

ESPECIES DE HONGOS FORMADORES DE ESCLEROCIOS EN EL ARROZ EN CUBA. MORFOLOGÍA Y PROPUESTA DE UNA CLAVE DE IDENTIFICACIÓN

Luis M. Barrios, Elsa I. Hidalgo, L. Hilda Nenninger, Michel Pérez y Lutgarda M. Betancourt

Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal.
Ayuntamiento 231 e/ San Pedro y Lombillo, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana,
c.e.: luisbarrios@yahoo.com

RESUMEN

En los diagnósticos de rutina realizados en el Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal a partir de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) que presentaban lesiones de color castaño oscuro en la base del tallo, se aislaron repetidamente varios hongos productores de esclerocios, los cuales se diferenciaron por sus características culturales en medio de cultivo agar-papa-dextrosa y en la morfología y tamaño de los esclerocios. El presente estudio fue realizado con el objetivo de caracterizar morfológicamente y culturalmente todos los esclerocios presentes en el cultivo del arroz, así como proponer una clave sencilla de identificación. Se aislaron 190 cepas agrupadas en 10 grupos, los cuales produjeron colonias con esclerocios morfológicamente diferentes. Los hongos se ubicaron taxonómicamente en los géneros *Sclerotium* y *Rhizoctonia*, precisándose las especies: *Sclerotium hydrophilum*, *S. rolfsii*, *S. oryzae*, *S. oryzae* var. *irregulare*, *Rhizoctonia oryzae*, *R. solani*, *R. zeae* y *Rhizoctonia* spp. Se describen las características culturales y morfológicas de las ocho especies identificadas, y se propone una clave para la identificación de las especies de hongos fitopatógenos formadores de esclerocios en el cultivo del arroz en Cuba, la cual facilita su identificación y diagnóstico.

Palabras clave: esclerocios, arroz, diagnóstico

ABSTRACT

In the routine diagnosis of rice (*Oryza sativa* L.) plant carried out in the Central Plant Quarantine Laboratory showing dark brown lesions and sclerotia on the stalk base several fungi producing sclerotia were repeatedly isolated being differed by their cultural characteristics on culture media (PDA) and the morphology and size of sclerotia. The objective of this work was to characterize morphological and culturally sclerotial fungi on rice, and to propose a taxonomic key. 190 strains were gathered in 10 groups which produced colonies with sclerotia morphologically different. The fungi were taxonomically located in the *Sclerotium* and *Rhizoctonia* genus, being identified species were: *Sclerotium hydrophilum*, *S. rolfsii*, *S. oryzae*, *S. oryzae* var. *irregulare*, *Rhizoctonia oryzae*, *R. solani*, *R. zeae* and *Rhizoctonia* spp. The cultural and morphology characteristics of the 8 species identified are described and a key for the identification of fungi forming sclerotia on rice in Cuba is proposed, which facilitates their diagnosis.

Key words: sclerotia, rice, diagnosis

INTRODUCCIÓN

En los diagnósticos de rutina realizados por especialistas en micología del Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal a partir de plantas de arroz que presentaban lesiones de color castaño oscuro en la base del tallo, se aislaron repetidamente varios tipos de esclerocios, los cuales se diferenciaban en cuanto a su morfología y crecimiento en medio de cultivo.

Varios hongos formadores de esclerocios han sido encontrados causantes de enfermedades en el arroz [Sheh *et al.*, 1991]. Dentro de estos hongos se conocen que dos producen esclerocios diferenciados en médula y corteza, los cuales están asociados con enfermedades que atacan la vaina foliar, y son: *Sclerotium oryzae* Catt, estado esclerocial del ascomiceto

Magnaporthe salvinii (Cav) Subram. [Raymand *et al.*, 1972] y *S. hydrophilum* Sacc [Shahjahan y Rush, 1979], cuyo estado telemórfico es un basidiomiceto de identidad aún desconocida [Cedeño *et al.*, 1995].

Comúnmente estos patógenos pueden encontrarse asociados con *Rhizoctonia solani*, agente causal del tizón de la vaina y con *Rhizoctonia oryzae-sativae*, agente causal de la mancha agregada de la vaina [Cedeño *et al.*, 1997].

El presente estudio fue realizado con el objetivo de caracterizar morfológicamente y culturalmente todos los esclerocios presentes en el cultivo del arroz, así como proponer una clave sencilla de identificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el aislamiento de los patógenos se utilizaron fragmentos de tejido enfermo (1 cm) cortados del margen de las lesiones existentes en la vaina foliar. Las muestras fueron desinfectadas por un minuto con solución al 1% de hipoclorito de sodio, lavadas con agua destilada estéril y sembradas asépticamente en placas de agua agar. Las placas se incubaron a temperatura del laboratorio (22-24°C). Los numerosos aislados obtenidos se purificaron por transferencia continua de ápices

hifales a placas de agar papa dextrosa (PDA), los cuales se incubaron a 28°C en oscuridad continua.

RESULTADOS

En la *Tabla 1* se pueden observar los numerosos aislamientos obtenidos en los tallos, en la cual se aprecian 10 grupos de colonias de esclerocios morfológicamente diferentes. Tomando en consideración las características *in vitro* del crecimiento micelial, así como la morfología y tamaño de los esclerocios, se arribaron a los resultados mostrados en la *Tabla 2*.

Tabla 1. Número de aislamientos y lugar de origen del material analizado

Grupo	Número de cepas	Procedencia
I	16	Guantánamo (3),* Las Tunas (5), Granma (2), Nueva Paz (2) y Camagüey (4)
II	27	Guantánamo (2), Las Tunas (2), Bayamo-Granma (1), Camagüey (7), Matanzas (4), Los Naranjos (provincia de La Habana) (3), El Coroal (provincia de La Habana) (3), Estación de postentrada CENSA (2) y Cienfuegos (3)
III	20	Guantánamo (12), Sancti Spiritus (5) y Cienfuegos (3)
IV	16	Santiago de Cuba (7) y Camagüey (9)
V	15	Nueva Paz (provincia de La Habana) (15)
VI	15	La Coca (6), El Coroal (4), Matanzas (2) y Cienfuegos (3)
VII	25	La Coca (7), Guantánamo (2), Las Tunas (2), Granma (1), Camagüey (5), Matanzas (2), Santiago de Cuba (1), Los Naranjos (1), El Coroal (1), Cienfuegos (2) y CENSA (1)
VIII	18	La Coca (18)
IX	21	La Coca (20) y Cienfuegos (1)
X	12	Nueva Paz (provincia de La Habana) (12)
Total	190	

*Números de aislados por procedencia.

Tabla 2. Identificación de los esclerocios asociados al cultivo del arroz en Cuba

Grupo	Organismo
I	<i>Sclerotium rolfsii</i> Saccardo
II	<i>Sclerotium hydrophilum</i> Saccardo
III	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuehn
IV	<i>Rhizoctonia oryzae</i> Ryker & Gooch
V	<i>Rhizoctonia zeae</i> Voorhees
VI	<i>Sclerotium oryzae</i> var. <i>irregulare</i> Roger
VII	<i>Sclerotium oryzae</i> Catt
VIII, IX y X	<i>Rhizoctonia</i> spp.

Descripción morfológica y cultural

Grupo I: Micelio densamente lanoso brillante, con crecimiento en forma de abanico. Hifas variables en grosor (2.4-8.3 μ). Esclerocios grandes, numerosos, individuales, globosos, rosáceos al inicio y luego pardos o café, los cuales miden cuando maduran entre 0.8-2.5 mm de diámetro.

Grupo II: El hongo forma colonias blancas de crecimiento rápido. Las medidas del grosor de las hifas revelaron valores entre 4.0-4.5 μ . La formación de los esclerocios comenzó siempre después del 4-5 días de la siembra, los cuales se apreciaron globosos, superficiales, lisos, inicialmente blancos, luego marrón oscuro a negros; se mostraron siempre individuales y midieron 550 (362-747) x 510 (330-670) mm.

Grupo III: Micelio blanco al inicio y luego carmelita-amarillo, hifas de 4-8 μ . Las ramificaciones hilase en ángulo recto o de aproximadamente 45°, con una leve constricción en el punto de ramificación y un tabique cercano a este, similar a las especies de la forma-género *Rhizoctonia*. Los esclerocios fueron de bordes irregulares, aplastados, carmelitas a negros, agrupados e individuales, midiendo de 1-6 mm o más. Forma abundantes esclerocios en medio de cultivo después del quinto día.

Grupo IV: Micelio abundante en medio de cultivo, ramificado en ángulo agudo con leve constricción en el punto de ramificación y un tabique cercano a este punto. Al inicio el micelio es blanco y a partir del tercer día aparece pigmentación salmón a naranja brillante; hifas de 5-10 μ de ancho las cuales se anastomosan formando masas de células escleróticas de varias formas y tamaño. Los esclerocios son inmersos, inicialmente blancos y luego rojizos, naranjas o salmón.

Grupo V: Crecimiento similar al grupo IV, pero esta formó esclerocios muy pequeños que midieron entre 0.5 y 1.0 mm de diámetro.

Grupo VI y VII: Estos dos grupos de cepas con igual comportamiento en medio de cultivo produjeron colonias blancas, con micelio aéreo escaso, inicialmente blanco y luego verde cercano al gris-azulado. Se observan abundantes hifas gruesas, con abundantes hifopodios lobulados, carmelitas oscuros en el reverso de la colonia. Los esclerocios comenzaron a formarse después de siete a nueve días, inicialmente blancos, luego rojizos y finalmente negros; son además redondos, individuales o agrupados, inmersos o escasamente superficiales. La diferencia entre ambos grupos radica en la textura de la superficie de los esclerocios. En el grupo VI es rugosa, mientras que en el grupo VII es lisa; además, los esclerocios del grupo VII siempre se encontraron

agrupados, mientras que los del grupo VI comúnmente se observaron individuales o escasamente agrupados.

Grupos VIII, IX, X: Micelio escaso, hifas variables en forma de 4-12 μ de ancho, ramificadas en ángulo recto, con constricción visible en puntos de ramificación. Las hifas se anastomosan dando a lugar a células escleróticas, similares a las especies del género *Rhizoctonia*. Esclerocios variables en forma, agrupados o individuales. Tamaño variable desde 22.3-36.2 μ de diámetro, inmersos, formación escasa en medio de cultivo, al inicio blancos y finalmente pardos oscuros. El grupo X produjo esclerocios rugosos, redondeados, 36.2 μ de diámetro, el grupo VIII produjo esclerocios lisos, redondeados, individuales y 22.3 μ de promedio, mientras que el grupo IX produjo esclerocios lisos, redondos, individuales y con 35.0 μ de diámetro.

DISCUSIÓN

Como se observa, las cepas pertenecientes al grupo II se identificaron como *Sclerotium hydrophilum* (Fig. 1). Este hongo es considerado un saprófito facultativo, comúnmente aislado de plantas acuáticas y semiacuáticas de las regiones tropicales y templadas [Punter *et al.*, 1994], aislándose en varias plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas [Farr *et al.*, 1989; Punter *et al.*, 1984]. La anatomía y morfología de los esclerocios coincidió con lo descrito por Ou, (1972), Punter *et al.* (1984) y Cedeño *et al.* (1997).

En los estudios de ultraestructura realizados por Cedeño *et al.*, en 1997, *S. hydrophilum* presenta poro setal similar a la estructura dolípora de los holobasidiomicetos, cuya corona presenta además perforaciones [Moore, 1987]. Muchos investigadores han planteado que la fase telomorfa de *Sclerotium hydrophilum* podría ubicarse en un lugar junto a hongos como *Ceratobasidium*, el cual es la fase perfecta de varias especies pertenecientes al género *Rhizoctonia*. Los estudios realizados por Cedeño *et al.* en 1997 revelaron que las células hilase de *S. hydrophilum* son bitunicas, y los esclerocios se diferencian en médula y corteza, descartándose por tanto su conexión con el género *Ceratobasidium*.

Las cepas de los grupos VI y VII se identificaron como *Sclerotium oryzae* y *S. oryzae* var. *irregulare*, respectivamente. Los hongos anteriormente mencionados presentan características culturales y tasas de crecimiento similares a *S. hydrophilum*. Sin embargo, difieren de este en cuanto a su pigmentación de micelio y anatomía de los esclerocios. En *S. hydrophilum* el micelio siempre es blanco, y los esclerocios comienzan a formarse a partir del cuarto y quinto día, e inicialmente son blancos, luego rojizos y finalmente marrón oscuro a negros. Mientras que en *S. oryzae* y *S. oryzae* var. *irregulare*, el crecimiento micelial comienza blanco, pero a partir del tercer día aparece una pigmentación verde-gris azulado en el micelio, la cual es más intensa en los cultivos vie-

jos, y la formación de los esclerocios es a partir del noveno o décimo día después de la siembra, siendo primero blancos y más tarde negros muy redondos.

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 los esclerocios de *S. hydrophilum*, en algunos aislamientos es similar al de *S. oryzae* y al de *S. oryzae* var. *irregulare*. Un criterio que separa estas especies es la formación de abundantes hifopodios carmelitas oscuros adheridos al fondo de la placa Petri. *S. oryzae* y *S. oryzae* var. *irregulare* siempre formaron abundantes hifopodios lobulados en el medio de cultivo, mientras que estas estructuras nunca se observaron en los numerosos y diferentes aislamientos de *S. hydrophilum*. Por su parte *S. oryzae* y *S. oryzae* var. *irregulare* se diferencian por la textura de la capa externa de los esclerocios, siendo en *S. oryzae* lisa y en *S. oryzae* var. *irregulare* irregular [Ahahjahan Rush, 1979; Cedeño et al., 1997].

Un criterio confiable que discrimina cualquier semejanza entre ambas especies con *S. hydrophilum* es la presencia de conidios de *Nakataea sigmoidea* var. *sigmoidea* (anamorfo de *Magnaporthe salvinii*) asociados a los esclerocios de *S. oryzae* y *N. sigmoidea* var. *irregulare* asociados a los esclerocios de *S. oryzae* var. *irregulare*.

Las enfermedades causadas por *Sclerotium rolfsii* están ampliamente distribuidas en los climas cálidos, el cual ataca una amplia gama de hospedantes, entre los que se incluyen a *grasso modo* numerosos frutales, leguminosas de granos, hortalizas, cereales, plantas ornamentales y malezas [Zillinski, 1984; Morita, 1995]. El hongo se identifica fácilmente por las masas de micelio blanco y la forma, tamaño y color de los esclerocios. El estado basidial, *Cortinium rolfsii*, se observa casualmente en el tejido vegetal enfermo o muerto, y probablemente es de menor importancia en la transmisión de la enfermedad, así como supervivencia y resistencia del hongo [Akem y Dashiell, 1995]. *S. rolfsii* es un patógeno altamente facultativo y eficiente, el cual puede continuar creciendo extensamente sobre el tejido vegetal moribundo cerca de la superficie del suelo. Una vez establecido el hongo su erradicación se hace muy difícil principalmente por la existencia de un gran número de plantas hospedadoras, la elevada capacidad de vivir saprobióticamente sobre el material vegetal muerto, y su gran resistencia lograda a través de la formación de los esclerocios y de su propio micelio [Alexander y Stewart, 1994].

Rhizoctonia solani (telemorfo: *Thanatephorus cucumeris*) (Fig. 2) es el más común de los hongos del suelo, donde sobrevive como restos de micelio o esclerocios. Están reportadas cerca de 550 géneros de plantas hospedadoras de este organismo [Farr et al., 1989] entre ellas el arroz, donde causa el llamado tizón de la vaina (*sheath blight*),

enfermedad que en Vietnam ocasiona pérdidas de hasta 200 000 000 kg/año [HIRI, 1993]. Otras especies de este género como *R. oryzae* y *R. zeae* provocan enfermedades no menos importantes en este cultivo conocidas con manchas de la vaina *sheath spot* [Webster y Gunnell, 1992].

Al realizar los estudios de estas cepas a partir de sus esclerocios en medio de cultivo, pudimos apreciar que no existían diferencias notables en cuanto a las características miceliales de las tres especies de este género, y si entre la morfología y tamaño de sus esclerocios a partir de los cuales se podía lograr una identificación rápida y certera. En todos los casos la formación de esclerocios ocurrió a partir del quinto día, lo que coincide con los resultados obtenidos por Ulacio et al., 1998 en medio PDA a pH = 7.

Clave propuesta para la identificación de esclerocios presentes en el cultivo del arroz

1. Esclerocios de forma irregular. Micelio generalmente con ramificaciones en ángulos agudos (*Rhizoctonia*) ————— 3

1. Esclerocios de forma definida, globosos (*Sclerotium*) ————— 2

2. Micelio blanco en PDA ————— 4

2. Micelio blanco y luego con pigmentación verde-grisácea ————— 5

3. Micelio incoloro en cultivos jóvenes y carmelita amarillento en cultivos viejos, hifas de 8-12 µ. Esclerocios carmelitas, agrupados, achatados e individuales midiendo entre 1-6 mm de diámetro o más ————— *Rhizoctonia solani*

3. Micelio salmón a naranja brillante, esclerocios redondos, pardos, sumergidos en medio de cultivo ————— *Rhizoctonia oryzae*

3. Esclerocios muy pequeños, redondos, rojizos, midiendo entre 0,5-1,0 mm ————— *Rhizoctonia zeae*

4. Micelio consistentemente blanco brillante, en forma de abanico y abundante, hifas variables de 2,4-8,3 µ de ancho, esclerocios grandes, globosos, lisos, superficiales, individuales pardos rojizo ————— *Sclerotium rolfsii*

4. Micelio blanco a hialino, escaso. Esclerocios globosos, lisos, marrón oscuros a negros, individuales de (550) 362-747x (510) 330-670 µm ————— *Sclerotium hydrophilum*

5. Esclerocios negros consistentemente redondos, inmersos, superficiales, individuales o escasamente agrupados, lisos ————— *S. oryzae*

5. Esclerocios negros, redondos, inmersos, superficiales, individuales o escasamente agrupados, rugosos. ————— *S. oryzae* var. *irregulare*

CONCLUSIONES

- Se describen las características culturales y morfológicas de varios hongos formadores de esclerocios en el cultivo de arroz en Cuba.
- Los hongos identificados se ubicaron taxonómicamente en los géneros *Sclerotium* y *Rhizoctonia*, precisándose las especies *Sclerotium hydrophilum*, *S. rolfsii*, *S. oryzae* var. *irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae*, *R. zoeae* y *R. spp.*
- Se confeccionó una clave de identificación de las especies de hongos fitopatógenos formadores de esclerocios, la cual facilita su determinación y diagnóstico de forma rápida y eficiente.
- La clave y la descripción de las cepas es una herramienta importante para los laboratorios provinciales donde se procesa un gran volumen de muestras.

REFERENCIAS

- Akem, C.; K. Dashiell: «First Report of Southern Blight Caused by *Sclerotium rolfsii* on Soybeans in Nigeria», *Plant Disease*, 75(5):537, 1995.
- Alexander, B.; A. Stewart: «Survival of Sclerotia of *Sclerotinia* and *Sclerotium* spp. in New Zealand Horticultural Soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 26(10):1323-29, 1994.
- Cedeño, L.; H. Nass; C. Carrero; R. Cardona; H. Rodríguez; L. Alemán: «*Sclerotium hydrophilum* en arroz en Venezuela», *Fitopatol. Venez.*, 10: 9-12, 1997.
- : «*Sclerotium hydrophilum*, patógeno del arroz (*Oryza sativa* L.) en Venezuela», *Revista Forestal Venezolana*, 1:70, 1995.
- Farr, D.; G. Bills; G. Chamuris; A. Roosman: 1989. «Fungi on Plants on Plant Products in the United States», *Am. Phytopathol. Soc. Press. St. Paul Minnesota*, 1989.
- IRRI: «Proceedings, Rice Sheath Blight Management Workshop», Hangzhou, China. Los Baños, Philippines. IRRI, 1993.
- Moore, R. T.: «The Genera *Rhizoctonia*—Like Fungi: *Asconizactonia*, *Ceratohiza* Gen. Nov., *Epulohiza* Gen. Nov., *Monilopsis* and *Rhizoctonia*», *Mycotaxon*, 29:91-99, 1987.
- Morita, A.: «Occurrence of Southern Blight Disease Caused by *Sclerotium rolfsii* Saccardo on Loquat», *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 61(3): 197-201, 1995.
- Ou, S. H.: *Rice Diseases*, Commonwealth Mycological Institute, Surrey, Inglaterra, 1972.
- Ounter, D.; J. Reid; A. Hopkin: «Notes on *Sclerotium*-Forming Fungus from *Zizania aquatica* (Wildrice) and Other Hosts», *Mycologia*, 76: 722-732, 1984.
- Rayman, A.; K. Webster: «The Morphology, Taxonomy and Sexuality of the Rice Stem Rot Fungus, *Magnaporthe salvinii* (*Leptosphaeria salvinii*)», *Mycologia*, 64:103-09, 1972.
- Shahjahan, A.; M. Rush: «Occurrence and Distribution of Diseases Caused by Sclerotial Fungi on Rice in Louisiana», *Plant Diseases Reporter*, 63(3): 220-223, 1979.
- Snih, B.; Burpee; A. Ogoshi: *Identification of Rhizoctonia Species*. APS Press, St. Paul, Minnesota, 1991.
- Ulacio, D.; H. Nass; J. Pineda; A. Carrasco: «Viabilidad de *R. solani* A61-1A bajo condiciones de inundación y micoflora asociada al patógeno en tejido de *Oryza sativa*», *Biogro*, 10(2): 40-47, 1998.
- Webster, R. K.; P. Gunnell: *Compendium of Rice Diseases*, APS Press, St. Paul Minnesota, 1992.
- Zilinsky, F. J.: *Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño*, CMMYT, México, 1984.