

## NOTA TÉCNICA

# CARACTERIZACIÓN Y PATOGENICIDAD DE HONGOS DEL COMPLEJO *Helminthosporium* ASOCIADOS AL CULTIVO DEL ARROZ EN VENEZUELA

Reinaldo Cardona<sup>1</sup> y María Suleima González<sup>2</sup>

### RESUMEN

El arroz es un importante cereal en Venezuela, con una superficie cultivada de aproximadamente 200.000 ha. Las enfermedades causadas por los hongos del complejo *Helminthosporium* son consideradas una limitante importante en la producción. Hojas y semillas de arroz cv. INIA-017, provenientes de siembras en el estado Portuguesa fueron colocadas en placas con papel de filtro humedecido e incubado a  $26 \pm 2$  °C, en ambiente de laboratorio hasta la esporulación fúngica. Las esporas fueron transferidas a agar agua y una vez germinadas fueron transferidas a agar papa dextrosa, preservando las colonias hasta su utilización. Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas en plantas de arroz de 21 días de edad y se utilizaron cuatro plantas por bolsa por aislamiento. Antes de la inoculación, las plantas fueron colocadas en cámara humedad por 48 h y se inocularon con una suspensión de  $7 \times 10^4$  esporas·mL<sup>-1</sup>; las plantas del control fueron rociadas con agua destilada estéril, colocadas en cámara húmeda por 72 h y posteriormente llevadas a un umbráculo. De las hojas se aisló el hongo *Bipolaris oryzae* y de las semillas se aislaron los hongos *B. oryzae* y *Exserohilum rostratum*. Las plantas inoculadas mostraron síntomas de la enfermedad entre 5 y 7 días después de la inoculación y pudieron ser reaisladas de los tejidos enfermos, comprobándose así la capacidad patogénica de estos hongos.

**Palabras clave adicionales:** *Oryza*, *Bipolaris*, *Exserohilum*, semilla

### ABSTRACT

#### Characterization and pathogenicity of fungi of *Helminthosporium* complex associated to rice crop in Venezuela

Rice is an important cereal in Venezuela with approximately 200,000 ha cropping area. The diseases caused by the fungi of the *Helminthosporium* complex are considered an important constraint in the production of the crop. Leaves and seeds of rice cv. INIA-017 coming from Portuguesa State, Venezuela, were placed on a plate with moistened filter paper and incubated at  $26 \pm 2$  °C, in laboratory conditions until fungal sporulation. Single spores were transferred to agar water and, when germinated, transferred to potato dextrose agar, preserving the resultant colonies for later use. Pathogenicity tests were performed on 21-day-old rice plants and four plants per bag were used by isolation. Before inoculation, the plants were placed in humid chamber for 48 h and inoculated with a suspension of  $7 \times 10^4$  spore·mL<sup>-1</sup>; the control plants were sprinkled with distilled sterile water, placed in humid chamber for 72 h and taken to a greenhouse bench. The fungus *Bipolaris oryzae* was isolated from the leaves, and *B. oryzae* and *Exserohilum rostratum* from the seeds. The inoculated plants showed symptoms of the disease between 5 and 7 days after inoculation, and the fungi could be reisolated from the affected tissues, thus showing their pathogenic capacity.

**Additional key words:** *Oryza*, *Bipolaris*, *Exserohilum*, seed

### INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los principales cereales sembrado en Venezuela, pero a pesar de los incrementos en los rendimientos logrados como consecuencia del

uso de mejores técnicas agrícolas, también se ha incrementado la incidencia de las enfermedades, lo que ha traído como resultado la reducción de la calidad y cantidad de la cosecha (Fedegro, 2007). Entre estas enfermedades se encuentran las causadas por el complejo *Helminthosporium* en el

Recibido: Julio 9, 2007

Aceptado: Abril 1, 2008

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), CIAE Portuguesa. Apdo. 102. Araure, estado Portuguesa. Venezuela. e-mail: rcardona@inia.gob.ve

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), CENIAP. Apdo. 588. Maracay. Venezuela

que se incluyen varias especies de hongos que afectan raíz, tallo, hojas, panículas y granos del cultivo del arroz (Rodríguez et al., 1988). Entre los síntomas producidos en las hojas del arroz se incluyen lesiones pequeñas, circulares y de color marrón, mientras que en las vainas las lesiones ocurren en pequeños puntos ovales acuosos de color verde oliva con un halo amarillo (Ou, 1985).

El nombre genérico *Helminthosporium* es utilizado comúnmente en la literatura fitopatológica y fue originalmente propuesto como *Helmisporium*, pero luego fue cambiado a *Helminthosporium* (Sivanesan, 1987), conservándose este nombre hasta el presente.

Los géneros más importantes del complejo son *Drechslera*, *Bipolaris* y *Exserohilum*, y varias de sus especies son patógenos de plantas, particularmente del arroz. Se ha estimado que las pérdidas económicas causadas por este grupo de hongos pueden variar entre 40 y 90 % (Padmanabhan, 1973; Ojeda y Subero, 2004).

En Venezuela; sin embargo, no se han descrito las características para realizar una adecuada identificación de los hongos incluidos en el complejo *Helminthosporium* (Rodríguez et al., 1988; Ojeda y Subero, 2006). Por lo anterior, el presente trabajo se realizó con el fin de caracterizar morfológicamente y establecer la patogenicidad de cuatro aislamientos del complejo *Helminthosporium* obtenidos de un cultivar de arroz proveniente de la zona productora del estado Portuguesa, Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio y umbráculo del área de Protección Vegetal del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), en Maracay, Venezuela. Se evaluaron cuatro aislamientos obtenidos de hojas y semillas de arroz cultivar INIA-017, provenientes de siembras experimentales establecidas en el estado Portuguesa.

### Obtención de aislamientos

Se tomaron al azar 150 semillas al azar que fueron colocadas en seis cajas de Petri con papel de filtro estéril a razón de 25 semillas por caja. Se procedió a humedecer el papel con agua destilada estéril (ADE) y las cajas se dejaron en

observación hasta determinar el desarrollo de los hongos. Luego, con la ayuda de una lupa estereoscópica, se seleccionaron aquellos conidios que presentaron las características típicas del complejo *Helminthosporium*, y se colocaron esparcidos en cajas de Petri con agar-agua (AA), obteniéndose así los cultivos monospóricos (Tuite, 1969).

A partir de hojas de arroz con síntomas similares a los descritos e inducidos por especies del complejo *Helminthosporium* (Ou, 1985), se tomaron secciones de 8 cm de largo de tejido foliar sintomático y se sometieron a lavado con agua corriente por 2 h; luego se lavaron varias veces con ADE y se dejaron secar sobre papel de filtro estéril en una cámara de flujo laminar. Posteriormente, se procedió a colocar los trozos de hojas en cajas de Petri estéril con papel de filtro esterilizado y humedecido con ADE, para así crear una cámara húmeda. Las placas se incubaron en ambiente de laboratorio ( $25 \pm 1$  °C) hasta la observación de signos fúngicos. Luego se procedió al igual que para el caso del aislamiento a partir de semillas.

Los aislamientos obtenidos fueron preservados y se les indujo la esporulación de acuerdo con el método descrito por Cardona y González (2006).

### Caracterización morfológica de las estructuras fúngicas

Se observaron las estructuras fúngicas de valor taxonómico, tales como: morfología del hilum, número de septos y longitud de los conidios, así como las características de los conidióforos. Las estructuras fueron obtenidas tanto de medios de cultivos artificiales como de tejido vegetal infectado, para ello se usó una lupa estereoscópica y un microscopio óptico. La identificación se hizo con la ayuda de claves taxonómicas de los géneros *Bipolaris*, *Drechslera* y *Exserohilum* (Luttrell, 1963; Alcorn, 1983; Sivanesan, 1987).

### Inoculación

Los aislamientos preservados fueron reactivados colocando secciones de aproximadamente 2 cm de longitud del material seco en cajas de Petri con medio de papa-dextrosa-agar (PDA) esterilizado, dejándose incubar en el laboratorio hasta cubrir completamente la caja.

Para realizar la inoculación fueron sembradas dos semillas de la variedad de arroz Bluebonet 50 (susceptible) en cinco puntos dentro de bolsas de

propagación de 6 L de capacidad contentivas de suelo estéril y fertilizado con 15-15-15 a razón de 30 g por bolsa. Las plantas de 15 días de germinadas (ddg) fueron fertilizadas a razón de 1 g de urea por bolsa por semana.

Con la ayuda de un sacabocado previamente flameado, las plantas de 60 ddg, previamente colocadas en cámara húmeda por 48 h, fueron inoculadas con una suspensión de esporas de cada aislamiento a una concentración de  $7 \cdot 10^4$  esporas por mL. Una vez realizada la inoculación se procedió a cubrir las plantas con una bolsa plástica transparente para así crear una cámara húmeda por un período de 72 h; una vez transcurrido este tiempo se colocaron en umbráculo hasta la observación de síntomas.

#### Inoculación en secciones de hojas

De plantas de 45 ddg se tomaron hojas y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5 %. Luego, con la ayuda de una tijera previamente flameada, se cortaron en secciones de 5 cm de largo, colocando tres secciones por caja de Petri con AA. Con la ayuda de un sacabocado previamente flameado, se cortaron discos de 4 mm de diámetro del borde de colonias con 5 días de crecimiento en cajas de Petri con PDA, se colocaron cubriendo sólo la mitad del ancho de la lámina foliar de las secciones de hojas y se dejaron en ambiente de laboratorio.

#### Inducción de estado sexual

Se realizaron apareamientos entre los hongos aislados, colocando círculos de PDA con micelio de 24 h de crecimiento, en pares uno frente a otro en cajas de Petri contentivas de AA con cáscaras de arroz, previamente esterilizadas dos veces por un lapso de 1 h en autoclave. Las cajas de Petri se dejaron en ambiente de laboratorio por aproximadamente 40 días. Con la ayuda de una lupa estereoscópica, se realizaron observaciones periódicas para determinar la presencia de estructuras fúngicas. Los resultados se muestran en forma descriptiva y se presentan secuencias fotográficas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los diferentes sustratos se encontraron conidios de tipo obclavados a obclavados

rostrados, rectos o curvados, sub-hialinos a marrón con distoseptos transversales, lisos y redondeados a truncados en la base, con un hilum o cicatriz conspicua oscura. Por su parte, las características morfológicas de las estructuras fúngicas observadas en los cuatro aislamientos obtenidos de hojas y semillas de arroz fueron las siguientes:

**Aislamiento hoja:** Conidióforos simples, rectos, flexuosos, de color marrón siendo más claros hacia el ápice, lisos y septados. Los conidios algunas veces curvados, fusoides u obclavados, cilíndricos de color marrón, lisos con hilum oscuro diminuto. En medio PDA los conidios presentaron de 2-6 distoseptos y dimensiones de 30-68 x 12-14  $\mu\text{m}$ . En hojas de arroz o sustrato natural los conidios presentaron de 6-10 distoseptos y dimensiones de 63-121 x 12-17  $\mu\text{m}$ , conidios con germinación polar o bipolar (Figura 1).

**Aislamiento 1 de semilla:** Conidióforos y conidios similares a los descritos para el aislamiento de hoja. En medio PDA, los conidios presentaron de 3-9 distoseptos y dimensiones de 54-104 x 12-18  $\mu\text{m}$ . En hojas de arroz o sustrato natural los conidios presentaron de 6-12 distoseptos y dimensiones de 63-126 x 12-17  $\mu\text{m}$ , conidios con germinación polar o bipolar (Figura 1).

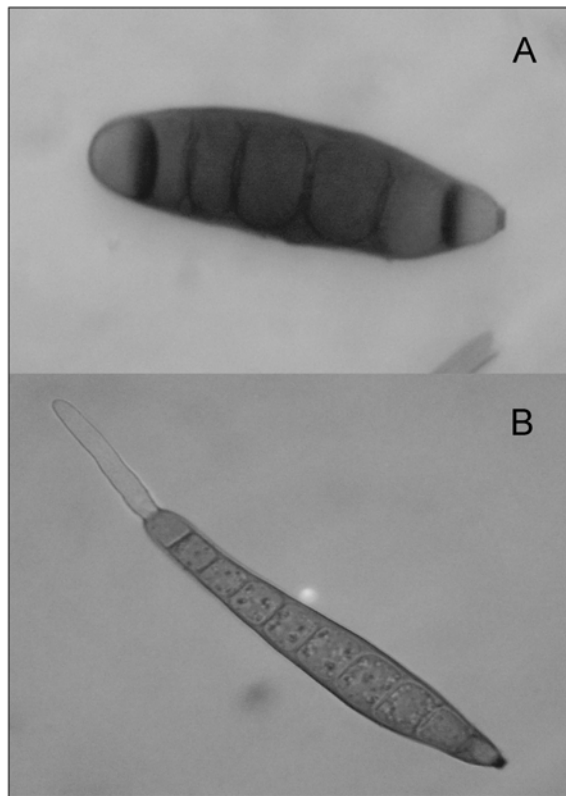


**Figura 1.** *Bipolaris oryzae*. A. Conidio con germinación polar. B. Conidio con germinación bipolar

**Aislamiento 2 de semilla:** Conidióforos y conidios similares a los descritos para el aislamiento de hoja.

En medio PDA los conidios presentaron de 6-9 distoseptos y dimensiones de 79-105 x 12-16  $\mu\text{m}$ . En hojas de arroz o sustrato natural los conidios presentaron de 6-11 distoseptos y dimensiones de 63-112 x 12-14  $\mu\text{m}$ , conidios con germinación polar o bipolar (Figura 1).

**Aislamiento 3 de semilla:** Conidióforos septados, cilíndricos, marrón, simples, geniculados. Conidios rectos a ligeramente curvos, elipsoides, obclavados o rostrados, de color marrón con pared gruesa excepto en una pequeña región hialina en el ápice y en el hilum. Septo basal más oscuro y grueso en comparación con los demás. Hilum oscuro, cilíndrico o truncado. En medio PDA los conidios presentaron de 3-9 distoseptos y dimensiones de 26-107 x 12-19  $\mu\text{m}$ . En hojas de arroz o sustrato natural los conidios presentaron de 6-12 distoseptos y dimensiones de 54-158 x 12-17  $\mu\text{m}$ . La germinación ocurrió en una región sub-hialina de la célula terminal y el tubo germinativo creció de forma semiaxial (Figura 2).



**Figura. 2.** *Exserohilum rostratum*. A. Conidio. B. Conidio con germinación polar, hilum protuberante

De acuerdo con las características morfológicas observadas y las claves taxonómicas los aislamientos en estudio resultaron ser *Bipolaris oryzae*, para los provenientes de hojas y semillas 1 y 2, y *Exserohilum rostratum* para el aislamiento de semilla 3 (Cardona y González, 2007).

La inoculación con los aislamientos evaluados en plantas de 21 ddg mostraron que los cuatro aislamientos indujeron síntomas. Las plantas inoculadas con *B. oryzae* mostraron síntomas 5 días después de la inoculación; las lesiones fueron manchas romboides pequeñas de color rojo-marrón con bordes amarillentos, luego éstas tomaron un color gris en el centro y rojizo en el borde. Las plantas inoculadas con *E. rostratum* mostraron síntomas a los 7 días después de inoculadas; las lesiones fueron elípticas color anaranjado-marrón a lo largo de las nervaduras, luego tomaron un color grisáceo con bordes rojizos. Ambos hongos fueron reaislados de los tejidos lesionados.

En la inoculación realizada en secciones de hojas, todos los aislamientos fueron capaces de inducir síntomas aunque no se pudo asociar un determinado síntoma con un determinado aislamiento.

Con respecto a la inducción del estado sexual, en todos los enfrentamientos pudieron observarse estructuras fúngicas conocidas como protoperitecios, pero sin formación de ascos, sobre las cáscaras de arroz. Esto pudiera estar asociado a la incompatibilidad de los aislamientos estudiados.

La inducción a la esporulación resultó ser efectiva para todos los aislamientos, permitiendo obtener gran cantidad de conidios que fueron utilizados en la caracterización morfológica de los aislamientos en estudio. Esta técnica ha sido referida por Alcorn (1983), quien señaló que para la inducción a la esporulación en aislamientos de hongos pertenecientes al género *Drechslera*, se podría utilizar el medio de cultivo consistente en jugo V-8, mientras que en el presente trabajo se encontró de utilidad el uso del medio de cultivo PDA para los hongos pertenecientes a los géneros *Bipolaris* y *Exserohilum*. Con respecto a la germinación de los conidios, se observó que ésta ocurrió 2 h después de colocarlos en cajas de Petri con AA bajo ambiente de laboratorio.

Alcorn (1988) señala que en los géneros *Bipolaris*, *Drechslera* y *Exserohilum* ocurren variaciones en la morfología de los conidios, al comparar los provenientes de medios artificiales

con los provenientes de tejido vegetal. Debido a esto, al inducir los hongos a la esporulación en estudios comparativos, se requiere aumentar la uniformidad de los conidios obtenidos en medios de cultivo y los formados en condiciones naturales. En el presente trabajo el uso de los medios PDA y AA resultaron ser adecuados para las comparaciones realizadas, no observándose variación entre los conidios.

*E. rostratum* ha sido reportado causando manchas foliares en arroz, en asociación conjunta con *B. oryzae* (Ou, 1985), y en Venezuela fue señalado por primera vez en asociación a granos manchados de arroz (Cardona y González, 2007).

Las especies gramínicas hospedantes de *E. rostratum* y *B. oryzae* están asociadas con plantas de arroz, maíz, sorgo y caña de azúcar, cultivos comunes en el estado Portuguesa. Esto implica que tales hongos constituyen un problema creciente para la agricultura de la región ya que además de estar asociados a la semilla de los principales cultivos, pueden disponer de plantas hospedantes durante todo el año.

### CONCLUSIONES

Las características morfológicas de los hongos aislados en hojas y semillas de plantas de arroz del estado Portuguesa, en Venezuela, mostraron que se trata de las especies *B. oryzae* y *E. rostratum*, las cuales se encuentran incluidas dentro del llamado complejo *Helminthosporium*.

Se comprobó la capacidad patogénica de estos hongos a través de las pruebas de patogenicidad tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*.

### LITERATURA CITADA

- Alcorn, J.L. 1983. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. Mycotaxon 17: 1-86.
- Alcorn, J.L. 1988. The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. Ann. Rev. Phytopathol. 26: 37-56.
- Cardona, R. y M.S. González. 2006. Técnicas para la preservación e inducción a la esporulación de hongos del complejo *Helminthosporium*. Fitopatología Venezolana. 19: 19-20.
- Cardona, R. y M.S. González. 2007. First Report of *Exserohilum rostratum* associated with rice seed in Venezuela. Plant Dis. 91:226.
- Fedeagro (Confederación Nacional de Asociaciones de Productores Agropecuarios). 2007. Estadísticas agrícolas. <http://www.fedeagro.org> (consulta del 27/05/08).
- Lutrell, E.S. 1963. Taxonomic criteria in *Helminthosporium*. Mycologia 55: 643-674.
- Ou, S.H. 1985. Rice Disease. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK. 380 p.
- Ojeda, A. y L. Subero. 2004. Ubicación, sobrevivencia y transmisión de *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Schoem., en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.). Rev. Fac. Agron. (UCV) 30: 27-37.
- Ojeda, A. y L. Subero. 2006. Crecimiento y esporulación de *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Schoem., en diferentes medios de cultivo, condiciones de luz y temperatura. Rev. Fac. Agron. (UCV) 32: 145-154.
- Padmanabhan, S.Y. 1973. The great Bengal famine. Ann. Rev. Phytopathol. 11: 11-26.
- Rodríguez, H., H. Nass y L. Alemán. 1988. Incidencia y control del manchado del grano de arroz. Fitopatol. Venez. 1(1): 5-7.
- Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorph. CAB. Mycological Papers No 158. 261 p.
- Tuite, J. 1969. Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Burgess Pub. Minneapolis, MN. 239 p.