

Niveles de inóculo de hongos fitopatógenos asociados a la semilla de arroz (*Oryza sativa*).

Inoculum levels of phytopathogenic fungi associated to rice (*Oryza sativa*) seed

J.B. Pineda¹, O. Colmenárez², N. Mendez¹ y L. Gutiérrez²

¹UCLA-Posgrado de Agronomía. Cabudare, estado Lara.

²INIA-Portuguesa, Acarigua.

Resumen

Se tiene interés en determinar umbrales de inóculo de hongos patógenos en semilla de arroz para establecer el nivel permisible como semilla sana. Lotes de semilla de arroz genética, registrada y certificada var Fonaiap 1, recolectados en un campo de producción en Payara, estado Portuguesa, fueron procesados para cuantificar los niveles de inóculo de los hongos asociados y determinar su incidencia en las plantas. Se clasificaron cinco sub-lotes: semilla normal, deforme, vana, verde y manchada, encontrándose los mayores porcentajes de semilla en los sublotes normal y manchada. El mayor porcentaje de infección en semilla registrada y certificada se encontró en el sub-lote manchada. Se identificaron hongos potencialmente fitopatógenos como *Bipolaris oryzae*, *Curvularia oryzae*, *Drechslera oryzae*, *Nigrospora* sp y *Fusarium* spp. Manchas ovaladas con borde marrón en la semilla se relacionaron, en plantas provenientes de esa semilla, con manchas del follaje producidas por *D. oryzae* y *Alternaria* sp. Manchas marrón oscuro en semilla se relacionaron con manchas del follaje por *D. oryzae*, *C. oryzae* y *Alternaria* sp. Manchas irregulares marrón claro, con manchas del follaje por *C. oryzae*, *Nigrospora* sp, *D. oryzae*, *Alternaria* sp y *B. oryzae*. El porcentaje de incidencia en las plantas, comparado con el nivel de inóculo en la semilla certificada fue relativamente bajo, pero la correlación fue significativa. Un nivel de inóculo de *D. oryzae* en la semilla mayor a 0,1% y de *C. oryzae* mayor a 1% puede potencialmente producir infección en las plantas.

Palabras clave: *Bipolaris oryzae*, *Curvularia oryzae*, *Drechslera oryzae*, *Oryza sativa*, arroz, inóculo en semilla.

Abstract

Healthy seed obtention is an important disease control measure. There is a special interest on determining inoculums thresholds of pathogens in rice seed in order to establish the more suitable permissible level for being manageable as healthy seed. Lots of rice seed variety Fonaiap 1, collected in a seed production field located in Payara, Portuguesa state, was processed to quantify the inoculums level of seed-borne fungi and to determine its incidence in plants. Five sub-lots were classified: normal, deformed, vain, green and discolored seed, being the greater percentage of seed in normal and discolored sub-lots. The greater percentage of fungi infection in registered and certified seed occurred in the discolored sub-lot. Potentially pathogens fungi were identified, as *Bipolaris oryzae*, *Curvularia oryzae*, *Drechslera oryzae*, *Nigrospora* sp. and *Fusarium* spp. Oval spots with brown edge on the seed were related, in plants from that seed, with foliage spots produced by *D. oryzae* and *Alternaria* sp. The higher percentage of fungi infection in registered and certified seed occurred in the discolored sub-lot. Brown dark spots in seed were related to foliage spots caused by *D. oryzae*, *C. oryzae* and *Alternaria* sp. Irregular brown seed spots with foliage spots by *C. oryzae*, *Nigrospora* sp, *D. oryzae*, *Alternaria* sp and *B. oryzae*. The incidence percentage in plants, compared with the inoculums level in certified seed was relatively low, but the correlation was significative. Inoculums levels of *D. oryzae* in seed greater to 0.1% and of *C. oryzae* greater to 1% potentially can produce plants infection.

Key words: *Bipolaris oryzae*, *Curvularia oryzae*, *Drechslera oryzae*, *Oryza sativa*, Seed-borne inoculum.

Introducción

La obtención de semilla sana es una importante medida de control de enfermedades, debido a que ésta es uno de los principales vehículos de transmisión de patógenos. La certificación, aplicada a la producción de semilla de calidad, tiene como objetivo actuar como medida de control de calidad para mantener las enfermedades a niveles tan bajos como sea posible (11). Lo ideal sería obtener la semilla en campos libre de fitopatógenos, sin embargo, en la mayoría de los cultivos y específicamente en arroz, la certificación se debe lle-

Introduction

Healthy seed obtention is an important disease control measure because it is a principal vehicle of pathogens transmission. The certification, applied to production of a good quality seed has as purpose to act like quality control measurement for keeping diseases at low levels as possible (11). The ideal situation could be to obtain seed from pathogens free fields, however, in most of crops and specifically in rice, certification must be accomplished in regions in where the agroecological conditions are ideal for the crop adaptation, but also, pathogens will be present.

var a cabo en zonas donde las condiciones agroecológicas sean ideales para la adaptación del cultivo, donde también estarán presentes los fitopatógenos.

Se ha discutido en numerosos trabajos la presencia de inóculo, en semillas de arroz, de los hongos *Alternaria padwickii*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Drechslera australiensis*, *Fusarium pallidoroseum*, *Magnaporthe grisea*, *Cochliobolus lunatus*, *Curvularia ovoidea*, *C. oryzae*, *Gibberella fujikuroi*, *Magnaporthe salvinii*, *Monographella albescens*, *Nigrospora oryzae* y *Sarocladium oryzae* (3, 7, 8, 10, 12, 14).

Un complejo de hongos causa manchado del grano, entre los cuales se encuentra *Cochliobolus miyabeanus* (*Bipolaris oryzae*), *Drechslera oryzae*, *Alternaria padwickii*, *Sarocladium oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Epicoccum sp.*, *Phoma sp.*, *Phyllosticta sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria spp.*, *Aspergillus sp.*, *Pyricularia sp.* y *Cercospora sp.* (9, 13). Se ha discutido también la transmisión de estos patógenos a través de la semilla (7, 8, 12, 14).

El umbral de inóculo de patógenos habitantes de la semilla, es definido como la cantidad de infección o infestación de la semilla con fitopatógenos que causarán enfermedades en el cultivo y en consecuencia pérdidas económicas (4, 6). Es por esta razón que se tiene especial interés en determinar umbrales de inóculo en semilla de arroz para establecer, entre los diferentes niveles de infección en plantas provenientes de semilla

Inoculums presence in rice seeds has been discussed in many researches about fungi *Alternaria padwickii*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Drechslera australiensis*, *Fusarium pallidoroseum*, *Magnaporthe grisea*, *Cochliobolus lunatus*, *Curvularia ovoidea*, *C. oryzae*, *Gibberella fujikuroi*, *Magnaporthe salvinii*, *Monographella albescens*, *Nigrospora oryzae* and *Sarocladium oryzae* (3, 7, 8, 10, 12, 14).

A fungi complex causes grain spot between *Cochliobolus miyabeanus* (*Bipolaris oryzae*), *Drechslera oryzae*, *Alternaria padwickii*, *Sarocladium oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Epicoccum sp.*, *Phoma sp.*, *Phyllosticta sp.*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria spp.*, *Aspergillus sp.*, *Pyricularia sp.* and *Cercospora sp.* (9, 13). The transmission of these pathogens through seed has been discussed (7, 8, 12, 14).

Pathogens inoculums threshold in seed is defined like the infection quantity or seed infestation with pathogens that will cause diseases in crop and consequently, economical losses (4, 6). For this reason, there is a special interest on determining inoculums threshold in rice seed for establishing between the different infection levels of plants coming from basic and certified seed, the permissible level more adequate for managing like healthy seed.

The objectives of this research were to quantify the pathogen fungi populations habitating in basic and certified seed produced in Payara region, Portuguesa state; to characterize the seed symptoms

básica y certificada, el nivel permisible más adecuado para darle el manejo como semilla sana.

Con esta finalidad se plantearon como objetivos de este trabajo cuantificar las poblaciones de hongos patógenos habitantes de la semilla básica y certificada producida en la zona de Payara, estado Portuguesa, caracterizar los síntomas en la semilla asociados con la presencia de cada fitopatógeno y cuantificar, en condiciones de vivero, la incidencia de enfermedades en plantas provenientes de semilla certificada.

Materiales y métodos

Recolección de muestras y clasificación de la semilla. Semilla de arroz variedad Fonaiap 1 fue recolectada en un campo de producción del INIA-Portuguesa, ubicado en la zona de Payara- estado Portuguesa, con temperatura media anual de 27°C y precipitación media anual de 1372 mm. Se recolectaron aproximadamente 1000 g de semilla en panoja, en cinco puntos equidistantes en lotes de Semilla Genética, Registrada y Certificada.

En el laboratorio, las muestras se colocaron en bandejas plásticas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% y se homogeneizaron, obteniéndose un total de 5000 g de semilla en cada muestra. Las muestras se expusieron al sol durante 72 horas para reducir la humedad. De cada una de estas se seleccionó un lote de 1000 g para dividirlos en sub-lotes y clasificarlos de acuerdo a sus características. Cada sub-lote fue pesado

related to the presence of each pathogen and; to quantify in glasshouse conditions, the disease incidence in plants coming from certified seed and to compare both conditions.

Materials and methods

Sample collection and seed classification. Rice seed variety Fonaiap 1 was collected in a production field of INIA-Portuguesa located in Paraya region, Portuguesa state, with an annual mean temperature of 27°C and annual mean rainfall of 1372 mm. Sampling consisted in collecting 1000 g of panicle seed approximately, in five points equal distant in genetic seed lot, registered and certified.

Seeds of each panicle samples were separated in the laboratory, by eliminating every impurity; they were placed in plastics trays disinfected with sodium hypo chloride to 1%, after they were homogenized by being obtaining a total of 5000 g per seed. Samples were divided into sub samples and they were exposed to sunlight during 72 hours for reducing moisture. A lot of 1000 g was selected for dividing in sub-lots and classify them according to its characteristics. Each of sub-lots was weighed for quantifying its percentage on the analyzed lot.

Five sub-lots corresponding to: normal, deformed, vain, green and discoloured seed were classified.

The seeds discoloured sub-lot was separated according to the aparition and characteristics of spot, in five types:

para cuantificar el porcentaje contenido dentro del lote analizado.

Se clasificaron cinco sub-lotes correspondientes a: semilla normal, deforme, vana, verde y manchada.

El sub-lote de semillas manchadas se separó, según la aparición y características de la mancha, en cinco tipos:

➤ Mancha gris-blanquecina, bordes irregulares desde el ápice a la base (MGB).

➤ Mancha ovalada con centro claro y halo marrón oscuro (MO).

➤ Mancha irregular marrón claro, abarca toda la superficie de la semilla (MMC).

➤ Mancha marrón oscuro en toda la semilla (MMO).

➤ Puntos marrón oscuro en toda la semilla (PMC).

Prueba de germinación. 20 semillas de cada sub-lote se colocaron en cápsulas de Petri con papel absorbente humedecido con agua estéril, en tres repeticiones y se realizaron observaciones hasta los cuatro días para conocer el porcentaje de germinación promedio dentro de cada lote.

Aislamiento y cuantificación de los niveles de inóculo en la semilla. Para la identificación de los hongos presentes en cada uno de los sub-lotes se colocaron, en cápsulas de Petri con papa dextrosa agar (PDA), semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% y semillas no desinfectadas. Se utilizaron 4 cápsulas por sub-lote, con 5 semillas cada una. Los aislamientos se mantuvieron en incubación por 5 días; luego se seleccionaron las colonias de hongos desarrolladas por sus características (aspecto, coloración y semejanza); se

➤ Grey-whitish spot, irregular edges from apex to basement (GWS).

➤ Oval spot with clear center and dark brown halo (DB).

➤ Irregular clear brown spot, occupying all the surface of seed (CBS).

➤ Dark brown spot in all the seed (DBS).

➤ Dark brown points all around the seed (DBP).

Germination Test. 20 seeds of each sub-lot were placed into three repetitions in Petri dishes with absorbent paper impregnated with distilled water and periodical observations were accomplished until four days for knowing the germination percentage in each lot (genetic, registered and certified).

Isolation and quantification of seed inoculum levels. For the fungi identification presents in each sub-lot were placed in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA), disinfected seeds with sodium hypochlorite to 2% and no disinfected seeds. Four capsules per lot were used, with 5 seeds each. Isolations were maintained in incubation for 5 days, after colonies were selected by its characteristics (aspect, coloration and similarity), fungi selected were identified by keys (1, 2, 16) and colonies presents in each seed were quantified for obtaining percentages each case (inoculum levels).

Fungi related to seed and its incidence on plants.

Nursery Tests. 20 seeds without disinfecting of each lot and sub-lot (each seed corresponded to replications). After 8 days, pre-germinated seeds were transplanted

identificaron los hongos seleccionados mediante claves (1, 2, 16) y se cuantificaron las colonias en cada semilla para obtener los porcentajes en cada caso (niveles de inóculo).

Hongos asociados a la semilla y su incidencia en plantas. Pruebas en vivero. En bandejas plásticas se sometieron a germinación 20 semillas sin desinfectar de cada sub lote (cada semilla correspondió a una repetición). A los 8 días, las semillas pregerminadas fueron transplantadas en poncheras plásticas con suelo esterilizado, las plantas se fertilizaron con una fórmula completa (12 -24 -12) a los 15 días de transplantadas y posteriormente cada 15 días hasta la madurez. A partir de los 30 días se reali-

into plastic punch bowl with sterilized soil; plants were fertilized with a complete formula 12-24-12 at 15 days after transplanting and consequently, each 15 days until maturity. From day 30, evaluations were carried out each 7 days for determining in a secuencial way the incidence of damages on foliage when they appeared that was accomplished to the time of grain filled. The incidence was quantified through the plants number affected by determined symptom in each sub lot. A description of foliar symptoms (brown spot with yellow halo, scalding, yellow-brown apex, yellow-brown apex, irregular spot with brown edge, white spot, brown spot with ochre center) and its respective isolation

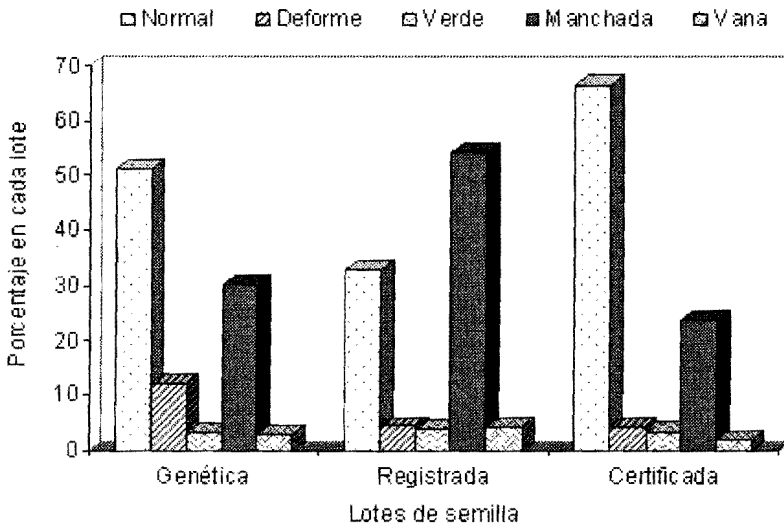


Figura 1. Porcentaje correspondiente al total de los lotes de semilla Genética, Registrada y Certificada var. Fonaiap-1, según características de selección.

Figure 1. Percentage corresponding to total of genetic, registered and certified seed var. Fonaiap-1, according choosing characteristics.

zaron evaluaciones cada 7 días para determinar secuencialmente la incidencia de daños en el follaje a medida que fueran apareciendo, lo cual se llevó a cabo hasta la etapa de llenado del grano. La incidencia se cuantificó mediante el número de plantas afectadas por determinado síntoma en cada sub-lote. Se hizo una descripción de síntomas foliares (Mancha marrón con halo amarillo, Escaldadura, Ápice amarillo-marrón, Mancha irregular con borde marrón, Mancha blanca, Mancha marrón con centro ocre) y el respectivo aislamiento a partir de dichos síntomas, para diagnosticar, mediante claves descriptivas (1, 2, 16), los hongos fitopatógenos presentes y relacionarlos con los daños en la semilla. Se aplicó la correlación de Pearson, utilizando el Programa Estadístico SPSS 11.5 (15), para relacionar la infección por hongos en semilla y la infección en plantas provenientes de esa semilla.

Resultados y discusión

Características de las semillas en los lotes. En las muestras se encontraron diferentes tipos de semilla (normal, deforme, verde, manchada y vana), pero los mayores porcentajes de semilla del lote se encontraron en los sub-lotes normal y manchada (figura 1). Pandey *et al.* (12), trabajando con semilla híbrida de arroz, encontraron siete tipos de decoloraciones, además de la semilla sana, las cuales clasificaron como gris ceniza, puntos negros, marrón oscuro, marrón claro, claro a oscuro, manchas marrón y amarillo pálido.

Se sabe que en el procesamiento de la semilla postcosecha se elimi-

from these symptoms for making a diagnosis by following descriptive keys (1, 2, 16) the phyto pathogens fungi presents and therefore establish a relationship with damages in seed. Pearson's correlation was applied by using the statistical program SPSS 11.5 (15), for showing a relationship by fungi in seed and infection in plants coming from that seed.

Results and discussion

Seeds characteristics in the sub-lots. In samples there were found different types of seeds (normal, deformed, green, discoloured and vain), but in the higher percentages of lot seeds there were found in the sub-lots normal and discoloured (figure 1). Pandey *et al.* (12), working out with rice hybrid seed found seven types of discolourations, besides of healthy seed which were classified as ash grey, black points, dark brown, clear brown, clear to dark, brown spots and pale yellow.

It is known that on post harvest seed processing those vain grains, of a little weight, or that are capable of damaging the seed quality are eliminated. Manandhar *et al.* (7) says that the post-harvest measurements reduced in a significative way the seed infection by *Pyricularia oryzae*, since filled grains had little infection degree in relation to empty grains..

Germination Test. In relation to the seed germination, the percentage in the normal sub-lot always was between the 15% and 100% (figure 2) whereas in the discolored spot there was a high variation in the dark brown spot (DBS) and clear brown points (CBP).

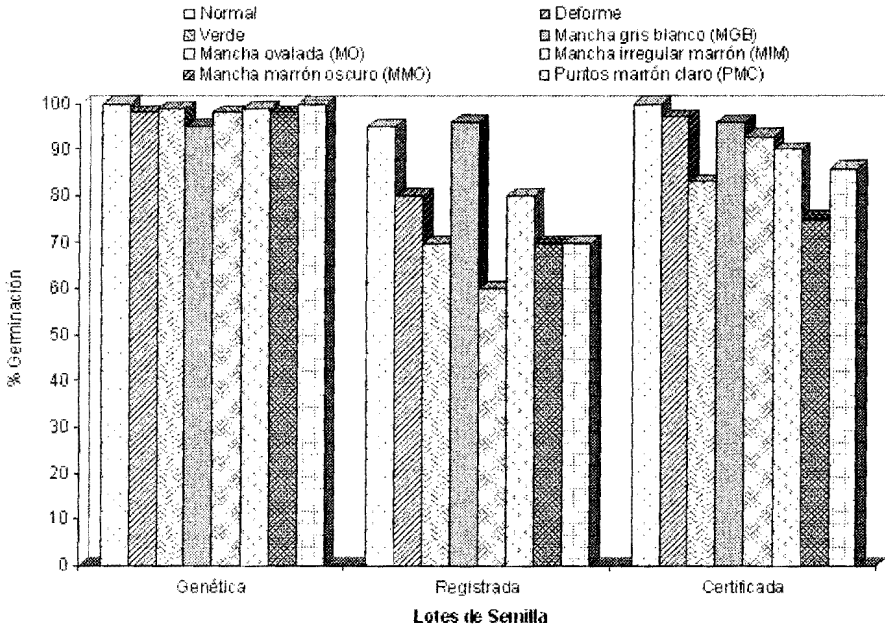


Figura 2. Porcentaje de germinación de la semilla Genética, Registrada y Certificada de arroz var. Fonaiap-1 según los sub-lotes clasificados.

Figure 2. Percentage of Genetic, Registered and Certified rice seeds var. Fonaiap-1 according to the classified sub-lots.

nan aquellos granos vanos (no llenos) de poco peso y tamaño, que pueden desmejorar la calidad de la semilla. Al respecto, Manandhar *et al.* (7) señalan que las medidas postcosecha redujeron significativamente la infección de semillas por *Pyricularia oryzae*, ya que los granos llenos tuvieron menor grado de infección que los granos vacíos.

Prueba de germinación. En el lote de semilla genética, los porcentajes de germinación fueron muy homogéneos en todos los sub-lotes y tipos, en general mayores al 95% (figura 2). En los lotes registrada y certificada, en el sub-lote normal el porcen-

The external characteristics that rice seed showed suggest that there are factors involved in the seed discoloration and influences on its quality, by affecting in some cases its germination. Some spots, specifically those of dark brown color and the irregular spots can be caused by seed habitant's pathogens and according to percentage in the sampled lot could represent an important aspect to be considered in relation to the seed quality and to potential losses of plants in field, once sowed.

Pathogens identification and percentage of infected seed. Potentially pathogens fungi were

taje estuvo entre el 95 y 100%, mientras que en los demás sub-lotes y tipos hubo mucha variación, especialmente en los tipos mancha gris blanco (MGB), mancha marrón oscuro (MMO) y puntos marrón claro (PMC).

Las características externas que presentó la semilla, sugieren que hay factores involucrados en el manchado que influyen en la calidad, afectando en algunos casos su germinación. Algunas manchas pueden ser ocasionadas por fitopatógenos habitantes de la semilla y de acuerdo al porcentaje en que se encuentren, pueden representar un aspecto importante a considerar en cuanto a la calidad de la semilla y a pérdidas potenciales de plantas en el campo.

Identificación de hongos fitopatógenos y porcentaje de semilla infectada. En la semilla fueron encontrados hongos potencialmente patógenos en cultivos de arroz, como *Bipolaris oryzae*, *Curvularia oryzae*, *Drechslera oryzae*, *Nigrospora sp* y *Fusarium spp*. El porcentaje de infección en la semilla en general fue bajo, excepto para *C. oryzae* y *Nigrospora sp*, que no constituyen patógenos de importancia en el país. *B. oryzae* fue el hongo fitopatógeno de importancia con mayor incidencia. *D. oryzae* solamente se encontró en semilla certificada.

En semilla genética (cuadro 1) se encontró 0,13% de infección con el hongo *B. oryzae*, proveniente exclusivamente de semilla vana. *Curvularia oryzae* se presentó en 10,99% de la muestra, de los cuales la semilla normal aportó el 7,67%. En semilla registrada (cuadro 2), *B. oryzae* se en-

found in seed of rice crops, like *Bipolaris oryzae*, *Curvularia oryzae*, *Drechslera oryzae*, *Nigrospora sp.* and *Fusarium sp.* The seed infection percentage was not high, except for *C. oryzae* and *Nigrospora sp.* that do not constitute pathogens of importance in this country. *B. oryzae* was the pathogen of importance with a high incidence. *D. oryzae* only was found in certified seed.

In genetic seed (table 1) it was found 0.13% of infection with the *B. oryzae* pathogen coming exclusively from healthy seed. *Curvularia oryzae* was present in 10.99% of the sample from which the normal seed gave the 7.67%. In registered seed (table 2) *B. oryzae* was found in 1.75% from which the normal seed gave 1.48%. *C. oryzae* was present in 15.36% and the normal seed gave the 4.92%. In general, the higher infection percentage by fungi in registered and certified seeds was found in the discolored seed. For the certified seed (table 3) the infection percentages were little, by detaching the presence of *D. oryzae* with 0.14%.

Pandey *et al.* (12) found that fungi incidence percentage in different parts of seeds varied according to its discoloration degree by detecting a higher infection incidence in parts of seed with higher discoloration degree. *A. padwickii* infection was detected in the seminal cover and at the endosperm of seed showing ash grey discoloration, black points, dark brown, clear brown, clear to dark brown spots and pale yellow. *Cochilobolus miyabeanus* (*Bipolaris oryzae*) infection was found in the cover, endosperm and embryo, depending on discoloration type: black

Cuadro 1. Porcentaje de semilla infectada por hongos fitopatógenos en los diferentes tipos del lote de semilla Genética var. Fonaiaap-1.

Table 1. Percentage of infected seed by phyto pathogens fungi in the different types of the genetic seed lot var. Fonaiaap-1.

Patógeno	Porcentaje (%) en relación al lote de semilla									
	NOR	DEF	VER	VAN	MGB	MO	MMC	MN	PMC	Total
<i>Bipolaris oryzae</i>	0	0	0	0,13	0	0	0	0	0	0,13
<i>Curvularia oryzae</i>	7,67	0,55	0,46	0,13	0,07	0	0,62	1,32	0	10,99
<i>Nigrospora</i> sp.	0	0	0	0	0,15	0	0,57	0	0	0,72
<i>Fusarium</i> spp.	0	1,10	0,14	0	0,15	0,40	0	0	0	1,79
<i>Aspergillus</i> sp.	12,81	3,04	1,08	0,42	0,22	1,33	1,88	3,32	0,02	24,12

NOR: Semilla normal; DEF: Deforme; VER: Verde; VAN: Vana; MGB: Mancha gris blanca; MO: Mancha oscura; MMC: Mancha marrón claro; MN: Mancha negra; PMC: Punto marrón claro.

Cuadro 2. Porcentaje de semilla infectada por hongos fitopatógenos en los diferentes tipos del lote de semilla Registrada var. Fonaiaap-1.

Table 2. Percentage of infected seed by phyto pathogen fungi in the different types of registered seed lot var. Fonaiaap-1.

Patógeno	Porcentaje (%) en relación al lote de semilla									
	NOR	DEF	VER	VAN	MMO	MO	MMI	PMC	Total	
<i>Bipolaris oryzae</i>	1,48	0,20	0	0	0	0	0,07	0	1,75	
<i>Curvularia oryzae</i>	4,92	1,12	0,58	0,62	0,55	3,07	0,10	4,40	15,36	
<i>Nigrospora</i> sp	1,48	0,20	1,17	0	0,13	0,68	0,24	4,36	8,26	
<i>Fusarium</i> spp	1,48	0,20	0,18	0	0	2,00	0	7,25	11,11	
<i>Aspergillus</i> sp	0	0	0,18	0	0,13	0	0	1,31	1,62	

NOR: Semilla normal; DEF: Deforme; VER: Verde; VAN: Vana; MMO: Mancha marrón oscuro; MO: Mancha oscura; MMI: Mancha marrón irregular; PMC: Punto marrón claro.

contró en un 1,75%, del cual la semilla normal aportó 1,48%, *C. oryzae* estuvo presente en un 15,36%, aportando la semilla normal el 4,92%. En general, el mayor porcentaje de infección por hongos en semilla clase registrada y certificada se encontró en la semilla manchada. Para la certificada (cuadro 3), los porcentajes de infección fueron bajos, destacándose la presencia de *D. oryzae* con un 0,14%.

Pandey et al. (12) encontraron que el porcentaje de incidencia de hongos en diferentes partes de la semilla, varió de acuerdo al grado de decoloración de la misma, detectando una mayor incidencia de infección en partes de la semilla con mayor grado de decoloración. La infección de *A. padwickii* fue detectada en la cubierta seminal y en el endospermo de semillas que mostraban decoloración gris ceniza, puntos negros, marrón oscuro, marrón claro, manchas marrón claro a oscuro y amarillo pálido. La infección por *Cochliobolus miyabeanus* (*Bipolaris oryzae*) fue encontrada en la cubierta, endospermo y embrión, dependiendo del tipo de decoloración: puntos negros, mancha ojival, mancha marrón claro a oscuro y amarillo pálido, con porcentajes de incidencia de 16,6 y 14,0 para semilla con puntos negros y decoloración amarillo pálido en la cubierta (12).

Drechslera australiensis fue detectada en la cubierta y el endospermo de semillas con decoloración gris ceniza y marrón oscuro. La infección de *Fusarium pallidoroseum* fue detectada en semilla que exhibía decoloración marrón oscuro en la cu-

points, ojival spot, clear to dark brown spot and pale yellow, with incidence percentages of 16.6 and 14.0 for seed with black points and pale yellow discoloration in the cover (12).

Drechslera australiensis was detected on cover and the seed endosperm with ash grey discoloration and dark brown. *Fusarium pallidoroseum* infection was detected in seed that showed dark brown discoloration in the cover and the endosperm, with incidence of 16.0 and 12.0 respectively (10). *Magnaporthe grisea* was detected from the cover and the seed endosperm by showing ogival spots, with incidence percentages of 70 and 80%. *Nigrospora oryzae* was detected in every seed parts with ash grey discoloration with black points, with incidence of 24.0; 16.0 and 6.0% (12).

These results confirm this study, about the pathogens found like the incidence percentages in seeds of Fonaiaip-1 variety.

The normal, deformed, green, vain and GWS, of certified seed do not present pathogens (table 3) and in general, the infection percentages were little for this class. This can happen because the certified seed is protected during the development phase in field with a fungicide application program restricted that eliminates the inoculum present and to protect the grain of external infections. According Muñoz and Gamboa (7) from the phase of booting to the dough grain (20-25 duration days), the more risky period is present since the more noxious diseases that affect the filled and quality of grains.

Phyto pathogen fungi

bierta y el endospermo, con incidencia de 16,0 y 12,0 respectivamente (12). *Magnaporthe grisea* fue detectada en la cubierta y el endospermo de semilla exhibiendo manchas oживales, con porcentajes de incidencia de 70 y 80%. *Nigrospora oryzae* fue detectada en todas las partes de la semilla con decoloración gris ceniza con puntos negros, con incidencia de 24,0; 16,0 y 6,0% (12).

Estos resultados avalan los obtenidos en este estudio, tanto de los hongos fitopatógenos encontrados como de los porcentajes de incidencia en semilla de la variedad Fonaiap-1.

Los tipos normal, deforme, verde, vana y MGB, de semilla certificada no presentaron patógenos (cuadro 3) y, en general, los porcentajes de infección fueron bajos para esta clase. Esto puede deberse a un estricto programa de aplicación de fungicidas durante la fase de desarrollo en el campo, que elimina en gran parte el inóculo presente y protege el grano de infecciones externas. Según Muñoz y Gamboa (9), desde la fase de embuchamiento a la de grano pastoso (20-25 días de duración), se presenta el periodo más riesgoso, ya que las enfermedades más nocivas afectan el llenado y la calidad de los granos.

Hongos fitopatógenos asociados a la semilla y su incidencia en las plantas. Los síntomas de manchado del follaje en las plantas de arroz en el umbráculo estuvieron muy asociados principalmente a la presencia de los hongos *Cladosporium sp*, *Nigrospora sp* y *C. oryzae*, los cuales no constituyen problemas de tipo patológico en arroz a nivel nacional y muchas veces están presentes como

related to seed and its incidence on plants. Symptoms of foliar spots in rice plants in the glasshouse were especially related to the presence of *Cladosporium sp*, *Nigrospora sp* and *C. oryzae fungi* which do not constitute problems of pathologic type in rice at a national level and many times are presents saprophytic fungi in the damaged tissue; however, in other regions of world that are labelled as phyto pathogens (7, 12, 14).

The oval spot with white centre in the seed was related, in the plants coming for this seed, with foliage spots produced by *D. oryzae*, *C. oryzae* and *Alternaria sp*. The dark brown spot in seed with foliage spots by *D. oryzae*, *C. oryzae* and *Alternaria sp*. The irregular dark brown spot, with foliage spots by *C. oryzae*, *Nigrospora sp.*, *D. oryzae*, *Alternaria sp.* and *B. oryzae* (table 4).

D. oryzae was present in plants like oval spot with brown edge, *Alternaria sp.*, like white spot with brown edge, *C. oryzae*, like a yellow or brown spot in the leave apex and *Nigrospora sp.*, like an scalded of brown color from the foliar apex. There were not observed any relationship between any specific symptom described in seed and any typical spot affecting foliage.

Only a little percentage of plants with different types of spots in foliage (table 5) can be attributed to a phyto pathogen fungal in particular.

Incidence percentage in plants compared to the inoculum level in the certified seed was relatively little (table 5 and 6), except for *C. oryzae* (22.88% and 1.81% respectively). Inoculum levels in seed will produce

Cuadro 3. Porcentaje de semilla infectada por hongos fitopatógenos en los diferentes tipos del lote de semilla Certificada var. Fonaiap-1.

Table 3. Percentage of seed infected by phyto pathogen fungi in the different types of lots of certified seed var. Fonaiap-1.

Patógeno	Porcentaje (%) en relación al lote de semilla										
	NOR	DEF	VER	VAN	MGB	MO	MMI	MMO	PMO	Total	
<i>Drechslera oryzae</i>	0	0	0	0	0	0,14	0	0	0	0,14	
<i>Curvularia oryzae</i>	0	0	0	0	0	0,21	1,60	0	0	1,81	
<i>Nigrospora</i> sp	0	0	0	0	0,39	0	0	0	0	0,39	
<i>Phoma</i> sp	0	0	0	0	0	0,14	0	0,29	0	0,43	
<i>Aspergillus</i> sp	0	0	0,40	0	2,60	0,35	0	0,57	0	3,92	

NOR: Semilla normal; DEF: Deforme; VER: Verde; VAN: Vana; MGB: Mancha gris blanca; MO: Mancha oscura; MMI: Mancha marrón irregular; MMO: Mancha marrón oscuro; PMO: Punto marrón oscuro.

Cuadro 4. Hongos fitopatógenos asociados a manchas del follaje en plantas de arroz en condiciones de vivero. Var. Fonaiap-1. Semilla Certificada

Table 4. Phyto pathogens fungi related to foliage spots in rice plants in glasshouse conditions. var. Fonaiap-1. Certified seed.

Síntomas en semilla y hongos fitopatógenos presentes en cada caso									
Síntomas en hojas	Semilla Normal	Semilla deforme	Semilla verde	Mancha gris ceniza	Mancha oval blanco	Mancha marrón irregular	Mancha marrón oscuro	Punto marrón oscuro	Mancha negra polvorienta
Mancha circular marrón con halo amarillo Escaldado	Nigrospora	Nigrospora	Cladosporium Phoma		Nigrospora	Bipolaris	Phoma		
Apice amarillo-marrón	Nigrospora	Cladosporium Nigrospora	Cladosporium Curvularia Colletotrichum	Fusarium Cladosporium Nigrospora	Cladosporium Curvularia Aspergillus	Cladosporium Aspergillus	Nigrospora Fusarium Rhizoctonia	Curvularia	Curvularia Nigrospora
Mancha ovalada irregular borde marrón	Cladosporium Nigrospora	Curvularia	Curvularia Drechslera	Nigrospora Cladosporium	Cladosporium Curvularia	Curvularia Nigrospora	Curvularia Drechslera	Curvularia	Fusarium Nigrospora
Mancha blanca con borde marrón	Alternaria				Alternaria				Alternaria

hongos saprófitos en el tejido dañado; sin embargo, en otras regiones del mundo, estos mismos son señalados como fitopatógenos (7, 12, 14).

La mancha ovalada con centro blanco en la semilla se relacionó, en las plantas, con manchas del follaje producidas por *D. oryzae* y *Alternaria* sp. La mancha marrón oscuro en la semilla, se relacionó con manchas del follaje en plantas por *D. oryzae*, *C. oryzae* y *Alternaria* sp. La mancha irregular marrón oscuro de la semilla, con manchas del follaje en plantas por *C. oryzae*, *Nigrospora* sp, *D. oryzae*, *Alternaria* sp y *B. oryzae* (cuadro 4).

D. oryzae se presentó en plantas como una mancha ovalada con borde marrón, *Alternaria* sp como mancha blanca con borde marrón, *C. oryzae* como una mancha amarillo a

in this case, little infection percentages in plants. Ou (10) says that in tropics, in where *Pyricularia grisea* is present every year on air, the pathogen permanency in seed is not important in the disease cycle. But in other regions, where the survival is necessary for fungal, the infected seeds play an important role.

Correlation between fungi infection on certified seed and the infection on plants coming from that seed was highly significant (table 7) which indicates that according to infection percentage on seed, will be present an infection percentage in plant that becomes higher when seed is more infected. According to results obtained in this research an inoculum level of *D. oryzae* in seed superior to 0.14% (14 seeds on 10.000) and of *C. oryzae* superior to 1% can potentially

Cuadro 5. Incidencia de hongos fitopatógenos en semilla certificada var. Fonaiap-1 y en plantas provenientes de esta semilla, según el tipo de manchas en el follaje.

Table 5. Phyto pathogen fungi incidence in certified seed var. Fonaiap-1 and in plants coming from this seed according to spots type in foliage.

Tipo de mancha en follaje	Hongo fitopatógeno	Porcentaje de incidencia(%)	
		Semilla certificada	Plantas
Mancha circular marrón halo amarillo	<i>Bipolaris oryzae</i>	0,00	1,10
Escaldadura	<i>Nigrospora</i> sp	0,39	3,88
	<i>Phoma</i> sp	0,43	1,10
Apice amarillo-marrón	<i>Curvularia oryzae</i>	1,81	22,88
Mancha ovalada irregular borde marrón	<i>Drechslera oryzae</i>	0,14	3,88
Mancha blanca conborde marrón	<i>Alternaria</i> sp	0,00	3,88

Cuadro 6. Comparación de hongos fitopatógenos presentes en la semilla y en plantas provenientes de esta semilla. Arroz variedad Fonaiap-1.

Table 6. Comparison of phyto pathogen presents in seed and in plants coming from this rice seed var. Fonaiap-1.

Genética	Semilla (Clase)		Plantas procedentes de semilla certificada
	Registrada	Certificada	
Curvularia oryzae	Curvularia oryzae	Curvularia oryzae	Curvularia oryzae
Nigrospora spp	Nigrospora spp	Nigrospora spp	Nigrospora spp
Fusarium spp	Fusarium spp	Drechslera oryzae	Drechslera oryzae
	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Phoma sp</i>	<i>Phoma sp</i>
			<i>Bipolaris oryzae</i>
			Fusarium spp
			Alternaria sp*
			<i>Cladosporium sp*</i>

*No presentes en la semilla.

marrón en el ápice de la hoja y *Nigrospora sp*, en algunos casos, como escaldado de color marrón desde el ápice foliar. No se observó relación entre algún síntoma específico descrito en la semilla y alguna mancha típica afectando el follaje.

Sólo un bajo porcentaje de plantas con diferentes tipos de manchas en el follaje (cuadro 5) puede ser atribuido a un hongo fitopatógeno en particular.

El porcentaje de incidencia en las plantas, comparado con el nivel de inóculo en la semilla certificada fue relativamente bajo (cuadros 5 y 6), excepto para *C. oryzae* (22,88% y 1,81% respectivamente). Los niveles de inóculo en la semilla producirán, en este caso, bajos porcentajes de infección en las plantas. Ou (10) discute que en los trópicos, donde el inóculo de *Pyricularia grisea* está presente

produce infection on rice plants var Fonaiap-1 (table 5).

Pandey *et al.* (12) reports phyto pathogen fungi transmission habitats on sed from seeds showing discoloration of ash grey, black points, dark brown spots, clear brown, clear to dark brown and pale yellow discolorations. The seed transmission of *Magnaporthe salvinil* was high; also there was transmission percentage of *A. padwickii*, *Cochilobolus miyabeanus* and *C. lunata*. The transmission of *Gibberella fujikuroi*, *Monographella albescens*, *Nigrospora oryzae* and *Sarocladium oryzae* was so little.

The inoculum levels and the infection quantity, however, will depend on the genetic material sowed, taking into account the Islam (3) research, in where significant variations respect to the pathological

durante todo el año en el aire, la permanencia de este hongo fitopatógeno en la semilla no es importante en el ciclo de la enfermedad. Igualmente señala que en otras regiones, donde la sobrevivencia es necesaria para el hongo, las semillas infectadas juegan un papel importante.

La correlación entre la infección por hongos en la semilla certificada y la infección en plantas provenientes de esa semilla, fue altamente significativa (cuadro 7), lo cual indica que, de acuerdo al porcentaje de infección en semilla, se presentará un porcentaje de infección en la planta, siendo éste mayor a medida que la semilla se encuentre más infectada. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, un nivel de inóculo de *D. oryzae* en la semilla mayor a 0,14% (14 semillas en 10.000) y de *C. oryzae* mayor a 1% puede potencialmente producir infección en plantas de arroz var. Fonaiap-1 (cuadro 5).

Pandey *et al.* (12) reportan transmisión de hongos fitopatógenos habitantes de la semilla a partir de semillas que presentaban decoloración gris ceniza, puntos negros, manchas marrón oscuro, marrón claro, marrón claro a oscuro y decoloraciones amarillo pálido. La transmisión por semilla de *Magnaporthe salvinii* fue alta, también hubo un buen porcentaje de transmisión de *A. padwickii*, *Cochliobolus miyabeanus* y *C. lunata*. La transmisión de *Gibberella fujikuroi*, *Monographella albescens*, *Nigrospora oryzae* y *Sarocladium oryzae* fue más baja.

Los niveles de inóculo y la cantidad de infección, sin embargo, dependerán del material genético, te-

infection percentage in different rice varieties are reported.

Conclusions

In every lot a high seed percentage with several spot types was found. Specifically, the irregular spots and those of dark brown color were caused by phyto pathogen fungi that habits in seed.

Fungi potentially pathogens in rice crops were found in seed like *Bipolaris oryzae*, *Curvularia oryzae* and *Drechslera oryzae*. The infection percentage in seed was not high except for *C. oryzae* that not constitute a pathogen of importance in country. *B. oryzae* was the pathogen of importance with a higher incidence. *D. oryzae* only was found in certified seed in a little percentage.

The oval spot with white center in seed was related in plants coming from that seed with foliage spot produced by *D. oryzae* and *Alternaria sp.* The dark brown spot with foliage spots by *D. oryzae*, *C. oryzae* and *Alternaria sp.* The irregular dark brown spot with foliage spots by *C. oryzae*, *Nigrospora sp.*, *D. oryzae*, *Alternaria sp.* and *B. oryzae*.

D. oryzae was present in plants like oval spot with brown edge; *Alternaria sp.* like yellow or brown spot in the leave apex and *Nigrospora sp.*, in some cases, like an scalded of brown color from the foliar apex. There were not observed any relationship between any specific symptom described in seed and any specific spot affecting the foliage.

Inoculum levels of *D. oryzae* in seed superior or equal to 0.14% (14

Cuadro 7. Correlación entre la incidencia de hongos fitopatógenos en semilla certificada de arroz var. Fonaiap-1 y en plantas provenientes de esa semilla.

Table 7. Correlation between the phyto pathogen fungi incidence in certified rice seed var. Fonaiap-1 and in plants coming from that seed.

		Semilla	Planta
Semilla	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	1 .	0,945(**) 0,004
Planta	Correlación de Pearson Sig. (bilateral)	0,945(**) 0,004	1 .

**La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

niendo en cuenta el trabajo de Islam *et al.* (5), que señala variaciones significantes con respecto al porcentaje de infección patogénica en diferentes variedades de arroz.

Conclusiones

Bipolaris oryzae fue el patógeno de importancia con mayor incidencia en la semilla. Niveles de inóculo en la semilla del patógeno *Drechslera oryzae* mayores a 0,1% pueden producir potencialmente infección en las plantas.

Se encontró un alto porcentaje de semilla con varios tipos de manchas. Manchas ovaladas con centro blanco y manchas irregulares marrón oscuro en la semilla produjeron, en plantas, manchas del follaje por *D. oryzae*, *Alternaria* sp. y *B. oryzae*.

Agradecimiento

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (CDCHT-UCLA) por el apoyo

seeds on 10.000) and of *C. oryzae* superior to 1% could produce infection in plants.

Acknowledgement

Authors want to express their thanks to the Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (CDCHT-UCLA) by the economical and logistic support for accomplishing this project.

Also, we are grateful to Ing. Agr. MS. Elizabeth Gil and to Lic. Willioam Aranguren by their collaboration in the development of this research.

End of english version

económico y logístico brindado para la realización de este proyecto.

A la Ing. Agr. Ms Elizabeth Gil E. y al Lic. William Aranguren por su colaboración durante el desarrollo de esta investigación.

Literatura citada

1. Ainsworth, G.C., F.K. Sparrow, y A.S. Sussman. 1973. *The Fungi*. An advanced treatise. Vol. IV A. A taxonomic Review with Keys: Ascomycetes and Fungi Imperfecti. Academic Press Inc. New York. 621 p.
2. Barnett, H. y B. Hunter. 1999. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. APS Press. Fourth edition. St. Paul. Minnesota. USA. 218 p.
3. Corrales, S. y L. Subero. 1997. Efecto de la época de siembra en la incidencia de hongos en semilla de arroz. XV Cong. Ven. de Fitopatología. Memorias. Maracaibo. p 71.
4. Gabrielson, R.L. 1988. Fungi. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. *Phytopathology* 78(6):868-872.
5. Islam, M. Sh., Q.S.A. Jahan, K. Bunnarith, S. Viangkum y S.D. Merca. 2000. Evaluation of seed health of some rice varieties under different conditions. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41:293-297.
6. Kuan, L.T. 1988. Inoculum Thresholds of Seedborne Pathogens. Symposium Presented at the 76th Annual Meeting of the American Phytopathological Society. University of Guelph, Ontario. August. *Phytopathology* 78(6):867-868.
7. Manandhar, H.K., H.J.L. Jorgensen, V. Smedegaard-Petersen y S.B. Mathur. 1998. Seedborne infection of rice by *Pyricularia oryzae* and its transmission to seedlings. *Plant Dis.* 82:1093-1099.
8. Mia, M.A.T., K.M. Safeeulia y H.S. Shetty. 1986. Seedborne nature of *Gerlachia oryzae*, the incitant of leaf scald of rice in Karnataka. *Indian Phytopathology* 39: 92-93.
9. Muñoz, J.A. y M. Gamboa. 1998. *Introducción al manejo integrado de enfermedades fungosas en arroz*. Publi Offset M.L.C.A. Cagua-edo. Aragua. 95 p.
10. Ou, S.H. 1985. *Rice Diseases*. 2nd. Ed. Commonw. Mycol. Inst., Kew, England.
11. Pacheco, C. 1989. Importancia de la patología de semillas para los programas de semillas. *Fitopatología Colombiana*. Vol. 13:20-30.
12. Pandey, V., V.K. Agarwal y M.P. Pandey. 2000. Location and seed transmission of fungi in discoloured seeds of hybrid rice. *Indian Phytopathology* 53(1): 45-49.
13. Rodríguez, H.A. y H. Nass. 1990. Las enfermedades del arroz en Venezuela. En: *El arroz en Venezuela*. Alcance Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. No. 39: 130-134.
14. Singh, K. y S.B. Mathur. 1992. Further evidence of transmission of *Sarocladium oryzae* through rice seeds and its quarantine significance. *Indian Phytopathology* 45:454-456.
15. *Statistical Package for the Social Sciences*. Programa Estadístico SPSS for Windows versión 11.5.
16. Von Arx, J.A. 1974. *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. J. Cramer Edit. Germany. 315 p.