

## CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Rhizoctonia* MEDIANTE LA TÉCNICA DE ISOENZIMAS. PANAMÁ.1998.

Kilmer Von Chong <sup>1</sup>; Carlos Herrera S. <sup>2</sup>; Rodolfo Morales <sup>3</sup>

### RESUMEN

El añublo de la vaina del arroz causa mermas estimadas entre 2.0 -45% en la producción, bajo condiciones de alta precipitación, alta nubosidad y altas temperaturas (Ou,1984). En Panamá no se ha identificado la especie de *Rhizoctonia* que predomina en las áreas arroceras. En la taxonomía de este hongo se están utilizando técnicas como los marcadores moleculares (análisis de isoenzimas) para distinguir entre aislamientos con morfologías similares y variabilidad entre especies (CIAT,1993). Este trabajo se realizó durante los meses de julio a octubre de 1998, en los Laboratorios del IDIAP en Divisa, con el propósito de identificar la especie de *Rhizoctonia* que afecta al cultivo del arroz en Panamá. Los aislamientos se colectaron en parcelas ubicadas en Alanje, Soná, Penonomé, Antón y Chepo y se compararon con aislamientos procedentes de Colombia, área del Tolima (Tolima CICA-4, Esparcidor 1, Esparcidor 2), identificados como pertenecientes a la especie *Rhizoctonia solani* (CIAT, Palmira, Colombia). Las proteínas extraídas de los cultivos puros, de los aislamientos nacionales y de referencia, se analizaron mediante la técnica de electroforesis discontinua en gel de almidón replicados cuatro veces. Se comparó la movilidad relativa (coeficiente RF) de las bandas de las isoenzimas monomórficas, alfa esterasa, fumarasa, hexoquinasa, leucina aminopeptidasa y mannososa -6-fosfatoisomerasa, de los aislamientos nacionales con los de referencia. El análisis de los coeficientes RF de los zimogramas indica que los aislamientos de Panamá pertenecen a la especie *Rhizoctonia solani* y las variantes detectados en la población de *Rhizoctonia* del país están presentes en la población de Colombia.

**PALABRAS CLAVES:** *Rhizoctonia* del arroz; añublo de la vaina; pudrición de la vaina; isoenzimas.

<sup>1</sup> Ph.D., Fitopatología. IDIAP Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC). e-mail: [idiap\\_div@cwpanama.net](mailto:idiap_div@cwpanama.net)

<sup>2</sup> Ing. Agr., Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCAP). e-mail: [idiap\\_div@cwpanama.net](mailto:idiap_div@cwpanama.net)

<sup>3</sup> M.Sc., Ing. en Industrias Agrícolas y Alimentarias. IDIAP Centro de Investigación Agropecuaria Central (CIAC). e-mail: [idiap\\_div@cwpanama.net](mailto:idiap_div@cwpanama.net)

## CHARACTERIZATION OF RHIZOCTONIA ISOLATES BY MEANS OF ISOENZYMES TECHNIQUE. PANAMÁ. 1998.

The sheath blight of rice causes yield losses estimated between 2.0-45% under climated conditions such as clouded days, high precipitation and high temperatures (Ou, 1984). In Panama the prevalent specie of *Rhizoctonia* has not been indentified. It has been used molecular markers (isoenzymes) to distinguish among isolates with similar morfology and genetic variability. This research was carried out from July to October of 1998, in the laboratories of IDIAP- Divisa with the objective of identify the species of *Rhizoctonia* that affects rice plants in Panama. The isolates were collected in rice plots of Alanje, Sona, Penonome, Anton and Chepo, and they were compared with isolates from Tolima, Colombia (Tolima CICA-4, Esparcidor 1, Esparcidor 2) identified as *Rhizoctonia solani*. The extracted proteins of pure culture of panamanian and colombian isolates were analyzed by starch gel electrophoresis, replicated four times. The relative mobility (coefficient RF) of each band of panamanian and colombian isolates were compared by the monomorphic isoenzymes: alfa esterasa, fumarase, hexoquinase, leucin aminopeptidase and mannose-6-phosphate isomerase. The relative mobility (RF coefficients) of the zimograms indicates that the panamanian isolates belong to the specie *Rhizoctonia solani* and the variants detected in the population are also present in the colombian population.

**PALABRAS CLAVES:** *Rhizoctonia* del arroz; añublo de la vaina; pudrición de la vaina; isoenzimas.

### INTRODUCCIÓN

En Panamá, el arroz es uno de los cultivos más importantes, no sólo por ser la base de la dieta del panameño (Aguilera, 1991), sino por su aporte del 25% al PIB agropecuario (Contraloría General de la República, 1991). La actividad arrocera en nuestro país generó alrededor de 4,000 empleos directos y 300,000 jornales por año, lo que representó 1.5 millones de balboas (IICA, 1994).

En el país, el arroz se cultiva mediante el sistema de secano (temporal) y de riego. En el período 1994-95 el MIDA

(Departamento de Cómputo, Santiago) y la Contraloría General de la República (Panamá en Cifras, 1996) informaron que el 94.4% de la superficie cultivada (61,969 ha) se hizo en secano y produjo el 88.9% de la producción (2,423,281 kg). En este mismo período se sembró, con riego, 5.6% de la superficie (6,980 ha) y se obtuvo una producción de 301,850.1 kg (11%).

El cultivo de secano es afectado por limitaciones climáticas que impiden la aplicación oportuna de las prácticas agronómicas, debido a la disponibilidad de lluvias y humedad en el suelo. Las sequías no sólo favorecen la competencia de las malezas, sino también predisponen el cultivo

al daño por plagas y enfermedades, que a su vez reducen los rendimientos (Von Chong, 1994).

No obstante, en los últimos años, uno de los problemas del cultivo que está causando mermas económicas significativas, es la enfermedad conocida como añublo de la vaina, cuyo agente causal es *Rhizoctonia* sp. Esta enfermedad causa pérdidas en los rendimientos entre 20-45% (Ou, 1984).

A diferencia de otros patógenos, el estudio e identificación de razas fisiológicas del organismo causal del añublo de la vaina es bastante difícil. Se han utilizado diferentes procedimientos para identificar especies y razas de este patógeno (CIAT, 1993). En la taxonomía de este hongo se están utilizando técnicas como los marcadores moleculares (análisis de isoenzimas), para distinguir entre aislamientos con morfologías similares y variabilidad entre las especies.

Market y Moller (1959) citado por Simpson y Withers (1986) fueron los primeros en emplear la palabra isoenzima, la cual es una enzima que tiene diferentes pesos moleculares y cataliza una misma reacción.

Las isoenzimas, como marcadores bioquímicos, son actualmente detectadas en forma rápida y económica, lo que las hace ideales para identificar variaciones entre y dentro de poblaciones (Hodgkin, 1991).

En Panamá no se ha identificado la especie de *Rhizoctonia* que predomina en las áreas arroceras; no obstante, existen evidencias de la presencia de *Rhizoctonia solani*. Una vez se identifique la especie de *Rhizoctonia* predominante, se hará más eficiente su control, tanto preventivo como curativo, lo cual redundará en una mayor rentabilidad, reducción de costos y mayor productividad para abastecer el mercado local.

Esta información servirá para establecer las bases para un mejor manejo agronómico del cultivo del arroz y, a la vez, permitirá clasificar al patógeno dentro de las diferentes categorías de patógenos cuarentenarios y evitar la entrada de variantes exóticas que afectarían la producción nacional. El objetivo de esta investigación fue el de identificar la especie de *Rhizoctonia* que afecta al cultivo del arroz en Panamá.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó durante los meses de julio a octubre de 1998, en los laboratorios del IDIAP, Divisa. Los aislamientos estudiados fueron colectados en las diferentes zonas arroceras de Panamá como se detallan en el Cuadro 1.

Cada muestreo se realizó recorriendo las parcelas en forma de zig-zag para obtener muestras de las estructuras de resistencia (esclerocios) del patógeno. Se analizaron seis aislamientos procedentes

### CUADRO 1. Zonas Arroceras Muestreadas.

Provincias	Distrito	Corregimiento	Nº de muestras
Chiriquí	Alanje	Guarumal	1
		Divalá	1
Veraguas	Soná	Guarumal	1
Coclé	Penonomé	Coclé	1
	Antón	Chirú	1
Panamá	Chepo	El Llano	1

de Veraguas, Chiriquí, Coclé y Panamá, que se compararon con aislamientos precedentes de Colombia, área del Tolima, denominadas Tolima Cica-4, Esparcidor 1 y Esparcidor 2. Estas muestras fueron suministradas por el Dr. F. Correa del CIAT, Palmira, Colombia.

Se trabajaron cuatro réplicas de aislamientos por zonas de producción en dos geles. En el laboratorio se obtuvieron cultivos puros, a partir de las muestras de esclerocios, colectadas en los tallos de las plantas en estadio de primordio floral; éstas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio, se sembraron en medio de papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron por cinco días, en oscuridad y a temperatura ambiente. Porciones de crecimiento micelial se colocaron en caldo de papa dextrosa y se incubaron sin agitación a temperatura ambiente durante siete días en la oscuridad.

#### **Preparación de la muestra y extracción de proteína**

La masa de micelio se colectó por filtración al vacío, a través de papel filtro (Whatman Nº1) y se molió en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.

El polvo de hongo congelado (1.5 ml) se mezcló con 500 ml de buffer de extracción a 4°C. Los extractos de proteína se almacenaron a -80°C hasta que se usaron en electroforesis. La manipulación de enzimas se hizo a 4°C. Se hicieron dos corridas electroforéticas para cada aislamiento.

Después de completar las corridas, los geles se sometieron a tinción con los protocolos selectivos para cada una de las cinco isoenzimas estudiadas.

En este trabajo se analizaron las isoenzimas monomórficas o menos polimórficas tales como: alfa esterasa ( $\alpha$  EST), fumarasa (FUM), hexokinasa (HK), leucina aminopeptidasa (LAP) y manosa-6-fosfato isomerasa (M6PI) mediante electroforesis discontinua a 4°C (S6E) usando las soluciones tampón, Tris-citrato/lithium-borato (pH 8.3) e histidine-citrato (pH 8.0) (Davis, 1964).

#### **Preparación del Gel de Almidón**

Los geles de almidón fueron hechos en concentración de 16% peso/volumen de almidón en buffer (1:9 lithium borato/tris-citrato) del gel. El gel se preparó usando una concentración de 16% peso/volu-

men. Esto es de 36.80 g de almidón disueltos en 230 ml del buffer del gel. Una vez enfriado el gel se cubrió con papel plástico ("plastic wrap") para evitar su deshidratación.

### **Electroforesis**

Se colocó el gel en la caja para buffer, se cubrió con "plastic wrap" y sobre éste se colocó una bandeja con hielo picado, se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se interrumpió la corriente eléctrica cuando el indicador alcanzó el final del gel.

Se usó un voltaje constante de 3.8 v/cm, es decir, 172 voltios y 23 miliamperios.

### **Cargado de geles**

La inoculación de extractos de proteína en geles horizontales se realizó utilizando piezas rectangulares de papel filtro Whatman N° 3, de 2-4 mm de ancho, embebidas con el extracto de proteínas. Antes de cargar, se verificó que los pozos para buffer de corrida estaban llenos y etiquetados.

### **Protocolos de Tinción**

La detección de las isoenzimas en los geles se realizó mediante el empleo de protocolos selectivos publicados por Brewer y col. (1970).

La hexokinasa (Murphy y col., modificada por Shaw y Prasad 1990); Leucina aminopeptidasa (Beckman y Johnson, 1964, citado por Brewer y col., 1970); Fumarasa (Brewer y Sing, 1970); Alfa Esterasa (Brewer y Sing, 1970); Mannosa-6-fosfato isomerasa (Brewer y col., 1967).

**Variable evaluada:** Para la estimación de los coeficientes RF se dividió la distancia recorrida de cada núcleo de banda desde el origen hasta su centro, entre la distancia recorrida por el indicador.

**Análisis de datos:** Se realizó una comparación de patrones de bandas (patrón RFS) entre las muestras y se consideraron similares las muestras con patrones iguales o que compartieran 80% de similitud.

## **RESULTADOS**

El análisis de cinco isoenzimas seleccionadas para caracterizar los aislamientos de *Rhizoctonia* colectados en las zonas arroceras de las provincias de Chiriquí, Veraguas, Coclé, Panamá y Colombia, permitió detectar la presencia de una sola banda (monómera) en los electroforegramas o zimogramas. Todas las isoenzimas analizadas mostraron bandas definidas y con posiciones relativas en los geles.

### **Alfa Esterasa ( $\alpha$ Est)**

En los geles para esta isoenzima se detectaron bandas monómeras, es decir,

una sola banda para cada aislamiento. El zimograma de esta isoenzima se registró en ambos geles con un coeficiente RF de 0.48 y 0.53 para los aislamientos de Chiriquí, Veraguas, Panamá y Tolima y Esparcidor 2 y coeficiente RF de 0.38 y 0.42 para los aislamientos de Coclé y Esparcidor 1 (Cuadro 2, Figura 1).

### ***Leucin Amino Peptidasa (LAP)***

Las bandas obtenidas en ambos geles para esta isoenzima fueron monómeras. Sin embargo, las bandas se detectaron ligeramente esparcidas para todos los aislamientos. El zimograma de los aislamientos de Chiriquí, Veraguas, Coclé y Tolima en ambos geles fue similar con un coeficiente RF = 0.18, para los aislamientos de Panamá y Esparcidor 1, con un coeficiente RF de 0.22 y para el aislamiento Esparcidor 2, el coeficiente RF 0.27 (Cuadro 2, Figura 2).

### ***Manosa-6-fosfatoisomerasa (M6P1)***

Las bandas detectadas en los geles para esta isoenzima fueron monómeras y ligeramente esparcidas en su recorrido para todos los aislamientos.

El zimograma de todos los aislamientos mostró un coeficiente RF de 0.28 y 0.30 en ambos geles (Cuadro 2, Figura 3).

### ***Hexokinasa (HK)***

El recorrido de esta isoenzima en los geles mostró la presencia de bandas monómeras ligeramente esparcidas. El zimograma presentó un coeficiente RF = 0.24 para todos los aislamientos (Cuadro 2, Figura 4).

### ***Fumarasa (FUM)***

En ambos geles se observaron bandas monómeras ligeramente esparcidas en su recorrido. El zimograma de todos los aislamientos mostró un coeficiente de RF 0.28 y 0.27 en ambos geles (Cuadro 2, Figura 5).

## **DISCUSIÓN**

El recorrido de las isoenzimas está determinado por la masa, forma y carga de las isoenzimas. La masa de una isoenzima es una función de la longitud del polipéptido, expresado por el número de residuos de aminoácidos; la forma la determina el tipo de aminoácido y la carga, el número de residuos y tipo de aminoácido (Morphy y col., 1990).

Los zimogramas y coeficientes RF obtenidos sugieren que la población de *Rhizoctonia* que afecta el cultivo del arroz en Panamá es heterogénea, pues se presentan variaciones en las cadenas polipeptídicas de las isoenzimas Leucin aminopeptidasa y alfa esterasa. Esto lo sustenta la similitud encontrada en los aislamientos de Chiriquí y Veraguas y el ais-

CUADRO 2. COEFICIENTES RF DE CADA ISOENZIMA EN GELES DE ALMIDÓN.

Aislamiento	Esterasa	LAP	M6PI	HK	FM
Chiriquí	0.48	0.18	0.28	0.24	0.28
Veraguas	0.48	0.18	0.28	0.24	0.28
Coclé	0.38	0.18	0.28	0.24	0.28
Panamá	0.48	0.22	0.28	0.24	0.28
Tolima	0.38	0.18	0.28	0.24	0.28
Esparcidor 1	0.48	0.22	0.28	0.24	0.28
Esparcidor 2	0.40	0.27	0.28	0.24	0.28

lamiento de referencia Esparcidor 2, en el recorrido de cuatro isoenzimas, excepto en Leucin aminopeptidasa; entre los aislamientos de Coclé y el aislamiento de referencia de Tolima, en cuatro isoenzimas, con excepción de la alfa esterasa y entre los aislamientos de Panamá y el de referencia Esparcidor 1 en cuatro isoenzimas con la excepción de Leucin aminopeptidasa.

También podemos establecer que las variaciones detectadas en el país también están presentes en la población de *Rhizoctonia* de Colombia, de donde proceden los aislamientos de referencia. Esta similitud quizás responda al continuo intercambio de germoplasma entre ambos países.

Las variaciones en la población de *Rhizoctonia* ha sido reportada por Bannizas y col. (1999), quienes empleando técnicas moleculares como RFLP re-

portaron que la mayoría de los aislamientos de *Rhizoctonia* obtenidos del suelo producen patrones de RFLP diferentes a los obtenidos en plantas de arroz. También reportaron gran diversidad en los caracteres morfológicos, siendo mayor en los aislamientos logrados a partir de plantas, que en los de suelo.

Finalmente, como los aislamientos de referencia taxonómicamente se habían reportado como *Rhizoctonia solani* podemos asegurar que los aislamientos de Panamá pertenecen a la especie *Rhizoctonia solani*.

## CONCLUSIONES

- ✕ Los zimogramas y coeficientes RF obtenidos establecen que los aislamientos de Chiriquí y Veraguas son iguales al aislamiento de referencia Esparcidor 2 para cuatro isoenzimas excepto para Leucin amino-peptidasa.

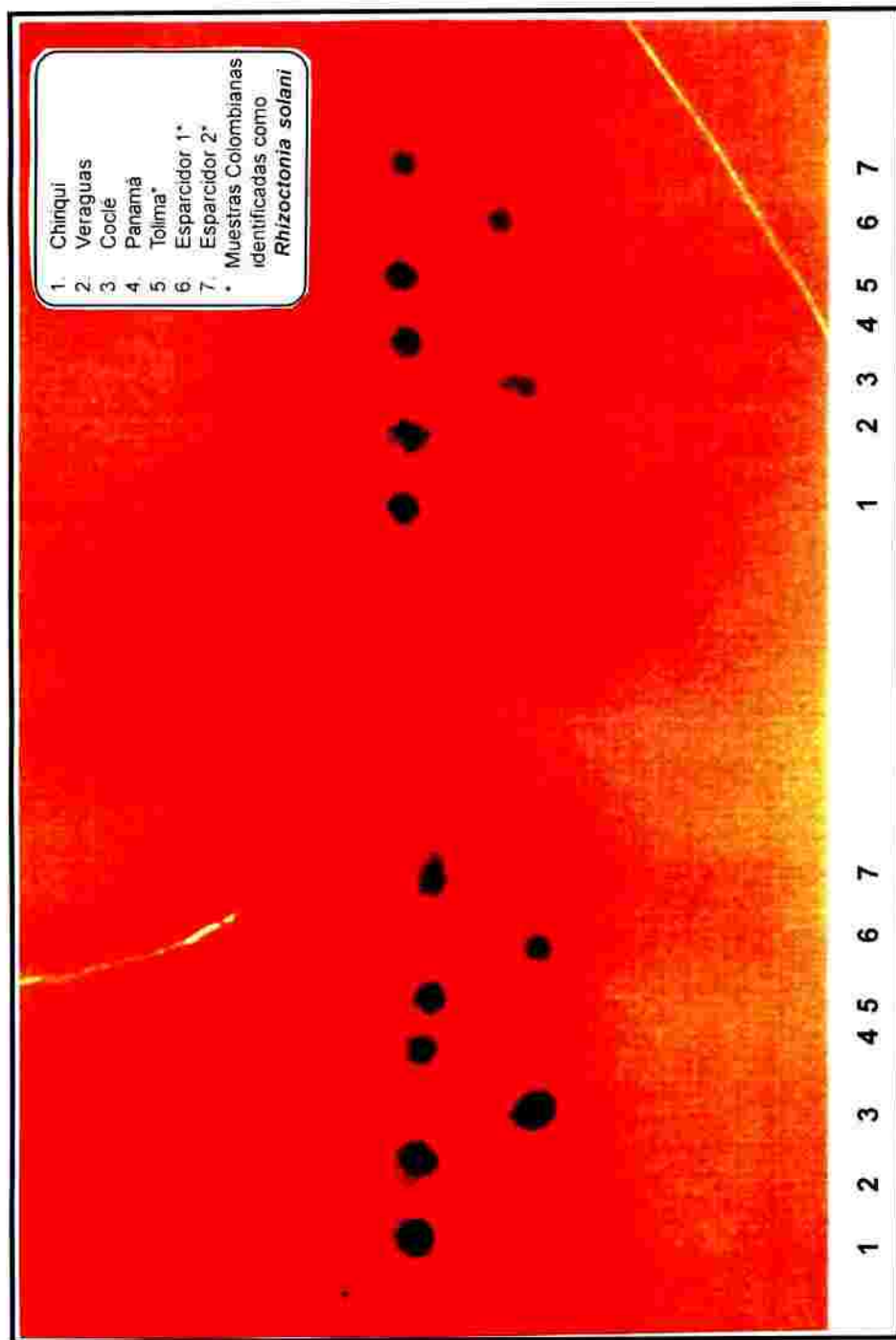


FIGURA 1. ZIMOGRAMA DE GEL DE ALMIDÓN PARA LA ISOENZIMA  $\alpha$  ESTERASA ( $\alpha$  est).



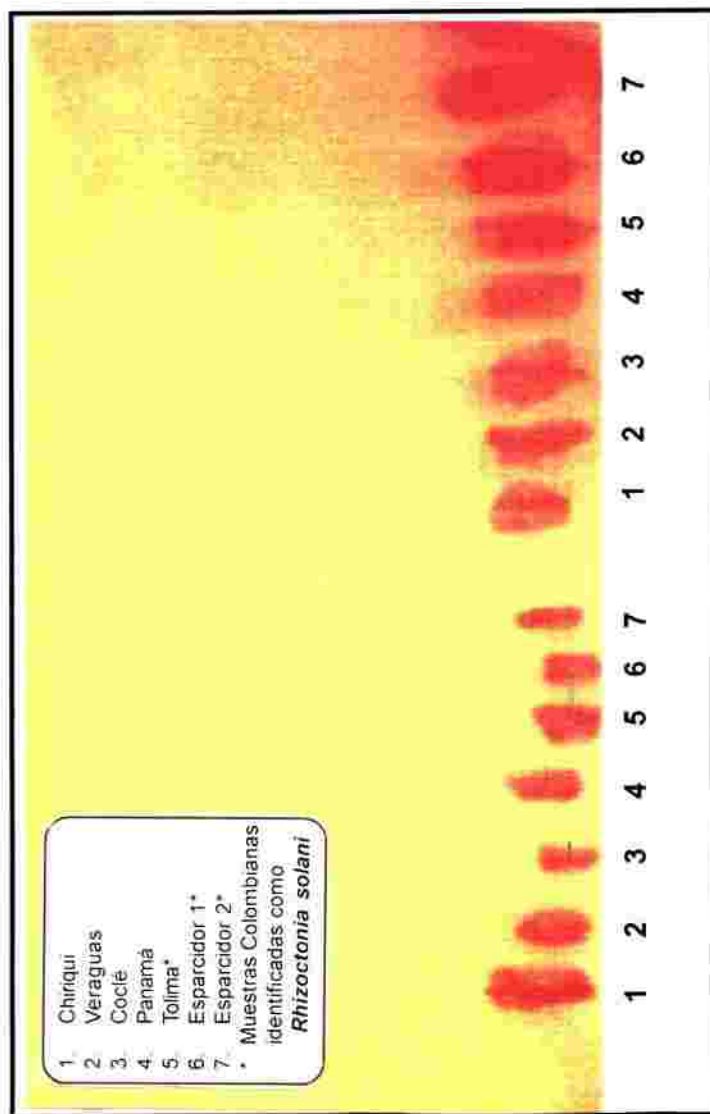


FIGURA 2. ZIMOGRAMA DE GEL DE ALMIDÓN PARA LA ISOENZIMA LEUCINAMINOPEPTIDASA (LAP).

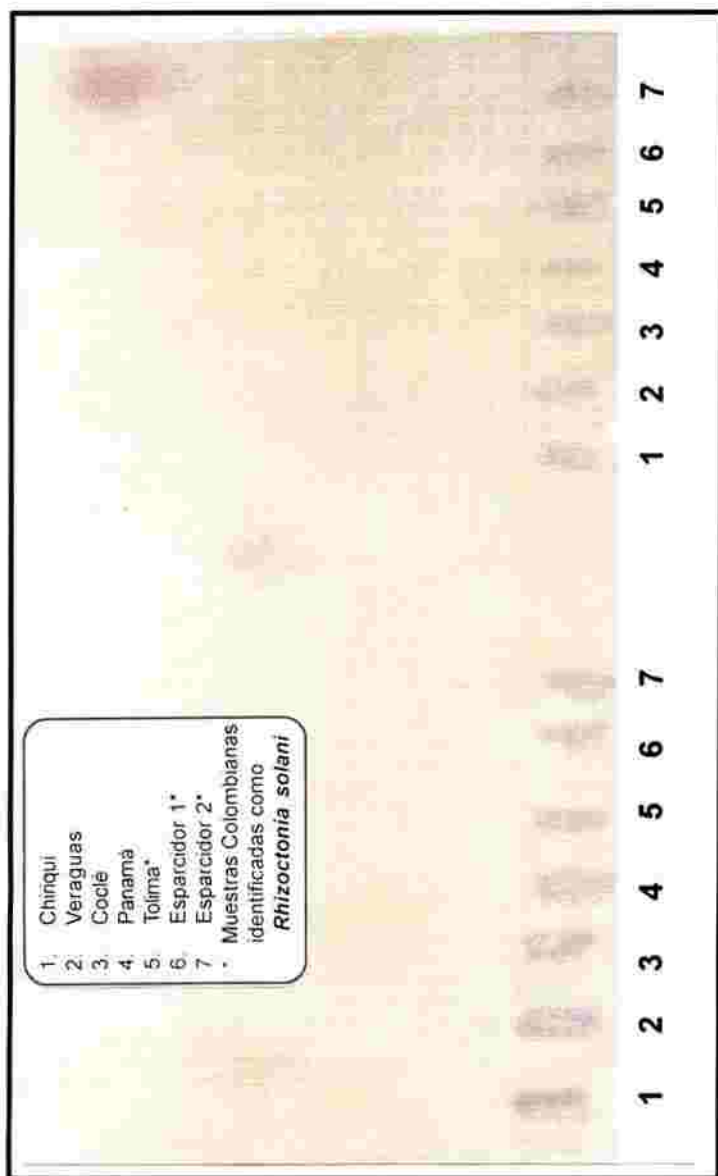


FIGURA 3. ZIMOGRAMA DE GEL DE ALMIDÓN PARA LA ISOENZIMA MANOSA-6-FOSFATO-ISOMERASA (M6PI).

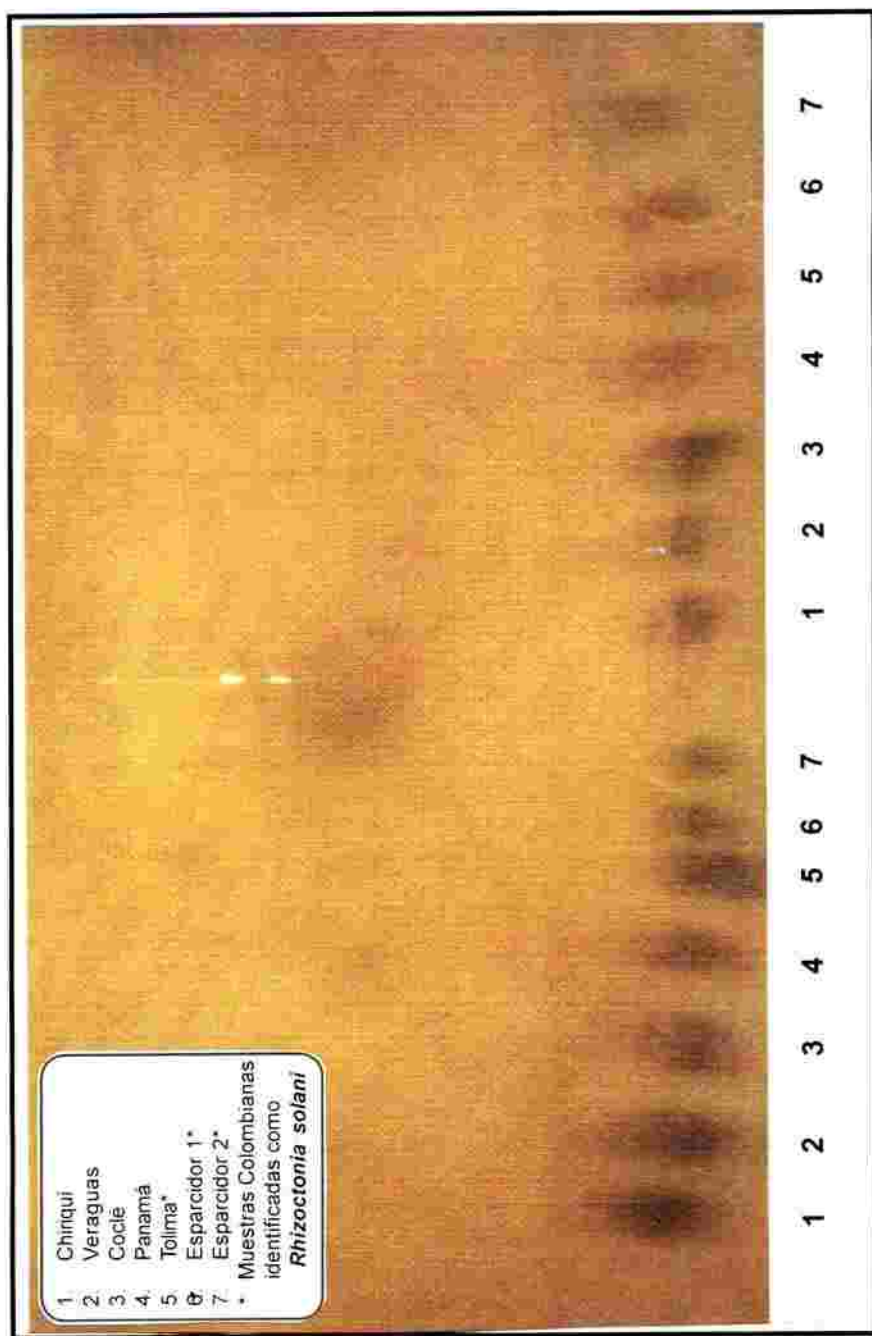


FIGURA 4. ZIMOGRAMA DE GEL DE ALMIDÓN PARA LA ISOENZIMA HEXOKINASA (HK).

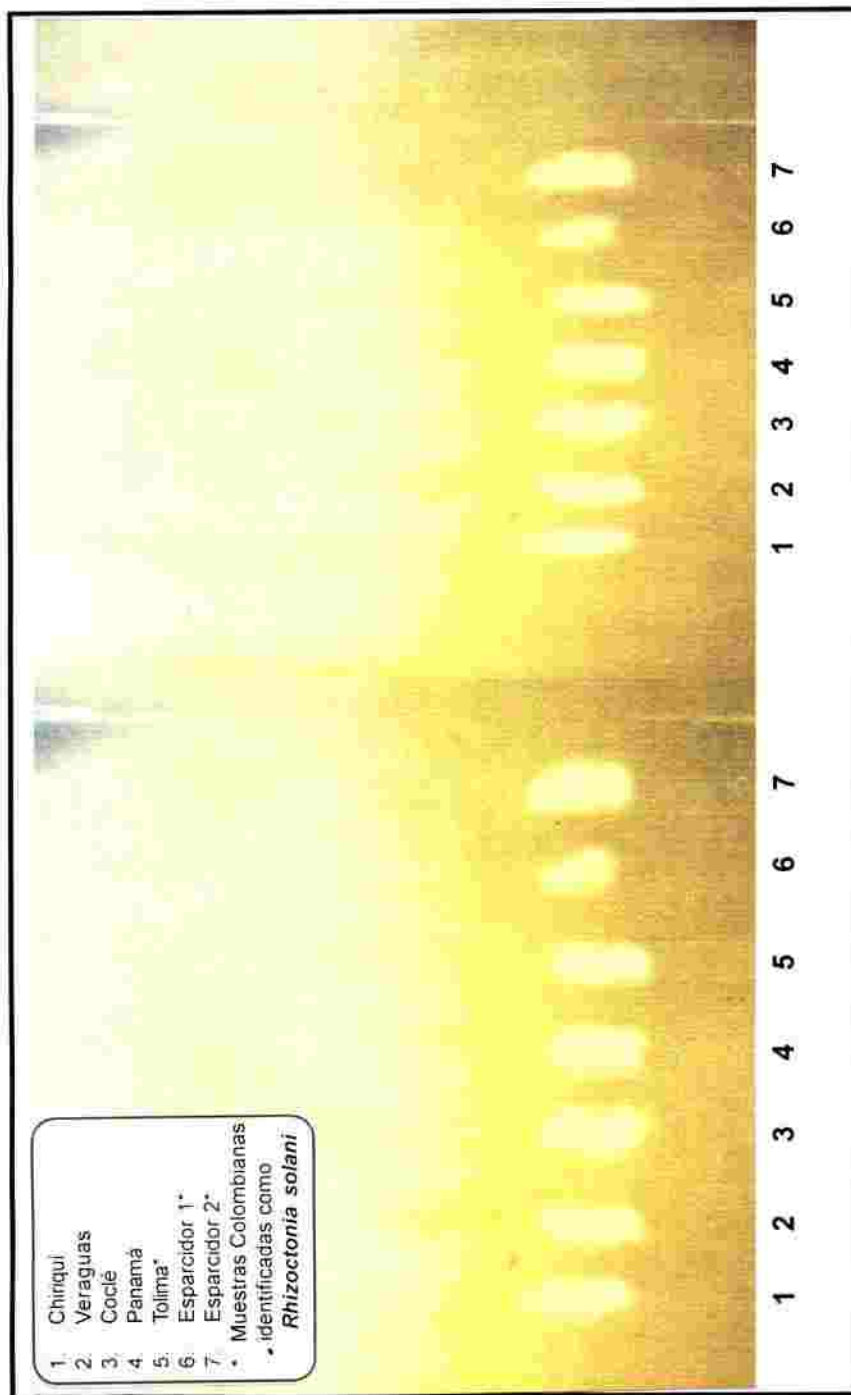


FIGURA 5. ZIMOGRAMA DE GEL DE ALMIDÓN PARA LA ISOENZIMA FUMARASA.

- ✕ Los zimogramas y coeficientes RF de los aislamientos procedentes de Coclé son iguales al aislamiento de referencia Tolima en cuatro isoenzimas, excepto para alfaesterasa.
- ✕ Los zimogramas y coeficientes RF obtenidos para el aislamiento procedentes de la provincia de Panamá son iguales al aislamiento de referencia Esparcador 1 en cuatro isoenzimas excepto para Leucin aminopeptidasa.
- ✕ Las variaciones en las cadenas polipeptídicas de las isoenzimas Leucin aminopeptidasa y alfaesterasa indican la existencia de variantes en la población de *Rhizoctonia*.
- ✕ La igualdad en los zimogramas y coeficientes RF existentes entre los aislamientos de Panamá y de referencia indican que los aislamientos colectados en las zonas arroceras del país pertenecen a la especie *Rhizoctonia solani*.

### RECOMENDACIONES

- ◆ Ensayar la detección de otras isoenzimas tales como: diaforasas, betaesterasas, fosfoglucoisomerasas, con el propósito de obtener un mayor polimorfismo que permita establecer diferencias entre los aislamientos.

- ◆ Obtener la isoenzima más poliimórficas en geles de almidón y proceder a ensayar corridas de electroforesis en geles de acrilamida con gradiente de concentración.
- ◆ Ensayar la diferenciación de los aislamientos con técnicas moleculares como: RFLP Y RAPDS.

### BIBLIOGRAFÍA

- AGUILERA, V. 1991. Manual de recomendaciones para la producción de Arroz. Dirección de Extensión Agropecuaria. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. Panamá, 1 p.
- BANNIZA, S.; SY, A.A.; BRIDGE, P.D.; SIMONS, S.A.; HOLDERNESS, M. 1999. Characterization of population of *Rhizoctonia solani* in paddy rice fields in Cote d' Ivoire. Phytopathology, S.A. Impreso en México. 956 p.
- BREWER, G.J.; SING, F.CH. 1970. An introduction to isozyme techniques. Academic Press, Inc. Ill fifth Avenue, New York, USA.
- CIAT. 1993. Añublo de la vaina. Métodos de Aislamientos. Cali, Colombia. pp. 2-3.
- CONTRALORÍA GENERAL DE LA REPÚBLICA. 1991. Censo Agropecuario. Producción Agrícola, Panamá.

- CONTRALORÍA GENERAL DE LA REPÚBLICA. 1996. Panamá en Cifras.
- DAVIS, B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to serum proteins. USA.
- HODGKIN, T. 1991. Potential and limitation of current methodologies for investigating genetic diversity ATSA/IBGPR. Workshop on conservation of plant genetic resources. *In Genetic diversity and strategies for root and tubers.* (ed.) Barbara Becker. Bonn, Germany. pp. 52-60.
- IICA. 1994. Cosechas, molinos y mercados. La economía del arroz en Panamá. Serie Publicaciones Misceláneas. San José, Costa Rica. p. 84.
- MURPHY, R.W.; SITES, W.J.; BUTH, D.G.; HANFLER, C.H. 1990. Protein I: Isozyme Electrophoresis. *In Plant molecular systematics: molecular approaches* by Crawford Daniel J. Ed. by Hillis, D.M. and Moritz, Craig. Sinauer associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- OU, S.H. 1984. Rice Diseases. Commonwealth Micological Institute. Printed in Great Britain by the Cambridge News (Alberystwyth) Ltd.
- SIMPSON, M.J.A; WITHERS, L.A. 1986. Characterization of plant genetic resources using isozyme electrophoresis. A guide to the literature. A technical report commissioned by the IBBGPR. Advisory committee on *in vitro* storage. Roma, Italy. p.2.
- VON CHONG, K. 1994. Pudrición de la vaina del arroz. 5ª Jornada Agropecuaria. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, Divisa. 75 p.