

PRIMER REPORTE DE *SCLEROTIUM ROLFSII* COMO AGENTE CAUSAL DE LA PUDRICIÓN DEL TALLO Y LA MAZORCA DEL MAÍZ EN PORTUGUESA, VENEZUELA

Alex González, Natalia Labrín, Venancio Barrientos y Jesús Alezones

Fundación para la Investigación Agrícola Danac, San Javier, estado Yaracuy, Apartado postal 182, San Felipe, Venezuela.

Recibido: 27 de abril de 2007

Aceptado: 20 de abril de 2008

RESUMEN

González, A., Labrín, N., Barrientos, V. y Alezones, J. 2008. Primer reporte de *Sclerotium rolfsii* como agente causal de la pudrición del tallo y la mazorca del maíz en Portuguesa, Venezuela. Fitopatol. Venez. 21:23-26

En siembras comerciales de maíz localizadas en Ospino, estado Portuguesa, se observaron plantas con lesiones irregulares de color marrón en el tallo, asociadas con micelio blanco y esclerocios redondeados. El objetivo de esta investigación fue identificar el agente causal de la sintomatología descrita mediante pruebas culturales, patogenicidad e histología. Los esclerocios colectados fueron desinfectados con NaClO al 1%, sembrados en medio PDA e incubados durante ocho días a 22 °C y luz continua. Plantas de maíz de 18 días después de la siembra fueron inoculadas en la base de la segunda hoja con discos de micelio y esclerocios de ocho días. Cuatro días después de la inoculación, la mayoría de las plantas mostraron lesiones color marrón claro en el tallo, subsecuentemente mostraron pudrición y muerte, lo cual se correspondía con la sintomatología observada en campo. Las plantas sobrevivientes formaron esclerocios redondeados color marrón sobre la vaina y la lesión alcanzó la mazorca a los 60 días después de inoculadas. Tejido del tallo infectado fue fijado en Osmio 2%, deshidratado gradualmente con series de etanol e incluido en resina, donde se realizaron cortes gruesos para observar al microscopio de luz. Se observó la penetración de hifas, tejido necrosado y formación de cristales de calcio. Los esclerocios reaislados en PDA desarrollaron un micelio blanco, algodonoso, hialino, septado y ramificado que produjo esclerocios redondeados de color castaño. Los resultados de la prueba de patogenicidad, cultural e histología se corresponden con *Sclerotium rolfsii* Sacc., hongo pocas veces señalado como patógeno de maíz.

Palabras clave adicionales: *Athelia rolfsii*, *Zea mays*, oxalato de calcio, patogénesis.

ABSTRACT

González, A., Labrín, N., Barrientos, V. and Alezones, J. 2008. First report of *Sclerotium rolfsii* causal agent of stem and ear rot of maize in Portuguesa, Venezuela. Fitopatol. Venez. 21:23-26

In maize commercial fields located at Ospino, Portuguesa state, Venezuela, were observed plants with irregular brown lesions in the stem associated with white mycelium and round sclerotia. The aim of this research was to identify the causal agent of the described symptoms through cultural test, pathogenicity and histology. The collected sclerotia were disinfected with 1% NaClO, plated on PDA and incubated during 8 days at 22 °C under continuous light. Maize plants of 18 days after sowing were inoculated in the base of the second leaves with plugs of mycelium and sclerotia of eight days. Four days after the inoculation most plants showed light brown lesions in the stem that later turned rot and dead, as observed in maize fields. The survivor plants formed round brown sclerotia on the sheath and the lesions reached the ear about 60 days after inoculation. Infected stem tissue were fixed in 2% Osmio, gradually dehydrated with ethanol series and included in resin to make thick cuts that were observed in the light microscopy. Penetration of hyphae, necrotic tissue and crystals of calcium were seen. The reisolated sclerotia in PDA developed a white branched cottony mycelium, hyaline, with septum, that produced round brown sclerotia. The results of pathogenesis, cultural and histological test correspond with *Sclerotium rolfsii* Sacc., fungus few times reported as pathogen in maize.

Additional Keys word: *Athelia rolfsii*, *Zea mays*, calcium oxalate, pathogenesis.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, el maíz es el cereal más importante por la superficie cosechada y el consumo *per capita*; su producción se concentra principalmente en los llanos centrales y occidentales de Guárico, Portuguesa y Barinas, los valles intermontanos bajos de Yaracuy y los llanos orientales de Monagas, Anzoátegui y norte del estado Bolívar (8). Para el año 2006, la producción total fue de 2,37 millones de tons con un rendimiento promedio de 3,35 tons/ha (7).

Sclerotium rolfsii (teleomorfo: *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough es un hongo habitante del suelo, fitopatógeno, polífago (17), cuya lista de hospedantes en 1931 incluía 189 especies distribuidas en 42 dicotiledóneas y 8 monocotiledóneas (3). Actualmente se conocen más de 500 especies de plantas que son infectadas por el hongo (6), la mayoría de ellas pertenecientes a las dicotiledóneas y con menor frecuencia en monocotiledóneas, manteniéndose aún la proporción original (9). Su distribución es mundial, particularmente en la región tropical y subtropical (2).

En maíz, el hongo *S. rolfsii* produce la pudrición de la mazorca. Esta enfermedad fue señalada por primera vez por Satyabrata en 1978 (21), en Shillong, India, durante el Monzón de 1977 cuando las condiciones de humedad y calor favorecieron la dispersión de la enfermedad en todas las variedades sembradas, las cuales presentaron el mismo grado de susceptibilidad, causando la infección de más del 25% de las mazorcas junto con el hongo *Corticium sasakii* (20). Después, se identificó a *S. rolfsii* afectando siembras comerciales de maíz en Pakistán, durante la temporada del Sharif (cosecha recolectada en invierno) en 1983, y al igual que en India el hongo se presentó bajo condiciones de alta humedad y calor causando pérdidas significativas (1).

En maíz, el hongo puede causar diversos tipos de daños, hasta ver frustrada la pre y post-emergencia de las plántulas, provocada por un collar de micelio con esclerocios alrededor del tallo. En las hojas se presentan manchas y en las mazorcas micelio color rosado salmón que posteriormente se torna gris pálido. Un reporte señala que los granos de la mazorca presentan pudrición y un color blanquecino (21).

Con relación a la patogénesis de *S. rolfii* diversos estudios señalan que el hongo produce ácido oxálico, cuya principal función es el secuestro del calcio de las células dando lugar a la formación de cristales de oxalato de calcio (5, 14, 22), posteriormente se producen enzimas degradativas del tejido tales como poligalacturonasa (11, 15, 22), manasa (19) y dehidrogenasa celobiosa (4).

El objetivo de este trabajo fue identificar mediante pruebas culturales, patogénicas e histológicas el agente causante de la pudrición del tallo del maíz observado en siembras comerciales de maíz en el estado Portuguesa. La misma estuvo relacionada con la producción de esclerocios muy uniformes en forma, tamaño y color, que lo diferenciaban de otras estructuras de resistencia o sobrevivencia producidas por otros basidiomicetos, que causan la pudrición de la mazorca del maíz, tales como *Rhizoctonia solani* (12).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras. En siembras comerciales de híbridos de maíz en la Finca Yaguarita (239 msnm, 09°26'36.7"N y 69°20'55.3"O) y La Coromoto (203 msnm, 09°21'56.3"N y 69°23'56.0"O), en el sector Ospino del estado Portuguesa, se colectaron tallos de plantas de maíz que presentaban lesiones de forma irregular color marrón claro a oscuro, relacionadas con la presencia de micelio blanco y esclerocios redondeados blanquecinos a castaño claro.

Aislamiento, purificación y características culturales. Los esclerocios colectados fueron desinfectados en hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% por 10 min, luego se lavaron por 5 min en agua destilada y por último 5 min con agua destilada estéril. Posteriormente los esclerocios se sembraron en medio papa dextrosa agar (PDA) y fueron incubados durante 8 d a 22 °C y luz continua. Se observaron las características de las colonias directamente sobre los platos de PDA (color, formación de esclerocios), también se observó el micelio al microscopio de luz, tiñéndolo con Azul de Toluidina.

Prueba de patogenicidad. En suelo estéril, se sembraron 26 semillas de cada una de las líneas CML-446 y F04-12. Dieciocho plantas por línea (18 d) se inocularon en la segunda hoja ascendente, con discos de medio (5 mm) colonizado con micelio y esclerocios jóvenes, dejando como testigo ocho plantas de cada línea, las cuales fueron inoculadas con discos de PDA únicamente. Todas las plantas se mantuvieron en cámara húmeda durante 8 d a 30,73 °C y una humedad relativa (HR) de 71,33%. Doce días después de la inoculación (ddi), las plantas se cambiaron a un invernadero que presentaba una temperatura de 28,4 °C y 91% HR, promedios.

Pruebas histológicas. Con la finalidad de incluir tejido sano y enfermo en bloques de resina, se inocularon nuevamente 15 plantas de maíz siguiendo la metodología anterior. A los siete días se tomaron porciones de tejido sano e inoculado que fueron pre-fijados en Glutaraldehído 2%, fueron lavados con tampón fosfato pH 7,0 fijados con Osmio (OSO₄) al 2%, deshidratados gradualmente con series de etanol hasta llegar al 100% de concentración y punto crítico de secado. Posteriormente el tejido se infiltró con cambios seriados de gradientes de resina y propileno, iniciando con propileno al 100% hasta llegar a la resina pura y se mantuvieron en estufa

durante 48 h a 60° C. Luego se realizaron cortes gruesos (2 µm) con el Ultramicrotomo Sorvall MT2-B (Dupont, USA) y finalmente se tiñeron los cortes con Azul de Toluidina para realizar observaciones al microscopio de luz.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de patogenicidad. A los cuatro ddi, la totalidad de las plantas inoculadas con el hongo, tanto de CML-44 como de F04-12, mostraron una lesión inicialmente de forma alargada color marrón claro. A los ocho ddi, las lesiones se tornaron irregulares de color marrón oscuro, presentaron pudrición y necrosis en la base del tallo provocando la muerte de 30/36 plantas (Fig.1A). Las seis plantas restantes, que fueron trasladadas al invernadero, presentaron marchitez y clorosis en las hojas bajas. A los 21 ddi, se desarrollaron esclerocios redondeados color marrón sobre la vaina (Fig. 1B) y 60 ddi las lesiones alcanzaron la mazorca provocando la pudrición de la misma y fallas en el llenado del grano. Las líneas probadas fueron afectadas de igual manera. Las plantas inoculadas solo con medio PDA no presentaron ningún síntoma durante el ensayo.

Características culturales. Los esclerocios formados en las plantas inoculadas fueron desinfectados y sembrados nuevamente en medio PDA, en donde se desarrolló un micelio blanco (2-5 mm diám), de aspecto algodonoso, septado, hialino, ramificado con fibulas. Esclerocios redondeados comenzaron a formarse 5 días después de la siembra (dds), inicialmente como pequeños granitos blancos y 8 dds se tornaron color marrón de aproximadamente 1-2 mm diám (Fig. 1C).

Pruebas histológicas. Los resultados de las prueba de patogenicidad aplicada para el hongo *S. rolfii* en maíz resultaron positivos, lo cual coinciden con lo señalado por la literatura mundial (1, 11, 16). Durante la prueba de patogenicidad (Fig. 1A) se observaron plantas con maceración de tejido y colapso del mismo cerca del punto de inoculación. La sintomatología observada fue muy parecida a la producida por otros basidiomicetos como *Rhizoctonia solani* Kühn bajo condiciones experimentales o naturales de alto nivel de inoculo o infección, el cual puede ocasionar la muerte prematura de plantas cuando el cultivo de maíz es afectado a temprana edad o en etapa de establecimiento (12).

Cuando la planta logró sobrevivir, fueron observadas manchas en la vaina y en la hoja, donde se produjeron una gran cantidad de esclerocios que fueron madurando sobre el tejido afectado. Estos síntomas pueden confundirse con la mancha bandeada del maíz producida por *Rhizoctonia solani* (12). En etapas más tardías, la mazorca manifestó síntomas de pudrición, lo cual ha sido señalado por otros autores (10). Rago *et al.* (17) realizaron un estudio *in vitro* para determinar el efecto de los residuos de cosechas de pasto (*Eragrostis curvula*), trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), avena (*Avena sativa* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), soya (*Glycine max* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), maní (*Arachis hypogaea* L.) y maíz sobre la producción de esclerocios por *S. rolfii*, y determinaron que en maíz la producción de esclerocios fue máxima y la germinación de estos fue superior al 70%. Los resultados del trabajo citado indican que los restos de cosecha del maíz pueden ser un sustrato óptimo para



Fig. 1. A. Síntomas de pudrición en la base del tallo, con maceración de tejido, bajo condiciones de umbráculo. B. Lesiones irregulares color marrón claro a oscuro y pudrición de la base del tallo, esclerocios formados en la vaina 21 ddi, en plantas sobrevivientes en umbráculo. C. Gran cantidad de esclerocios redondos, muy definidos, de color marrón claro a castaño oscuro en estado de maduración, producidos en medio Papa Dextrosa Agar, a los 8 dds del reaislamiento.

la sobrevivencia del hongo, induciendo a la producción de esclerocios; de esta manera el patógeno puede permanecer viable hasta la siembra posterior o por largos periodos (13).

Rai *et al.* (18), en un estudio sobre la micoflora y germinación en semillas de maíz realizado en India, detectaron una alta incidencia de *S. rolfsii*, *Fusarium moniliforme*, *Verticillium albo-atrum*, *Trichoderma harzianum*, y *Botryodiplodia theobromae* en las semillas. Sin embargo, Sarma y Singh (20) en un estudio realizado para evaluar la respuesta de algunos cultivos comunes a *S. rolfsii*, no lograron infectar maíz con ninguno de los 16 aislados probados.

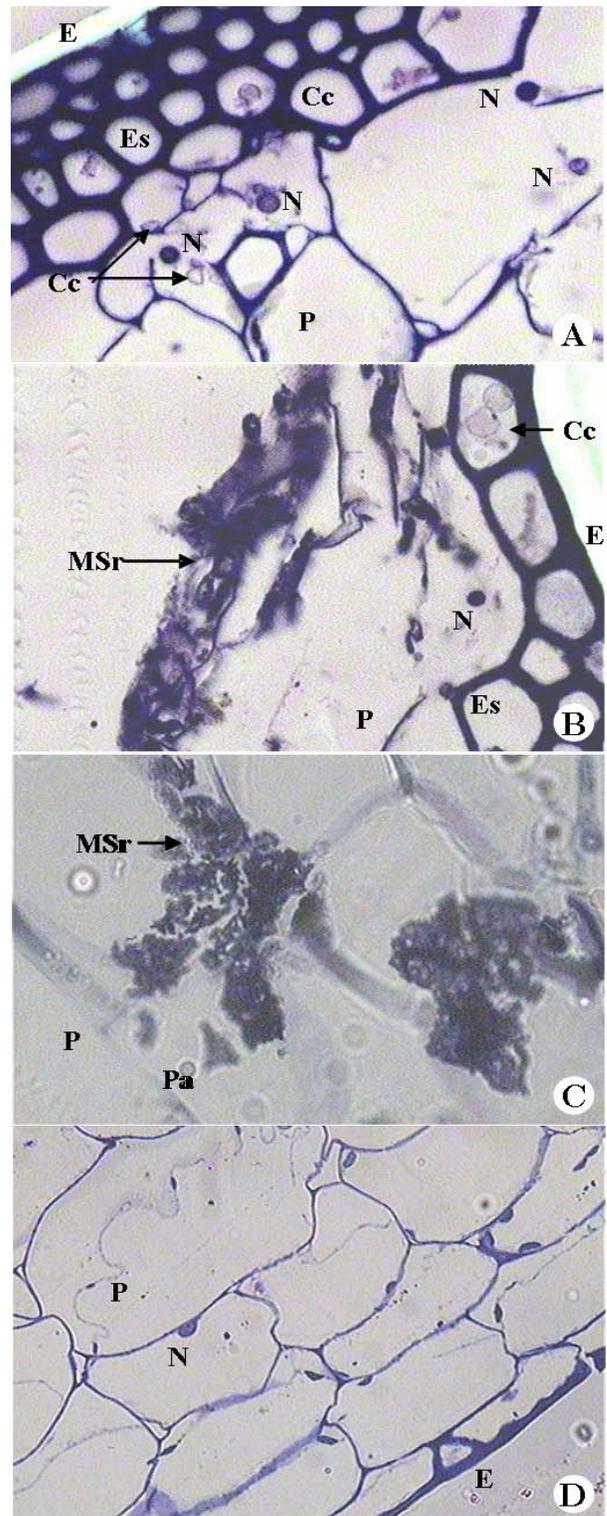


Fig. 2. A. Corte transversal de tejido infectado de maíz (100X), en estado poco avanzado de la infección por *S. rolfsii*. En general, se observan las estructuras celulares poco afectadas como la epidermis (E), el esclerenquima (Es), varios núcleos (N), parénquima (P) y la formación de pequeños cristales de calcio (Cc). B. Corte transversal de tejido infectado (100X), estado más avanzado de la infección, gran parte de las estructuras celulares han perdido su integridad, se observan los cristales de calcio más densos, y los agregados de micelio de *S. rolfsii* (MSr) invadiendo el espacio intercelular e intracelular. C. Corte longitudinal de tejido infectado (100X), estado medio de infección donde se observa el MSr, invadiendo el espacio intercelular, ocurre el debilitamiento de la pared celular (Pa) y el subsiguiente lisado de la célula. D. Corte longitudinal de tejido sano (40X), perteneciente al testigo, donde se observan las estructuras celulares intactas.

Las características del reaslamiento del hongo en cuanto a color, forma, crecimiento micelial y formación de esclerocios concuerda con los descritos para *Sclerotium rolfsii* en estudios realizados por otros autores (13).

Mediante el microscopio de luz (40X) se observó en los cortes transversales (Fig. 2A, 2B) y longitudinales (Fig. 2C) la penetración del micelio del hongo y daños causados a nivel celular. Se destaca la formación de cristales de oxalato de calcio y la desintegración de las paredes celulares producto de la acción de enzimas degradativas de la pared celular, mientras que en el tejido del testigo las células mantuvieron su integridad (Fig. 2D).

No existen registros de estudios histológicos sobre tejidos de maíz infectados por *S. rolfsii*. No obstante, se han realizado estudios del daño producido a nivel celular en tejidos de hoja de remolacha azucarera, hipocotilos de caraota y en raíces y pecíolos de zanahoria (26), en los que se observó la coalescencia de hifas y la agregación de micelios que funcionaban como un cojín de infección. Los cristales de oxalato de calcio formados fueron asociados con estos agregados y con la hifa individual que crecía sobre la superficie del hospedero. En el tejido de maíz infectado usado en este trabajo, también se observó el mismo tipo de agregado en los cortes transversales (Fig. 2B, 2C), así como la formación de cristales de oxalato de calcio (Fig. 2A, 2B), lo que evidencia indirectamente la producción del ácido oxálico por el hongo (5, 15, 22), el cual actúa en el secuestro del Ca, causando el debilitamiento de la estructura de la pared celular para facilitar el proceso de penetración.

De acuerdo a lo señalado por la literatura (22) y los resultados observados en los cortes histológicos, se presume que en el proceso infectivo la penetración ocurrió a través de la formación del apresorio en la punta de la hifa individual seguido del colapso de las células debajo del cojín de infección. La cutícula aparentemente no fue disuelta, pero fue empujada hacia el interior con la epidermis, y el subsiguiente crecimiento micelial ocurrió inter e intracelularmente. Algunos de los eventos descritos en el trabajo citado concuerdan con los observados en la figura 2B.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que *Sclerotium rolfsii* produce la mancha de la vaina, la pudrición del tallo y de la mazorca del maíz. Esta información constituye el primer reporte de la enfermedad en Venezuela. Los resultados del estudio cultural e histológico se corresponden con la infección causada por el patógeno en otros cultivos. El patógeno forma esclerocios redondeados típicos, que lo permiten diferenciarse de otros basidiomicetos que producen enfermedades de importancia en el país.

LITERATURA CITADA

- Ahmad, Y., Siddique, M. and Aslam, M. 1984. *Sclerotium rolfsii* on maize. FAO Plant Protection Bulletin 32: 147.
- Almeida, A., Abdelnoor, R., Calvo, E., Tessman D. and Yorinori, J. 2001. Genotypic diversity among brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. Journal of Phytopathology 149: 493-502.
- Aycock, R. 1961. Symposium on *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 51: 107-127.
- Baminger, U., Subramaniam, S., Renganathan V. and Haltrich, D. 2001. Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase from the plant pathogen *Sclerotium (Athelia) rolfsii*. Applied and environmental microbiology 67: 1766-1774.
- Bateman, D. and Beer, S. 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 55: 204-211.
- Cilliers, A., Herselman, L. and Pretorius, Z. 2000. Genetic variability within and among mycelial compability groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. Phytopathology 90: 1026-1031.
- FAOSTAT. 2008. Crops (en línea). Roma. Consultado 23 de abr. 2008. Disponible: <http://faostat.fao.org/site/567/desktopDefault.aspx?PageID=567>
- Fontana, H. y González, C. 2000. El cultivo del maíz en Venezuela. Fundación Polar, Caracas. pp. 363-372.
- Harlton C., Lévesque C. and Punja, Z. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. Phytopathology 85: 1269-1281.
- McGee, D. 1988. Maize Diseases. APS Press. St. Paul, Minnesota. pp. 73-74.
- Ohazurike, N. and Arinze, A. 1992. The action of polygalacturonase enzyme of *Sclerotium rolfsii* on some tuber crop tissues. Fitopatologia Brasileira 17: 393-398.
- Perdomo, R., Hernández, A., González, A., Pineda, J. y Alezones, J. 2007. Caracterización y evaluación de la virulencia de 25 aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn causante de la mancha bandeada en maíz. Inter ciencia 32: 48-55.
- Punja, Z. 1985. The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. Annual Review of Phytopathology 23: 97-127.
- Punja, Z. and Jenkins, S. 1984. Ligth and scanning electron microscopic observation of calcium oxalate crystals produced during growth of *Sclerotium rolfsii* in culture and in infected tissue. Canadian Journal of Botany 62: 2028-2032.
- Punja, Z., Huang, J. and Jenkins, S. 1985. Relationship of mycelial growth and production of oxalic acid and cell wall degrading enzymes to virulence in *Sclerotium rolfsii*. Canadian Journal of plant pathology 7: 109-117.
- Punja, Z., and Sun, L. 2000. Genetic diversity among mycelial compability groups of *Sclerotium rolfsii* (Teleomorph *Athelia rolfsii*) and *S. delphinii*. Mycological Research 105: 537-546.
- Rago, A., March, G. and Marinelli, A. 1997. Effect of plant residues on sclerotial production by *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 32: 121-125.
- Rai, V., Lokesh, S., and Ayub, K. 2002. Ocurrance and management of some seedborne fungal pathogens of maize and sorghum *in vitro*. Seed Research 30: 112-117.
- Sachslehner, A., Haltrich, D., Gübitz, G., Nidetzky, B. and Kulbe, K. 1998. Efficient production of mannan-degrading enzymes by the basiosiomycete *Sclerotium rolfsii*. Applied Biochemistry and Biotechnology 70: 939-953.
- Sarma, B. and Singh, U. 2002. Response of some common crop to *Sclerotium rolfsii* infection. New Agriculturist 13: 1-4.
- Satyabra, M. 1978. Two new rots of maize from India. Plant Disease Reporter 62:1074-1076.
- Smith, VL., Punja Z. and Jenkins, S. 1986. A histological study of infection of host tissue by *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 76: 755-759.