

IDENTIFICACION DE HONGOS CAUSANTES DE PUDRICION RADICULAR EN GARBANZO (*Cicer arietinum* L.)¹

Identification of fungi causing root rot in chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Mario Alvarez A.², Aída Moreno P.³

SUMMARY

Fungi were isolated from roots, collars, or stems of chickpea plants, presenting yellowing, wilting, and root necrosis, from the localities of Marchigüé, Litueche, Lolol, Paredones, Rapel, and Graneros, at the VI Region of Chile.

From 180 samples, 132 fungus colonies were isolated, 70 corresponding to the genus *Fusarium*, 15 to *Rhizoctonia*, 10 to *Pythium*, 5 to *Botrytis*, and 5 to *Sclerotinia*. *Fusarium* sp. was the most frequent, in all the localities.

Pathogenicity tests done with *Fusarium* sp., *Pythium* sp., and *Rhizoctonia solani* isolations showed that all were chickpea pathogens. *Fusarium* sp. caused wilting, foliar chlorosis and root rot. *Pythium* sp. caused root rot with foliar chlorosis and wilting, in seedlings, and pre-emergence damping-off, in seeds. *R. solani* caused severe root rot with foliar symptoms, followed by death, in seedlings, and pre and post-emergence damping-off, in seeds.

INTRODUCCION

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.), se encuentra en Chile desde la V a la IX Región, siendo el secano de la costa, en la VI Región, una de las áreas más importantes en cuanto a superficie cultivada.

Debido al incremento de esta leguminosa en el país, desde el punto de vista de las exportaciones, su superficie ha ido aumentando progresivamente (16.580 ha en la temporada 1979/80 a 20.500 ha en 1980/81). Sin embargo, uno de los principales factores que limitan la expansión del cultivo y su rendimiento son las enfermedades radiculares, atribuidas a un complejo de hongos patógenos del suelo. Estos atacan al cuello y

raíces, en los diferentes estados de desarrollo de las plantas, causando marchitez general o parcial, clorosis foliar en forma progresiva y necrosis radicular, la que puede causar la muerte.

En la descripción de marchitamiento y pudriciones radiculares ha existido una considerable confusión: se han incluido factores fisiológicos, agronómicos, ambientales y patológicos, como causantes de estos síntomas (Jain y Bahl, 1974). Después de diversas investigaciones, observaciones y pruebas de patogenicidad, se ha llegado a la conclusión que el término "complejo de marchitez" se refiere a varias enfermedades distintas (Nene, 1980).

Diferentes autores coinciden en que esta enfermedad se encuentra presente en casi todos los países donde se cultiva el garbanzo. A nivel mundial, se ha señalado un gran número de hongos patógenos causando pudrición radicular y síntomas de marchitez, tales como: *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseoli*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* sp. *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* y *R. bataticola* (Westerlund y Campbell 1974; Kaiser y otros, 1968; Kraft, 1969).

¹ Recepción de originales: 8 de septiembre de 1983.

Parte de la tesis de la segunda autora para optar al título de Ing. Agr., Escuela de Agronomía, UCV.

² Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

³ Escuela de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, Casilla 4, Quillota, Chile (Egresada).

Westerlund y Campbell (1974) han informado que los síntomas que se presentan en las plantas afectadas por el género *Fusarium* varían según la especie del hongo, siendo *F. oxysporum* el que causa descoloración vascular y raíces con apariencia normal; en cambio *F. solani* causa pudrición radicular sin descoloración vascular. Estos autores, también, indican que *R. solani* causa "damping off", de pre y post-emergencia de plántulas, con muerte de raíces. Dastur (1935) y Grewal, Pal y Kulshrestha (1974) encontraron síntomas asociados a *R. bataticola*, caracterizados por bronceado, amarillez y caída prematura de las hojas y necrosis vascular de las raíces.

Sinha (1973) describió diferentes síntomas causados por *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, desde marchitez parcial hasta marchitez completa de la planta.

En Irán, se encontró *F. lateritium* f. sp. *ciceri* infectando al cultivo en floración, con síntomas de amarillez y necrosis vascular (Manucheri y Mesri, 1966).

En Argentina, se ha encontrado *Pythium* y *Phytophthora citrophthora* en raíces de garbanzo dañadas, además de *Rhizoctonia* sp. (Frezzi, 1956). En la India se han observado síntomas de marchitez asociados con *R. bataticola* y *F. solani* (Dastur, 1935; Fawcett, 1943; Grewal y otros, 1974).

En Chile, la pudrición radicular se ha relacionado, en estudios preliminares, con la presencia de varios géneros de hongos, principalmente *Fusarium* (Aeschlimann, 1980). Sin embargo, las investigaciones relativas a enfermedades radiculares son escasas, por lo cual esta investigación se planteó como objetivo aislar e identificar los principales hongos patógenos causante de pudrición radicular en el garbanzo, en la VI Región de Chile.

MATERIALES Y METODOS

Aislación y Patogenicidad

La aislación de hongos se realizó a partir de plantas de garbanzo que presentaban síntomas de marchitez o amarillez y necrosis radicular. Se procesó un total de 180 plantas, recolectadas desde octubre a enero en la temporada 1980/81, en las siguientes localidades de la VI Región: Marchigüe, Lolol, Litueche, Rapel, Paredones y Graneros.

Los aislamientos se efectuaron a partir de trozos del tejido de zonas afectadas (tallo y/o cuello y/o raíces), desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% durante 1-2 min, los cuales fueron sembrados en discos Petri, que contenían como medio de cultivo agar-papa-dextrosa (APD), agar-agua (AA) o agar-maíz

(AM). La incubación se realizó en estufa de cultivo a 24° C, por un período de 4-5 días. Luego, para estimular la esporulación, se colocaron bajo una fuente de luz discontinua (12 hr/día), a temperatura ambiente.

Los hongos aislados fueron identificados a nivel de género o especie y almacenados en tubos de ensayo con APD o AM a 4° C, hasta ser utilizados en pruebas de patogenicidad.

Multiplicación del inóculo: Con el propósito de preparar el inóculo a utilizar en diferentes pruebas de patogenicidad, los hongos aislados se multiplicaron en placas Petri, arena o cultivo líquido.

Multiplicación en placas Petri: En placas Petri, con medio APD o AM, se cultivó el inóculo a partir de micelio, incubándose en estufa de cultivo a 24° C, por 4-5 días.

Multiplicación en avena: Se utilizaron Erlenmeyers de 250 ml, en los cuales se colocó 25 g de avena remojada en 150 ml de agua destilada, durante 2 hr, y luego esterilizada a 120° C, durante 30 min. Un trozo de micelio fue incorporado a este medio en forma homogénea y luego incubado a 24° C, durante 20 días.

Suspensión de esporas: Se utilizaron Erlenmeyers de 50 ml, conteniendo 10 ml de caldo de papa, a los cuales se agregó un trozo de agar con micelio y luego puestos en un agitador horizontal, durante 8-10 días, a temperatura ambiente, hasta llegar a obtener una concentración de 10^6 a 10^7 esporas/ml.

Inoculación artificial: Los hongos aislados se inocularon, utilizando semillas o plántulas de garbanzo, en invernadero o laboratorio. Las semillas se desinfectaron previamente en hipoclorito de sodio al 2,5%, durante 5 min. Las plántulas, de 10-12 días de edad, provenían de semillas desinfectadas con hipoclorito de sodio y puestas a germinar en vermiculita estéril, a 20-26° C de temperatura.

Inoculación en tubos con agua: Las plántulas fueron colocadas en tubos de ensayo rellenos con la suspensión de esporas al 2,5%, diluida en agua destilada (Nene y Haware, 1980), los cuales se dejaron en laboratorio bajo luz artificial (16 hr/día), proporcionada por dos tubos fluorescentes de 40 W cada uno. Mediante este sistema, se inocularon tres tubos con cada aislamiento identificado como del género *Fusarium*. Como testigo se utilizaron plántulas de la misma edad, colocadas en agua destilada. Se incluyó, además, tubos preparados en la misma forma con *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, proporcionado por ICRISAT (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics).

Inoculación en tubos con arena: Las plántulas se inocularon efectuando una herida directamente bajo el cotiledón y dejando caer sobre ella 2 ml de suspensión de esporas sin diluir. Una vez inoculadas, fueron puestas en tubos de ensayo con arena esterilizada, cubriendo con ella la zona de inoculación. Los tubos de ensayo se dejaron en las mismas condiciones que para la inoculación en agua. Con este método, se inocularon tres tubos con cada aislamiento de *Fusarium* y *Rhizoctonia*. Como testigo, se usaron plantas heridas, sobre las cuales se dejó caer 2 ml de agua destilada. Se incluyó, además, plántulas inoculadas en igual forma con *F. solani*, del ICRISAT.

Inoculación al suelo con avena: Se utilizó una mezcla de tierra de hoja, arena y turba, en proporciones iguales, la que fue puesta en maceteros y esterilizada con bromuro de metilo (1 libra/10 m² de suelo). A la mezcla se le agregó avena inoculada con aislamientos de *Fusarium* sp. (Prasad y Padwick, 1939), en proporción de 25 g por cada dos maceteros. Después de 10 días, se sembraron en los maceteros semillas desinfectadas. Los maceteros se dejaron en invernadero, a temperatura de 20–26°C y humedad relativa entre 60 y 70%. El riego se efectuó diariamente con agua destilada. Se dejaron maceteros testigos, a los cuales se les agregó avena.

Inoculación al suelo con agar: Se utilizó una mezcla de tierra de hoja, arena y turba en partes iguales, esterilizada con bromuro de metilo y puesta en macetero. La mezcla fue inoculada con los aislamientos de *Rhizoctonia*, multiplicados en APD, o *Pythium*, multiplicados en AM, utilizándose un disco por macetero. Después de 10–12 días de incubación, se sembraron semillas esterilizadas o plantaron plántulas. Los maceteros se dejaron en condiciones de invernadero y se regaron diariamente con agua destilada. Como testigo se utilizaron maceteros a los cuales se les agregó APD o AM.

Lectura de síntomas: Las plántulas o semillas inoculadas se examinaron periódicamente para determinar la

presencia de síntomas aéreos, hasta 25 días después de la inoculación. Posteriormente, se examinaron las raíces para determinar el daño a ese nivel.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislaciones

En el Cuadro 1 se presentan los géneros de hongos aislados de raíz, cuello o tallo de garbanzo, en las diferentes localidades estudiadas.

De las 180 muestras procesadas, se aislaron 132 colonias de hongos, de las cuales 70 correspondieron al género *Fusarium*, 15 a *Rhizoctonia*, 10 a *Pythium*, 5 a *Botrytis* y 5 a *Sclerotinia*. Otro grupo de hongos presentó micelio estéril, no pudiendo ser identificados, y el resto correspondió a géneros que se consideraron saprófitos, como *Aspergillus* y *Penicillium*. En 48 muestras no se logró aislar ningún hongo.

Autores, como Kaiser y otros (1968) y Westerlund y Campbell (1974), coinciden con los resultados de la presente investigación, señalando la misma gama de hongos patógenos en garbanzo y que provocarían los síntomas de marchitez y pudriciones radiculares, en Irán y California, respectivamente.

Pruebas de Patogenicidad

En la presente investigación sólo se realizaron pruebas de patogenicidad a través de inoculaciones artificiales con los géneros *Fusarium*, *Pythium* y *Rhizoctonia*. El género *Botrytis* fue encontrado asociado, además, con síntomas aéreos con o sin pudrición radicular y sus pruebas de patogenicidad se realizaron en trabajos paralelos (Sepúlveda y Alvarez, 1983). El género *Sclerotinia* ya había sido identificado como patógeno del garbanzo en Chile (Mujica y Vergara, 1980) y por consiguiente no se utilizó en esta investigación.

CUADRO 1. Géneros de hongos aislados a partir de raíces y/o cuello y/o tallo de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en seis localidades de la VI Región

TABLE 1. Fungus genera isolated from roots and/or collars and/or stems of chickpea plants from six localities in the VI Region of Chile

LOCALIDAD	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Pythium</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Sclerotinia</i>
Paredones	+	—	—	—	—
Litueche	+	+	—	—	—
Lolol	+	+	—	+	—
Marchigüe	+	+	+	+	+
Rapel	+	—	—	—	—
Graneros	+	—	—	—	—

Inoculación con *Fusarium* sp.: Se probaron 70 aislamientos de *Fusarium* sp. de los cuales 55 (79%) demostraron ser patógenos, de acuerdo a los resultados obtenidos en las distintas pruebas de patogenicidad.

Plántulas en agua con suspensión de esporas: Todas las plántulas testigo inoculadas con *F. oxysporum* (ICRISAT) presentaron marchitez del ápice, decaimiento de las hojas superiores y pecíolo y descoloración foliar, que comenzó por las hojas basales, comprometiendo posteriormente a toda la planta. La raíz no presentó síntomas externos, sino una intensa necrosis de los vasos conductores, confirmando los resultados obtenidos en pruebas de patogenicidad por Westerlund y Campbell (1974).

Las plántulas inoculadas con aislamientos chilenos de *Fusarium* sp. presentaron síntomas similares, pero no idénticos, consistentes en marchitez del ápice, amarillez de las hojas basales y posteriormente una clorosis generalizada. Las plántulas detuvieron su crecimiento y, a diferencia de los síntomas provocados por *F. oxysporum*, presentaron una intensa pudrición radicular, con raíces secundarias necrosadas o con estrangulaciones, acompañadas por necrosis de los vasos conductores. Las plantas testigo inoculadas con agua destilada no presentaron síntomas.

Plántulas en arena con suspensión de esporas: Los síntomas de las plántulas inoculadas con los diversos aislamientos de *Fusarium* empezaron por una amarillez de las hojas basales, que posteriormente se extendió a toda la planta, acompañada de una estrangulación al cuello. Los síntomas en el sistema radicular consistieron en raíces secundarias negras y raíces con estrangulaciones, pero sin manifestar descoloración vascular.

Las plántulas testigo inoculadas con *F. solani* (ICRISAT) presentaron síntomas similares, que se caracterizaron por un amarillamiento iniciado en las hojas basales, generalizándose posteriormente a toda la planta. El sistema radicular presentó un estrangulamiento a las raíces secundarias, combinado con una necrosis cortical. Estos síntomas concuerdan con lo señalado por Westerlund y Campbell (1974), los cuales describen que *F. solani* es un patógeno que causa pudrición radicular, sin descoloración vascular.

Las plantas testigo inoculadas con agua destilada no presentaron síntomas.

Inoculación al suelo: La prueba de patogenicidad efectuada en maceteros que contenían una mezcla de tierra inoculada con avena, se realizó con 27 aislamientos seleccionados como patógenos en las pruebas antes mencionadas. Todos ellos produjeron síntomas, pero las plantas inoculadas con algunas cepas consideradas más virulentas, comenzaron a mostrar síntomas

aproximadamente 15 días después de la siembra, consistentes en amarillez en las puntas de las hojas, seguida por marchitez del ápice, continuando con una clorosis generalizada, hasta la muerte, generalmente, 25 días después de la siembra. Otras cepas, consideradas menos virulentas, produjeron síntomas menos severos, consistentes en amarillez o clorosis parcial, sin llegar a provocar la muerte de las plantas.

Dos aislamientos se comportaron como más virulentos y agresivos, produciendo una pudrición radicular intensa, clorosis foliar, detención del crecimiento y muerte de plantas, demostrando que, dependiendo del aislamiento, *Fusarium* es un hongo que puede comportarse como muy agresivo y virulento en garbanzo y provocar distintos grados de síntomas, en los diferentes estados de desarrollo de las plantas.

Inoculación con *Rhizoctonia solani*: De los aislamientos correspondientes al género *Rhizoctonia*, se identificaron las especies *R. bataticola* y *R. solani*, de las cuales se utilizó ésta última para pruebas de patogenicidad.

Plántulas en arena con suspensión de esporas: Los síntomas comenzaron aproximadamente a los 10 días de inoculadas las plántulas y consistieron en marchitez y amarillez, que comenzó desde las hojas basales hasta generalizarse; luego se presentó un cambio de color a café pajizo, acompañado por una intensa pudrición radicular, dejando sólo un trozo de raíz.

Plántulas o semillas en maceteros con agar: Los síntomas comenzaron alrededor de 20 días de inoculadas las plántulas, causando una lesión a la altura del cuello, formando canchales que rodearon al tallo y provocaron la muerte de ellas.

Estos resultados concuerdan con Grewal y otros (1974), quienes observaron muerte de plántulas después de 20 días de inoculadas con *R. solani*. Los autores McRae (1932) y Nema y Khare (1973), indican que *R. solani* es un patógeno que causa marchitez en estado de plántula, detención del crecimiento, una severa pudrición radicular y la muerte de las plantas, síntomas que coinciden con los descritos.

Las plantas testigo sin inocular no presentaron síntomas.

Cuando se sembraron semillas de garbanzo sin germinar, semillas hinchadas o semillas con radícula y plúmula, en suelos inoculados con *R. solani*, se produjo damping-off de pre-emergencia en cada uno de los estados. En semillas germinadas de tres días, el 90% presentó damping-off de post-emergencia y las restantes fueron atacadas, posteriormente, presentando

detención en el crecimiento, amarillez y muerte ulterior.

Westerlund y Campbell (1974) afirmaron que *R. solani*, en pruebas de patogenicidad, causó damping-off de pre y post-emergencia, corroborando los resultados obtenidos.

Inoculación con *Pythium* sp.: Con este género se realizaron dos pruebas.

Plántulas o semillas en maceteros con agar: Los síntomas comenzaron en las plántulas aproximadamente a los 20 días después de la inoculación y consistieron en amarillez y marchitez generalizada, con una leve necrosis a los vasos conductores. Las raíces presentaron necrosis parcial y muerte de algunas raíces primarias y secundarias.

Cuando se colocaron semillas en suelo inoculado, se produjo damping-off de pre-emergencia y marchitez y amarillez generalizada. Estos resultados coinciden con lo observado por Westerlund y Campbell (1974), al señalar que *P. ultimum* provocó damping-off de pre y post-emergencia, con muerte de raíces.

Los testigos sin inocular en ambos casos permanecieron sanos.

CONCLUSIONES

Los géneros o especies de hongos aislados de plantas de garbanzo de la VI Región con síntomas de pudrición radicular y que en pruebas de inoculación artificial demostraron ser patógenos fueron *Fusarium*, *Pythium* y *Rhizoctonia solani*.

Fusarium sp. fue el hongo que se encontró con mayor frecuencia (53%) y en todas las localidades donde se efectuó el muestreo de plantas enfermas. En plántulas provocó marchitez, clorosis foliar y pudrición radicular. Las diferentes cepas aisladas de garbanzo presentaron diversos grados de virulencia y agresividad en inoculaciones artificiales.

Rhizoctonia solani causó severa pudrición radicular en plántulas, acompañada de síntomas foliares y muerte posterior; en semillas, provocó damping-off de pre y post-emergencia.

Pythium sp., provocó pudrición radicular con clorosis foliar y marchitez generalizada en plántulas. En semillas, causó damping-off de pre-emergencia.

RESUMEN

Se efectuaron aislaciones de hongos de raíces, cuellos o tallos de plantas de garbanzo que presentaban síntomas de amarillez, marchitez y necrosis radicular, provenientes de las localidades de Marchigüe, Litueche, Loloi, Paredones, Rapel y Graneros, de la VI Región de Chile.

De 180 muestras procesadas, se aislaron 132 colonias de hongos, de las cuales 70 correspondieron al género *Fusarium*, 15 a *Rhizoctonia*, 10 a *Pythium*, 5 a *Botrytis* y 5 a *Sclerotinia*. *Fusarium* sp. fue el género que se encontró con mayor frecuencia y en todas las localidades prospectadas.

En pruebas de patogenicidad realizadas con aislamientos de *Fusarium*, *Pythium* y *R. solani*, todos ellos demostraron ser patógenos en garbanzo. *Fusarium* provocó marchitez, clorosis foliar y pudrición radicular. *Pythium*, en plántulas, causó pudrición radicular, con clorosis foliar y marchitez, en tanto que en semillas causó damping-off de pre-emergencia. *R. solani*, en plántulas, causó severa pudrición radicular, acompañada de síntomas foliares y muerte posterior, y en semillas, provocó damping-off de pre y post-emergencia.

LITERATURA CITADA

AESCHLIMANN A., J. 1980. Growth of chickpea in Chile. Proceeding International Workshop on Chickpea Improvement. 28 Feb — 2 Mar, Hyderabad, India, ICRISAT.

DASTUR, J.F. 1935. Gram wilts in the Central Provinces. An Annotated Bibliography of Chickpea Diseases, 1915—1976 (Abstr.) ICRISAT.

- FAWCETT, G.L. 1943. Department of Botany and Phytopathology. Annual Report for the year 1942. An Annotated Bibliography of Chickpea Diseases. 1915–1976 (Abstr.) ICRISAT.
- FREZZI, M.J. 1956. Phytopathogenic species of *Pythium* identified in the Argentina Republic. An Annotated Bibliography of Chickpea Diseases. 1915–1976 (Abstr.) ICRISAT
- GREWAL, J.S.; PAL, M.; and KULSHRESTHA, D.D. 1974. A new record of wilt of gram caused by *Fusarium solani*. An Annotated Bibliography of Chickpea Diseases. 1915–1976 (Abstr.) ICRISAT.
- JAIN, H.K. and BAHL, P.H. 1974. Recommendations of symposium of gram wilt. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 34: 236–238.
- KAISER, N.J.; DANESH, D.; OKHOVAT, M.; and MOSSAHEBI, G.H. 1968. Diseases of pulse crops in Iran. Plant Disease Reporter 52: 687–691.
- KRAFT, J.M. 1969. Chickpea, a new host of *Fusarium solani* f. sp. *pisii*. Plant Disease Reporter 53: 110–111.
- MANUCHERI, A. and MESRI, M. 1966. Fusarium wilt on chickpea. An Annotated Bibliography of Chickpea Diseases. 1915–1976 (Abstr.) ICRISAT.
- McRAE, W. 1932. Report of the Imperial Mycologist. An Annotated Bibliography of Chickpea Diseases. 1915–1976 (Abstr.) ICRISAT.
- MUJICA, F. y VERGARA, C. 1980. Flora Fungosa Chilena. Universidad de Chile. Facultad de Agronomía. Ciencias Agrícolas Nº 5. Editorial Universitaria. 308 p.
- NEMA, K.G. and KHARE, M.N., 1973. A conspectus of wilt of Bengal gram in Madhya Pradesh. Symposium on wilt problem and breeding for wilt resistance in Bengal gram. An Annotated Bibliography of Chickpea Diseases. 1915–1976 (Abstr.) ICRISAT.
- NENE, Y.L. 1980. Diseases of Chickpea. Proceedings International Workshop on Chickpea Improvement, 28 Feb – 2 Mar, Hyderabad, India, ICRISAT.
- NENE, Y.L. and HAWARE, M.P. 1980. Screening chickpea for resistance to wilt. Plant Disease 64: 379–380.
- PRASAD, N and PADWICK, G.W. 1939. The genus *Fusarium*. A species of *Fusarium* as a cause of wilt of gram (*C. arietinum* L.). Indian Journal Agriculture Science 9: 371–380.
- SEPULVEDA, P. y ALVAREZ, M. 1983. Resúmenes XXXIV Jornadas Agronómicas. Sociedad Agronómica de Chile. Chile (Abstr.).
- SINHA, S. 1973. Some factors of the soil in relation to *Fusarium* wilt of Bengal gram (*C. arietinum* L.) Symposium on wilt problem and breeding for wilt resistance in Bengal gram. An Annotated Bibliography of Chickpea Diseases. 1915–1976 (Abstr.) ICRISAT.
- WESTERLUND, F.V. and CAMPBELL, R.N. 1974. Fungal root rots of chickpea in California. Phytopathology 64: 432–436.