10 mg/L, *Trichoderma* mostró la misma capacidad antagonista sobre *R. solani* que se registró en el tratamiento testigo, sin aplicación del herbicida.

Se calculó un índice de crecimiento relativo dividiendo la medida de crecimiento de *R. solani* entre la medida de crecimiento de *Trichoderma* en cajas de petri, creciendo

independientes (solos) y en la misma caja (enfrentados) (Cuadro 3).

Este índice permitió precisar mejor el grado de antagonismo de *Trichoderma*, y si esta capacidad antagonista era afectada por el herbicida. El ANAVA detectó efecto significativo de la dosis del herbicida y del método de siembra de los hongos (esto es, creciendo solos y enfrentados), así como la interacción de los dos factores también resultó significativa. El crecimiento de las colonias de *R. solani* y *Trichoderma* en cultivos separados, comienza a disminuir a partir de 100 mg/L de glifosato. Igualmente, a partir de esta dosis del herbicida (100 mg/L), el índice de crecimiento relativo de los aislamientos enfrentados, fue similar al calculado en los cultivos solos o de cajas separadas, debido al efecto inhibitorio del glifosato sobre el crecimiento de *R. solani* y *Trichoderma* sp. que impide observar cualquier efecto antagonista (Cuadro 3). La capacidad antagonista de *Trichoderma* no se afecta bajo dosis del herbicida inferiores a los 100 mg/L (Cuadro 4).

Prueba con papel celofán. Los aislamientos de *Trichoderma* sp. crecieron y esporularon normalmente sobre el papel celofán. Al realizar la siembra de *R. solani* en cajas en donde se había inoculado *Trichoderma*, se registró que *R. solani* no creció más allá de un diámetro de 1 cm, tamaño del disco con el cual se efectuó la siembra del micelio, bajo todos los tratamientos con el herbicida. *R. solani* creció normalmente en los cultivos solos, aún sometidos hasta 10 mg/L del herbicida, alcanzando un diámetro máximo de ca. 9 cm a las 72 horas. Sin embargo, en todos los tiempos de evaluación y dosis del herbicida no se registró crecimiento de *R. solani* en las colonias inoculadas con el antagonista; la inhibición del crecimiento fue total y similar a la obtenida en el testigo sin glifosato (Cuadro 3).

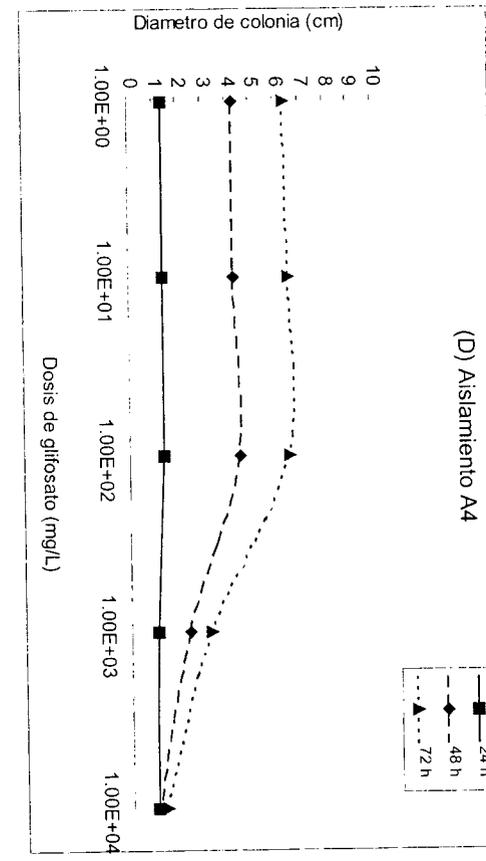
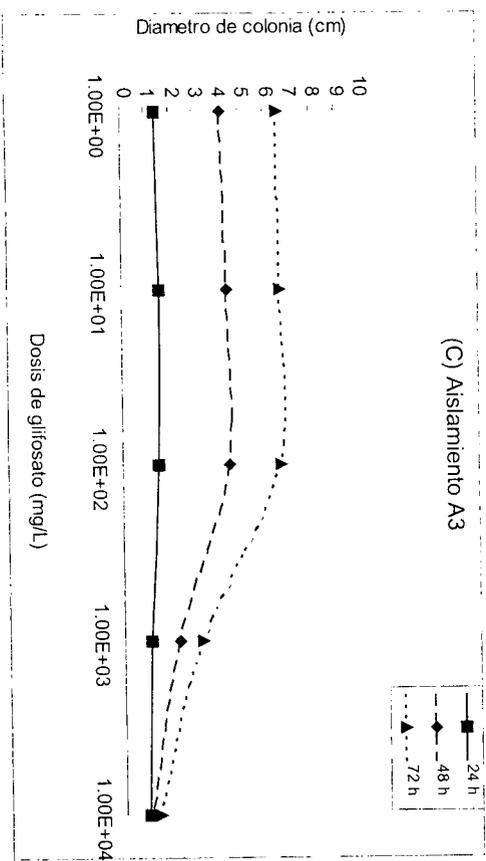
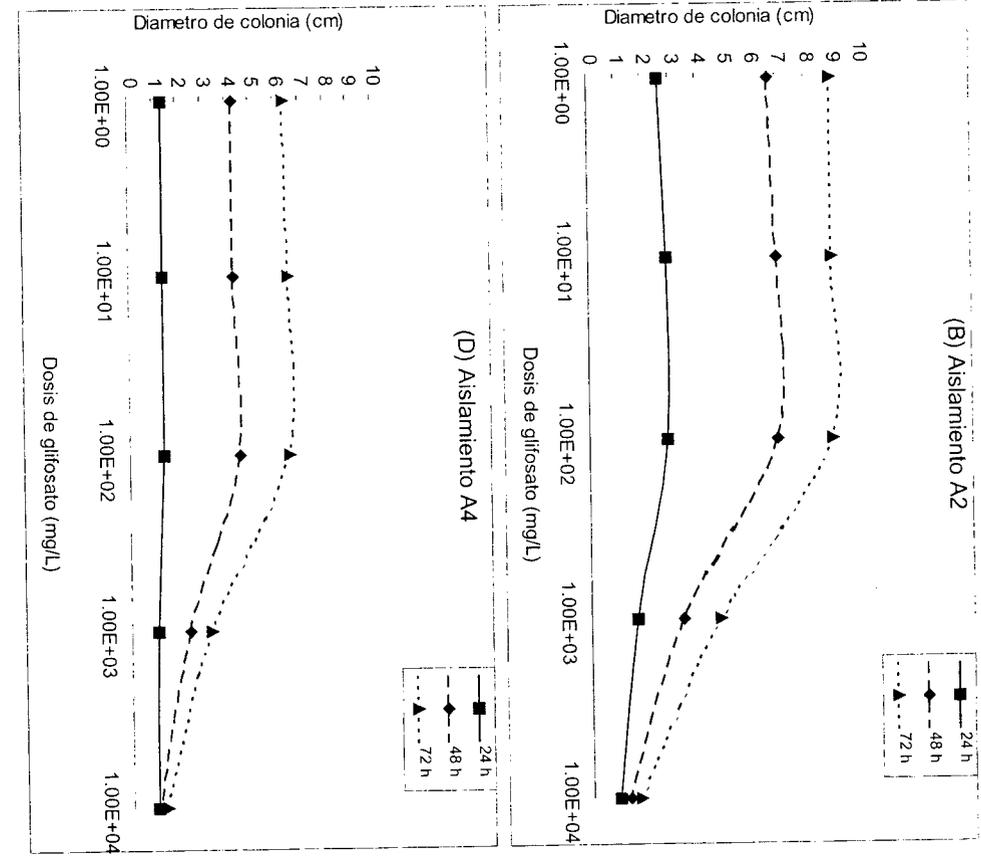
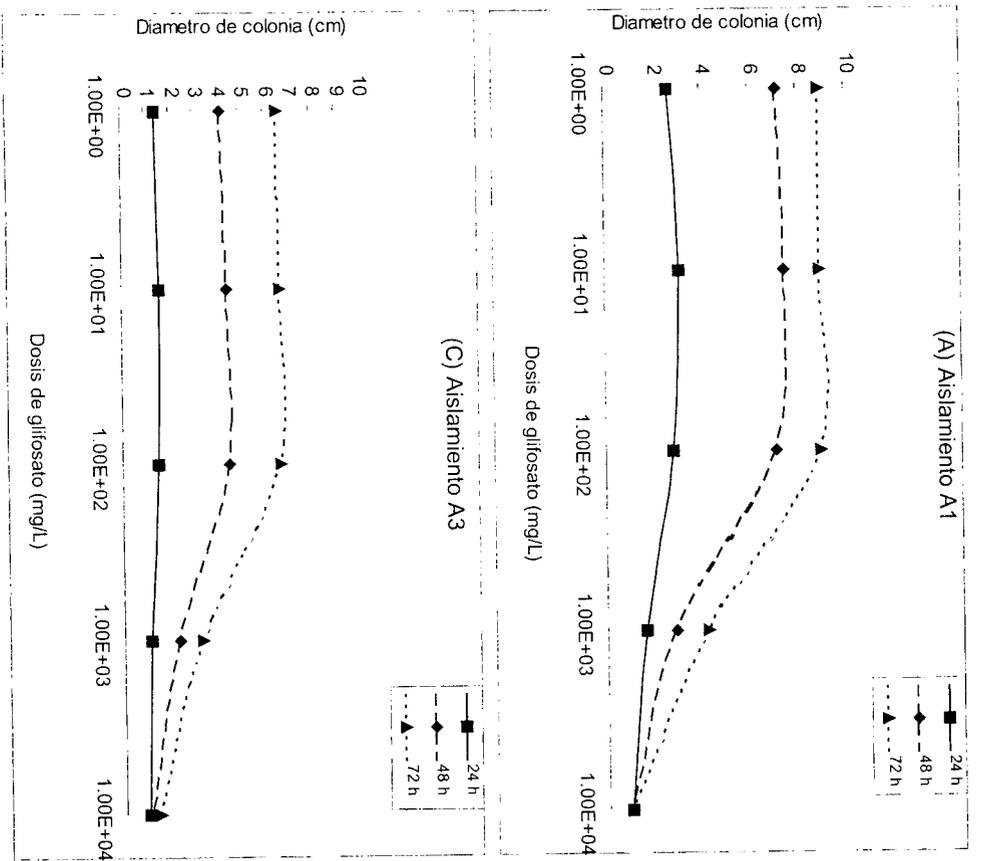
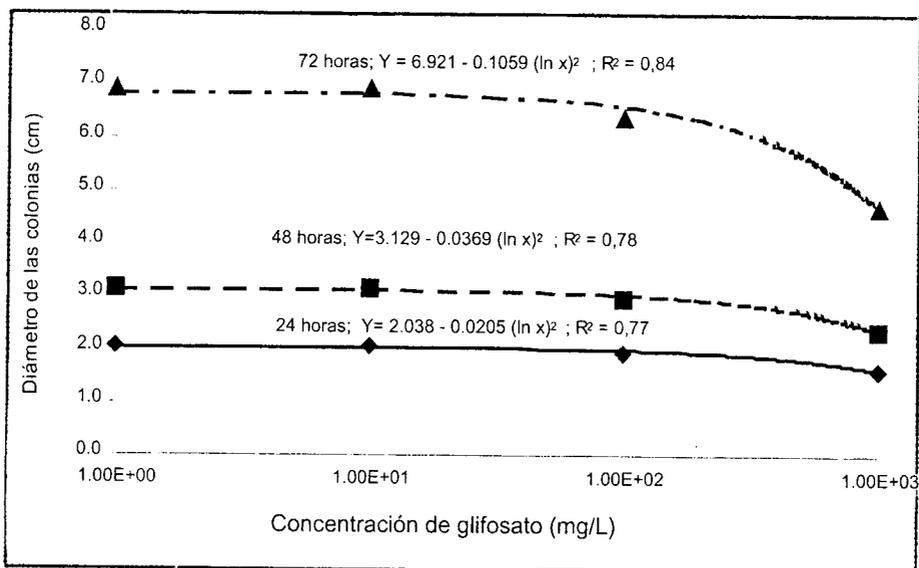


Figura 4 Diámetro de las colonias de cuatro aislamientos de *Trichoderma* sp. Después de 24, 48 y 72 horas bajo el efecto de concentraciones variables de glifosato, incubadas en PDA (N=4).

(a) *R. solani* creciendo solo



(b) *R. solani* creciendo con *Trichoderma*

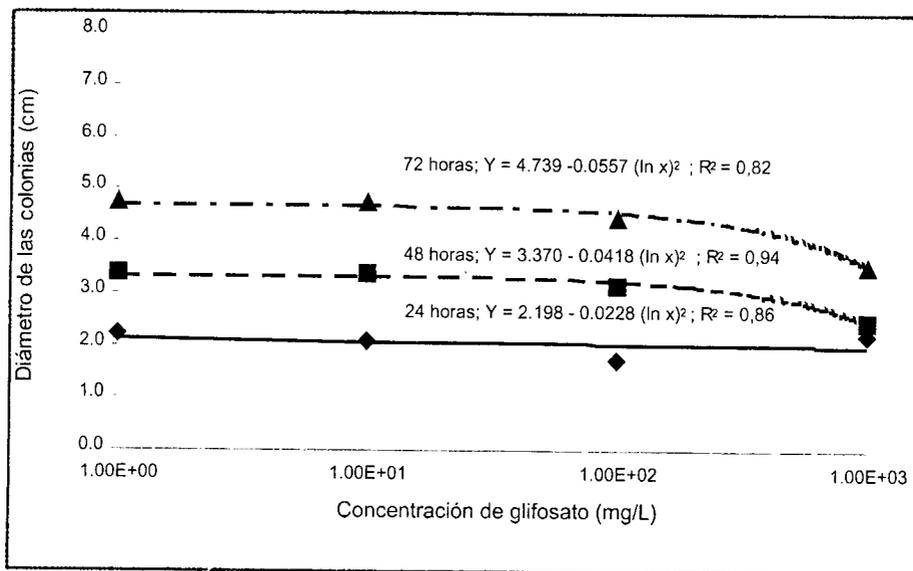


Figura 5. Capacidad antagonista de *Trichoderma*-Aislamiento A3 sobre *R. solani*, medida mediante el diámetro de las colonias de *R. solani* a las 24, 48 y 72 horas, y usando la técnica de aislamientos enfrentados creciendo en medio PDA. (a) *R. solani* creciendo solo, y (b) *R. solani* creciendo enfrentado con *Trichoderma*.

Cuadro 3. Índice de crecimiento relativo de *R. solani* y *Trichoderma* sp. solos y enfrentados, después de 72 horas bajo el efecto de concentraciones variables de glifosato, usando la técnica de los aislamientos enfrentados. (N=4).

Glifosato (mg/L)	<i>R. solani</i> / <i>Trichoderma</i> sp. Cultivos Separados	<i>R. solani</i> / <i>Trichoderma</i> sp. Cultivo Enfrentados
0	1,66	1,22
1	1,63	1,09
10	1,40	1,09
100	0,64	0,64
1.000	0,38	0,37
10.000	0	0
100.000	0	0

Cuadro 4. Diámetro de las colonias (cm) de *R. solani* (*R. s*) creciendo solo y en antagonismo con *Trichoderma* (*R.s /T*), en medio PDA y usando el método del papel celofán, bajo el efecto de concentraciones variables de glifosato y tres tiempos de exposición. (N=4).

Glifosato (mg/L)	24 horas		48 horas		72 horas	
	<i>R. solani</i>	<i>R.s /T</i>	<i>R. solani</i>	<i>R.s /T</i>	<i>R. solani</i>	<i>R.s /T</i>
0	1,85	1,00	4,80	1,00	8,90	1,00
1	1,70	1,00	4,30	1,00	8,90	1,00
10	1,70	1,00	4,60	1,00	8,80	1,00
100	1,40	1,00	3,50	1,00	7,50	1,00
1.000	1,40	1,00	2,30	1,00	3,40	1,00

DISCUSION

De acuerdo con los resultados de las pruebas en medio líquido, la dosis más alta de glifosato a la cual el herbicida no tuvo efecto sobre el crecimiento de *R. solani*, estuvo alrededor de 300 mg/L. A partir de 600 mg/L se observó apariencia diferente del micelio y textura suave, debido posiblemente a cambios en la disposición de las hifas; esto, considerando las dosis evaluadas. La concentración o dosis más baja del herbicida que causó máxima inhibición del crecimiento del hongo fue de 2.500 mg/L.

Esta respuesta coincide con los trabajos de Black et al (1.996), quienes registraron reducción del tamaño de la colonia de *R. solani* con seis herbicidas, entre ellos glifosato. Altman (1969) por su parte, encontró que 25 herbicidas de uso convencionales en agricultura estimularon el crecimiento de *R. solani in vitro*; así, Rhizoctonia creció mejor en medio suplementado con herbicidas en concentraciones de 1, 100 y 1.000 mg/L.; este efecto estimulante del crecimiento de *R. solani* no se registró en las diferentes pruebas realizadas en este trabajo. Por otra parte, en el presente trabajo concentraciones de 1.000 mg/L del herbicida o superiores, inhibieron la formación de esclerocios.

Similares resultados obtuvieron Black et al (1996), especialmente con paraquat y glufosinato de amonio, herbicidas que inhibieron drásticamente la producción de esclerocios en dosis de 0,28 y 0,84 kg/ha, respectivamente.

En estudios realizados por Guzmán y Nieto (1992) con esclerocios de *R. solani* en suelos arroceros de Colombia indican que ocurre estimulación de la germinación de los esclerocios por acción de los diferentes herbicidas ensayados, entre ellos el glifosato, con 51% de germinación de esclerocios, comparado con el 6% de germinación del testigo. En nuestro trabajo, no se consideró el efecto del herbicida sobre la germinación de los esclerocios; se sugiere entonces su evaluación en trabajos futuros, dada la alta cantidad de esclerocios que posiblemente se forman cuando terminan las cosechas de arroz.

Silva (1996) al evaluar la variabilidad patogénica en poblaciones de *R. solani* provenientes de cultivos de arroz de diferentes partes de Colombia, encontró que las 11 cepas estudiadas pertenecen al Grupo de anastomosis AG 1. Entre los interrogantes para futuros trabajos queda

la investigación del efecto del glifosato en aislamientos pertenecientes a otros grupos de anastomosis.

No se registró efecto inhibitorio en el crecimiento del antagonista *Trichoderma* hasta una concentración del herbicida de 100 mg/L.

Aún a una dosis del herbicida tan alta, de 10.000 mg/L, se detectó un leve crecimiento del *Trichoderma*, mientras que *R. solani* fue completamente inhibido a esa misma dosis, lo cual sugiere de una mayor tolerancia de *Trichoderma* al glifosato. Es importante resaltar que después de una aplicación comercial del herbicida en dosis de 1,5 Kg i.a., el glifosato quedaría a una concentración de 0,75 mg/Kg de suelo, considerando que la capa arable de 1 Ha de suelo pese 2 millones de Kg. Por tanto, la dosis de glifosato a la cual se inicia efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los dos hongos, es muy superior (más de 300 veces) a la concentración del herbicida después de un tratamiento comercial.

Al evaluar el crecimiento de *Trichoderma* sometido a diferentes dosis de glifosato después de un mes, bajo los tratamientos de 1.000 y 10.000 mg/L no hubo inhibición del crecimiento, tal como ocurrió durante las primeras 72 horas después del tratamiento.

El hongo logró crecer posiblemente debido a la pérdida de actividad del glifosato después de 30 días, en el medio de cultivo. Se ha estimado la vida media del glifosato en 40 días (Ahrens, 1994). Posiblemente la concentración de glifosato, debido a su degradación, no es suficiente para causar efectos inhibitorios en el crecimiento de *R. solani* después de 30 días, en el medio de cultivo. Los resultados de nuestro trabajo no indicaron estímulo del glifosato sobre el crecimiento ni de *R. solani* ni de *Trichoderma*. Sin embargo, otros autores han informado del efecto "estimulante" de los herbicidas sobre fitopatógenos del suelo.

Lévesque y Rahe (1992) detectaron la colonización por *Pythium* spp. de plántulas de trigo y frijol, después de la aplicación de glifosato. Lévesque et al (1987) también observaron aumento de *Fusarium* spp. en malezas infectadas después del tratamiento con glifosato. Asimismo, se ha encontrado que herbicidas fenilúreas estimularon hongos antagonistas de *Fusarium* sp., y a *Trichoderma* sp. cuando se incrementó la concentración de atrazina (Rodríguez-Kabana et al, 1966). La inhibición inicial

del crecimiento a dosis altas (>1000mg/L) observada en *Trichoderma* y el crecimiento normal posterior, puede explicarse también por el efecto inhibitorio o inicial del herbicida y la posterior "adaptación" del hongo a la presencia del herbicida, como lo observaron Rodríguez-Kabana *et al* (1966) con los herbicidas atrazina, diuron paraquat y EPTC, al registrar activo crecimiento del micelio de *R. solani* después de 22 días. Los microorganismos del suelo juegan un papel muy importante en la degradación de los herbicidas y en general de los pesticidas en el suelo; gran número de trabajos así lo referencian (Hance, 1988).

Es bien conocida la capacidad de *Trichoderma* de producir inhibidores volátiles, no volátiles y su interacción hifal. La técnica del papel celofán utilizada para medir el efecto antagonista de *Trichoderma* y descrita por Dennis & Webster (1971), muestra esa capacidad antagonista contra *Botrytis cinerea* y *Mucor mucedo*. Sobre *R. solani* también se ha observado esta inhibición del crecimiento, debido al paso de los metabolitos inhibidores no volátiles producidos por *Trichoderma* a través del papel celofán. *R. solani* y *Trichoderma* crecieron normalmente bajo concentraciones de glifosato de 10 mg/L o inferiores en cultivos separados; sin embargo, hubo completa inhibición del crecimiento de *R. solani* debido a *Trichoderma*, aún bajo el efecto del herbicida (10 mg/L o menos), y similar a la obtenida en el testigo sin glifosato.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA) por la financiación y al Biólogo Oscar Darío Bermudez por su colaboración en la parte experimental de este trabajo.

LITERATURA CITADA

AHRENS, W. H. 1994. Herbicide Handbook. Weed Science Society of America. 7ª Edición. Champaign, Illinois. 352 p.

BLACK, D., J. RUSSIN, J. GRIFFIN y J. SNOW. 1996. Herbicide effects on *Rhizoctonia solani* in vitro and *Rhizoctonia* Foliar Blight of soybean (*Glycine max*). Weed Science 44:711-716.

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE. 1968. Plant Pathologists Pocketbook. 2ª edición.

DENNIS, C. y J. WEBSTER. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I Production of no volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57:25-39.

GUZMÁN, P. y NIETO, L. 1992. Dinámica de la enfermedad añublo de la vaina causada por el hongo *Rhizoctonia solani* y la presencia de esclerocios en suelos arroceros. En: Foro Nacional de *Rhizoctonia en arroz*. Federación Nacional de Arroceros de Colombia. Bogotá, p.9.

HERR, L. 1979. Practical nuclear staining procedures for *Rhizoctonia* like fungi. Phytopathology 69: 958-961.

IWASAWA, H. 1992. El añublo de la vaina del arroz. En: Foro Nacional de *Rhizoctonia en arroz*. Federación Nacional de Arroceros de Colombia. Bogotá. p.14.

JOHAL, G.S. y J.E. RAHE. 1984. Effect of soil borne plant pathogenic fungi on the herbicidal action of glyphosate on bean seedlings. Phytopathology 74:950-955.

LÉVESQUE, C.A. y J.E. RAHE. 1987. Effects of glyphosate on *Fusarium* spp.: Its influence on root colonization of weeds, propagule density in the soil, and crop emergence. An J. Microbiology. 33:354-360.

LÉVESQUE, C.A. y J.E. RAHE. 1992. Herbicide interactions with fungal root pathogens, with special reference to glyphosate. Annual Review of Phytopathology 30:579-602.

OGOSHI, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Khun. Annual Review of Phytopathology 125: 143.

PARMETER, J.R., R.T. SHEERWOOD y W.D. PLANTI. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 59: 1270-1278.

RIFAI, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Commonwealth Mycological Institute. 116 p.

RODRIGUEZ-KABANA, R., E.A. CURL y H.H. FUNDERBURK, Jr. 1966. Effect of four herbicides on growth of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 56:1332-1333.

ROVIRA, A.D. y H.J. MCDONALD. 1986. Effects of the herbicide chlorsulfuron on *Rhizoctonia* bare patch and take-all of barley and wheat. Plant Disease 70:879-882.

SHEERWOOD, R.T. 1969. Morphology and physiology in four anastomosis groups of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 59: 1924-1929.

SILVA, M. R. 1996. Evaluación de la variabilidad fisiológica presente en la población de *Rhizoctonia solani* Kuhn agente causal del añublo de la vaina en arroz. 33 p.