

SCLEROTIUM HYDROPHILUM EN ARROZ EN VENEZUELA

Luis Cedeño^{1,2}, Herman Nass³, Chrystian Carrero¹, Reynaldo Cardona³, Humberto Rodríguez³
y Luis Alemán³

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Apartado 77 (La Hechicera), Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A,

²Centro de Microscopía Electrónica, Apdo. 167, Universidad de los Andes, Mérida 5101-A, E-mail: lurace@telcel.net.ve y

³Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Portuguesa- Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP), Apartado 102, Acarigua, Venezuela

Recibido: 20 de Marzo de 1997

RESUMEN

Cedeño, L., Nass, H., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H. y Alemán, L. 1997. *Sclerotium hydrophilum* en arroz en Venezuela. Fitopatol. Venez. 10:9-12.

Sclerotium hydrophilum fue aislado de plantas de arroz (*Oryza sativa*) que presentaban pequeñas lesiones de color castaño-oscuro y esclerocios negros en la vaina foliar. Comúnmente el hongo se encontró en plantas atacadas por *Rhizoctonia solani* AG-1-IA ("añublo" de la vaina) y *R. oryzae-sativae* ("mancha agregada" de la vaina). En papa-dextrosa-agar el hongo formó colonias blancas de crecimiento rápido (1,3 cm/d) y produjo una gran cantidad de esclerocios que comenzaron a formarse 4 d después de la siembra. Los esclerocios se observaron pequeños, globosos, superficiales, individuales y tenían los tejidos diferenciados en médula y corteza. Las hifas presentaron grosor promedio de 4,5 (3-6) µm y con la tinción HCl-Giemsa se comprobó que estaban constituidas por células binucleadas. Los esclerocios midieron 559 (365-749) x 514 (336-672) µm e inicialmente son blancos, luego marrón-rojizos y posteriormente marrón-oscuros a negros. En las imágenes de microscopía electrónica de transmisión, el aparato del poro septal presentó las características típicas de la estructura dolipora de los Holobasidiomicetos y la pared de células que conforman la capa esclerocial más externa se apreció llena y rodeada por una sustancia de elevada densidad electrónica y aspecto semejante al de la melanina. En el microscopio electrónico de barrido las células de la superficie esclerocial se observaron ligeramente infladas. Inoculaciones realizadas en plantas de arroz 'Cimarrón', por aplicación de esclerocios entre la vaina y el tallo, produjeron síntomas similares a los observados en el campo. *S. hydrophilum* fue aislado consistentemente de las plantas infectadas experimentalmente, confirmando los postulados de Koch.

Palabra clave adicional: *Oryza sativa*

ABSTRACT

Cedeño, L., Nass, H., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H. and Alemán, L. 1997. *Sclerotium hydrophilum* on rice in Venezuela. Fitopatol. Venez. 10:9-12.

Sclerotium hydrophilum was isolated from rice plants (*Oryza sativa*) displaying small dark-brown lesions and black sclerotia on the leaf sheath. The fungus commonly was found on plants attacked by *Rhizoctonia solani* AG-1-IA (sheath blight) and *R. oryzae-sativae* (aggregate sheath spot). On potato-dextrose-agar the fungus produced fast-growing white colonies (1.3 cm/day) and abundant globose sclerotia, whose tissues were differentiated into medulla and cortex. The hyphae possessed an average diameter of 4.5 (3-6) µm and the somatic cells were binucleated when stained with HCl-Giemsa. Sclerotia development began 4 days after the inoculum was placed on PDA, and measured 559 (365-749) x 514 (336-672)µm. Sclerotia were initially white, later turning reddish-brown, and then dark-brown to almost black. In transmission electron microscope images, the septal pore apparatus showed the same dolipore configuration of Holobasidiomicetes whose cap is characteristically perforated, and the outer sclerotial cells showed cell walls filled and surrounded by a highly electron dense melanine-like substance. In the scanning electron microscope, the sclerotial surface appeared conformed by inflated cells. When inoculated on plants of rice 'Cimarrón', the fungus produced symptoms similar to those observed in the field. *S. hydrophilum* was continuously isolated from experimentally infected plants, confirming the Koch's postulates.

Additional key word: *Oryza sativa*

INTRODUCCIÓN

Durante diagnósticos de rutina realizados en mayo de 1994 por los fitopatólogos del Centro de Investigaciones Agropecuarias Portuguesa del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP), a partir de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) que presentaban lesiones pequeñas de color castaño-oscuro y esclerocios negros en la vaina foliar, se aisló consistentemente un hongo que en papa-dextrosa-agar (PDA) produjo esclerocios con el tejido diferenciado en médula y corteza. Estos esclerocios se apreciaron idénticos a los observados en el campo. Comúnmente el hongo fue encontrado en plantas con infecciones de "añublo" y de "mancha agregada" en la vaina, cuyos agentes causales son *R. solani* AG-1-IA y *R. oryzae-sativae* (Saw.)Mordue (16), respectivamente. Dos

hongos que forman esclerocios diferenciados en médula y corteza, han sido asociados con enfermedades que atacan la vaina foliar del arroz y son: *Sclerotium oryzae* Catt., estado esclerocial del ascomiceto *Magnaporthe salvinii* (Catt.) Krause & Webster (= *Leptosphaeria salvinii* Catt.), el cual también posee una fase conidial llamada *Nakatea sigmoideum* (Cav.) Hara [= *Vakrabeeja sigmoidea* (Cav.) Subram.] (16) y *Sclerotium hydrophilum* Sacc. (10), cuyo estado teleomórfico es un Basidiomiceto de identidad aún desconocida (11). De los tres estados de *M. salvinii*, el esclerocial es el que se presenta con mayor regularidad en el campo, causando lesiones negras en la vaina foliar y, eventualmente, pudrición en el tallo (16).

El presente estudio fue realizado con el propósito de determinar el hongo y evaluar su patogenicidad. Un reporte preliminar fue publicado en forma de resumen (1).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento. Para aislar el patógeno se utilizaron fragmentos de tejidos (ca 2 mm²) cortados del margen de lesiones existentes en la vaina foliar. Las muestras fueron tratadas por 1 min con solución 0,5 % de hipoclorito de sodio, lavadas tres veces con agua destilada estéril y sembradas asépticamente en placas de agar-agua 2%. Las placas se incubaron a temperatura normal de laboratorio (22-24 °C). Los numerosos aislamientos obtenidos se purificaron por transferencias continuas de ápices hifales a placas de papa-dextrosa-agar (PDA), que se incubaron a 26 - 28 °C en la oscuridad.

Caracterización nuclear. Para cuantificar los núcleos en las células hifales, se utilizaron cultivos producidos en portaobjetos cubiertos con una capa fina de PDA, los cuales se incubaron durante 48 h, a 26 - 28 °C y completa oscuridad, en cápsulas de Petri con varilla de vidrio en forma de 'V' y papel filtro humedecido con agua destilada estéril. La tinción se realizó siguiendo el procedimiento HCl-Giemsa de Rogers (12).

Para examinar la estructura interna y externa de los esclerocios y la configuración del aparato del poro septal se utilizaron las técnicas de Microscopía de luz (ML), electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET).

Micelio. El material requerido se produjo cultivando el hongo durante 48-72 h sobre discos estériles de papel celofán (7 cm diám) depositados en la superficie de placas de PDA incubadas a 25 °C. Del margen de las colonias se cortaron discos (3 mm diám), que inmediatamente fueron fijados con formaldehído y glutaraldehído diluidos al 3 % en tampón cacodilato de sodio 0,1 M y pH 6,3; postfijados con tetróxido de Osmio 1 %, deshidratados en una serie gradual de alcohol etílico (30, 50, 70, 80, 95 y 100 %), tratados con acetona, incluidos en la resina de Spurr (15) e incubados en estufa a 60 °C hasta la polimerización. En un ultramicrotomo Sorvall Porter-Blum MT2B, con cuchilla de diamante, se hicieron cortes de 60-80 nm que posteriormente fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras fueron examinadas en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-300.

Esclerocios. Para los análisis con ML y MET se utilizaron esclerocios obtenidos de cultivos de 21 d en PDA, los cuales fueron procesados de la misma manera que el material micelial. En el ultramicrotomo se realizaron cortes de 2µm que posteriormente fueron teñidos con Azur II al 0,5 % en solución acuosa de bórax 1% y examinados en un microscopio Zeiss modelo Axioplan MC 80, para evaluar la organización de los tejidos. Para MEB se usaron esclerocios producidos por cultivos de 30 d en PDA, los cuales fueron secados al ambiente, colocados en portaespecímenes de aluminio, sombreados con Oro-Paladium y observados en un microscopio electrónico de Barrido Hitachi S-2500.

Inoculación y reaislamiento. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en plantas de arroz 'Cimarrón' de 60 d cultivadas en recipientes de plástico (3 Kg de capacidad). En la inoculación se usaron esclerocios producidos en PDA que se colocaron entre la vaina y el tallo. Inmediatamente después de la inoculación, las plantas se transfirieron a tinas (80 cm diám x 60 cm profundidad), que contenían una lámina de agua cuya superficie se ubicaba hasta 1 cm por encima del cuello de las plantas. Las plantas

se incubaron a 26-28 °C y se examinaron periódicamente para observar el desarrollo de la infección. A partir de los materiales inoculados se hicieron aislamientos para comprobar el cumplimiento de los postulados de Koch.

RESULTADOS

Aislamiento. En PDA el hongo produjo colonias blancas de crecimiento rápido (1,3 cm/d). Las hifas tuvieron un grosor promedio de 4,5 µm y su morfología se apreció semejante a la que caracteriza las especies de la forma-género *Rhizoctonia*. Las colonias comenzaron a formar esclerocios 4 d después de la siembra. Los esclerocios se apreciaron globosos, lisos, individuales y midieron 559 (365-749) x 514 (336-672) µm. Inicialmente son blancos, luego marrón-rojizos y posteriormente marrón-oscuros a negros. (Fig. 1A).

Caracterización nuclear. La tinción con HCl-Giemsa demostró que las células somáticas del hongo investigado son binucleadas.

Microscopía de luz (ML), electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET). En las imágenes de MET la estructura septal mostró las características típicas del tipo dolípora (Fig.1B, C) y muy pocas veces en una misma sección fina se observaron células con dos núcleos. En el aparato del poro septal se observaron claramente los sáculos que se originan por invaginación de la membrana plasmática; el tapón y el canal del poro, y la corona que a ambos lados del canal apareció constituida por dos unidades de membrana conformando una cisterna perforada y llena por una sustancia de elevada densidad electrónica. En las secciones de examinadas con ML, los tejidos esclerociales se observaron diferenciados en médula y corteza (Fig.1D). La médula apareció conformada por hifas abundantemente ramificadas e independientemente entrelazadas, mientras que la corteza se observó estructurada por células ligeramente infladas. Las células esclerociales más externas aparecieron rodeadas por una sustancia oscura. Los análisis de microscopía electrónica de transmisión revelaron que las células de la superficie esclerocial tenían las paredes llenas y rodeadas por una sustancia de alta densidad electrónica y aspecto semejante al de la melanina (Fig.1E). En el MEB las células de la superficie esclerocial se observaron infladas y densamente empaquetadas en una capa de contorno aparentemente irregular (Fig.1F).

Inoculación y reaislamiento. Las pruebas de patogenicidad realizadas en arroz 'Cimarrón', fueron positivas y produjeron síntomas similares a los observados en el campo. Inicialmente las lesiones se apreciaron de color amarillo-pálido y posteriormente castaño-oscuros.

DISCUSIÓN

En consideración a las características del crecimiento *in vitro*, la morfología, anatomía y tamaño de los esclerocios, y la naturaleza del aparato del poro septal, el hongo se identificó como *Sclerotium hydrophilum*, parásito débil con características de saprófito facultativo, de aparición frecuente en plantas acuáticas y semiacuáticas de las regiones templada y tropical (11). *S. hydrophilum* ha sido aislado de 19 géneros de plantas pertenecientes a seis familias monocotiledóneas y tres dicotiledóneas (4,11).

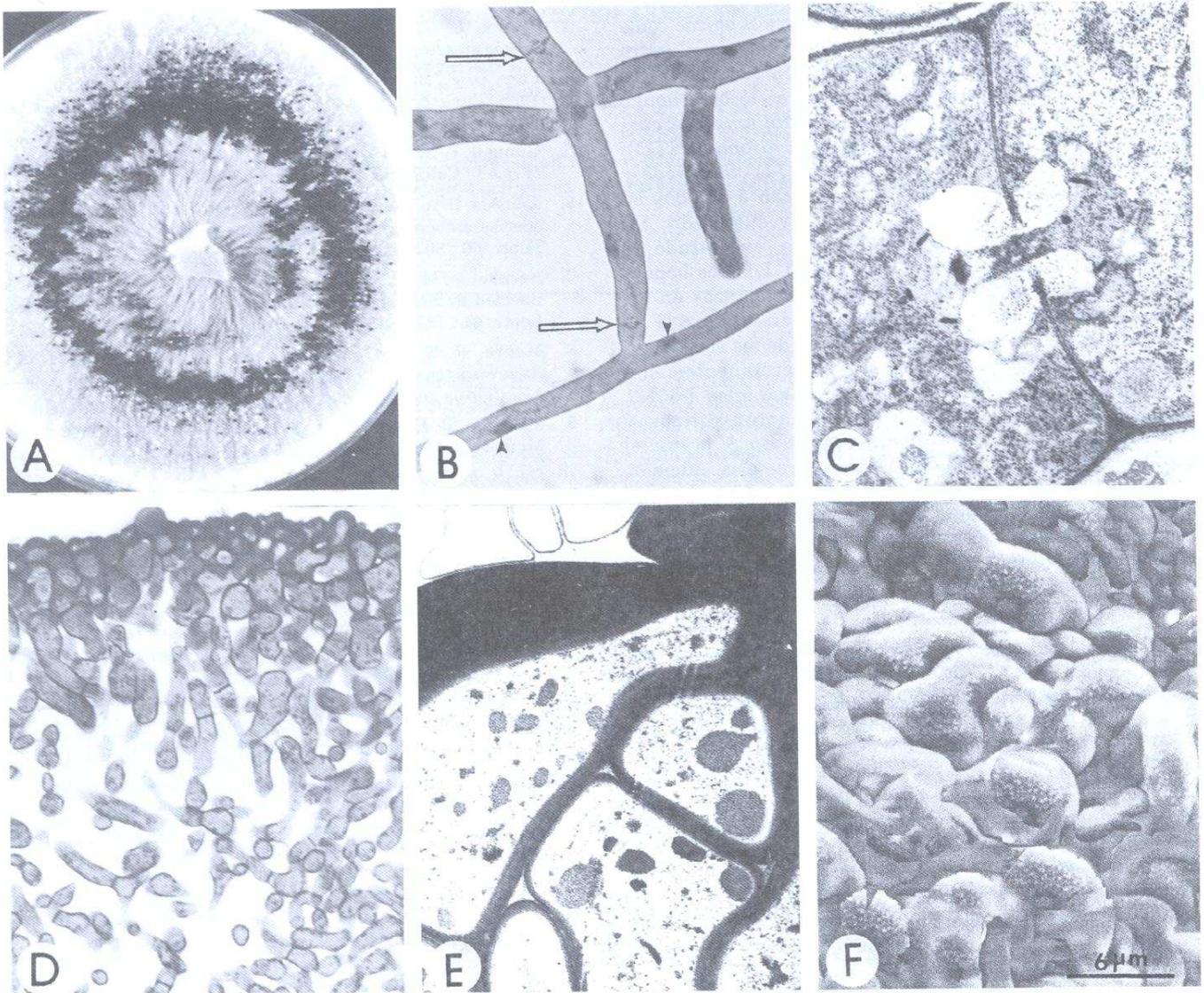


Fig. 1. *Sclerotium hydrophilum*. A) Cultivo en agar papa dextrosa. B) Núcleos (cabezas de flecha) y septos dolíporos (flechas) en hifas tratadas con HCl-Giemsa, X 1262,50. C) Septo dolíporo en imagen al microscopio electrónico de transmisión (MET), X 22500. D) Segmento de esclerocio mostrando los tejidos diferenciados en médula y corteza, X 130. E) Microfotografía al MET de la superficie esclerocial, X 22500. F) Células de la superficie esclerocial vistas en el microscopio electrónico de barrido.

La anatomía de los esclerocios coincidió con la descrita por Ou (10) y Punter, Reid y Hopkin (11) y en concordancia con lo reportado por Punter, Reid y Hopkin (11), los análisis ultraestructurales revelaron que el aparato del poro septal presenta la misma configuración que la estructura dolípora de los Holobasidiomicetos, cuya corona característicamente presenta perforaciones (8). Según Punter, Reid y Hopkin (11), *S. hydrophilum* pudiera ser ubicado en un lugar junto o a la par de hongos como *Ceratobasidium cornigerum*, el cual es reconocido como fase sexual de varias especies de *Rhizoctonia* binucleadas; sin embargo, ellos no investigaron la característica nuclear de las células somáticas. En el estudio que se reporta, la tinción con HCl-Giemsa reveló que las células hifales de *S. hydrophilum* son binucleadas, pero por el solo hecho de producir esclerocios diferenciados en médula

y corteza, se descarta una posible relación de afinidad con especies de *Ceratobasidium*. En *Rhizoctonia* la posesión de esclerocios diferenciados es excluyente (14).

Las pruebas de patogenicidad demostraron que *S. hydrophilum* causó infección en la vaina foliar del arroz 'Cimarrón', pero los daños ocasionados fueron leves y, aparentemente, carecen de importancia económica. Sin embargo, las opiniones con respecto a su patogenicidad son controversiales. Según Ou (10), Bernaux (2) y Shahjahan y Rush (13), *S. hydrophilum* es patógeno del arroz cultivado, mientras que Gunnell y Webster (5) manifestaron que no tuvieron éxito cuando realizaron inoculaciones con *S. hydrophilum* aislado de arroz atacado por "mancha agregada". Su capacidad patógena ha sido también comprobada en *Nymphaea odorata* (6) y *Zizania aquatica* (7).

En 1971, Morrison y King (9) reportaron a *S. oryzae* como el agente causal de pudrición en el tallo del arroz silvestre (*Z. aquatica*) en Minnesota, pero señalaron que en 5 de los 13 campos investigados igualmente se aisló otro hongo productor de esclerocios que llamaron *Sclerotium* sp., el cual posteriormente fue identificado como *S. hydrophilum* (11). De acuerdo a Punter, Reid y Hopkin (11), *S. oryzae* y *S. hydrophilum*, usualmente se presentan asociados en plantas enfermas de arroz silvestre y cultivado. En Venezuela, *S. oryzae* únicamente ha sido encontrado en arrozales de Calabozo, estado Guárico (3). Los dos hongos anteriormente mencionados presentan semejanzas en las tasas de crecimiento y diferencias en cuanto a la pigmentación del micelio y la anatomía de los esclerocios (11). En *S. hydrophilum* el micelio es permanentemente blanco, los esclerocios comienzan a formarse a los 4-5 d e inicialmente son blancos, luego marrón-rojizos y posteriormente marrón-oscuros a negros. En *S. oryzae* el micelio es primeramente blanco y más tarde gris. Además, la formación de esclerocios comienza 9-10 d después de la siembra, son primeramente blancos y más tarde negros. El tamaño de los esclerocios por sí solo no es un criterio confiable para la diferenciación de las dos especies, ya que el diámetro promedio de estas estructuras en algunos aislamientos de *S. hydrophilum* es similar al de *S. oryzae* (11).

LITERATURA CITADA

1. Cedeño, L., Nass, H., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H. y Alemán, L. 1995. *Sclerotium hydrophilum*, patógeno del arroz (*Oryza sativa* L.) en Venezuela. Revista Forestal Venezolana 1:70.
2. Bernaux, P. 1974. Deux champignons á sclerotes du riz en France (*Sclerotium oryzae* Catt. et *Sclerotium hydrophilum* Sacc.). Phytopath. medit. 13:116-117.
3. Garrido, M. J. y Malaguti, G. 1995. Ocurrencia de *Sclerotium oryzae* en arroz en Calabozo, Venezuela. Fitopatol. Venez. 8: 19.
4. Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P. and Roosman, A. Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. Am. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul Minnesota. 1252 pp.
5. Gunnell, P. S. and Webster, R. K. 1984. Aggregate sheath spot of rice in California. Plant Dis. 68: 529-531.
6. Johnson, D. A., Stewart, E. L. and King, T. H. 1976. A *Sclerotium* species associated with water lilies in Minnesota. Plant Dis. Repr. 60 : 807-808.
7. Kernkamp, M. F., Kroll, R. and Woodruff, W. C. 1977. Wildrice infected by *Sclerotium* sp. isolated from water lily. Plant Dis. Repr. 61 : 187-188.
8. Moore, R. T. 1987. The genera *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis* and *Rhizoctonia*. Mycotaxon 29 :91-99.
9. Morrison, R. H., and King, T. H. 1971. Stem rot of wildrice in Minnesota. Plant Dis. Repr. 55: 498-500.
10. Ou, S. H. 1972. Rice diseases. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 362 pp.
11. Punter, D., Reid, J., and Hopkin, A. A. 1984. Notes on sclerotium-forming fungi from *Zizania aquatica* (wildrice) and other hosts. Mycologia 76: 722-732.
12. Rogers, J.D. 1965. The conidial state of *Coniochaeta lignaria*. Morphology and cytology. Mycologia 57 : 368-378.
13. Shahjahan, A. K. M., and Rush, M. C. 1979. Occurrence and distribution of diseases caused by sclerotial fungi on rice in Louisiana. Plant Dis. Repr. 63: 220-223.
14. Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, St. Paul, Minnesota. 133 pp.
15. Spurr, A. R. 1969. A low viscosity resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26 : 31-43.
16. Webster, R. K. and Gunnell, P. S. 1992. Compendium of rice diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota. 62 pp.