

INVESTIGACIÓN

IDENTIFICACIÓN DE *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA OCULAR DEL TRIGO EN LA ZONA SUR DE CHILE¹

Identification of *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, the causal agent of wheat eyespot in Southern Chile¹

Orlando Andrade V.^{2*}

ABSTRACT

Near the end of the 1994/95 season, in different localities of the IXth Region, Chile, a high incidence of lodged wheat (*Triticum aestivum* L.) fields were observed, with up to 70% of some fields having white spikes, rotten and broken stems at the base. The microscopic observation of affected tissue of wheat cvs. SNA 400 and Francia, collected near Traiguén (IX Region), as well as the isolates obtained in agar-water + streptomycin sulfate permitted the observation of slow-growing, green-grayish colonies with smooth borders and the presence of needle-like, straight or curved, hyaline conidia, with 4 to 6-septated spores, occasionally 7 septated spores, and with a length of 40.9-81.9 μm and diameter of 1.6-2.3 μm . Pathogenicity tests carried out with the isolated organism, by inoculating 12-day-old wheat seedlings of cv. Otto Baer grown in sterile soil, and inoculated at the base of the stem, resulted in the development of brown oval lesions at the inoculated point in contrast to the controls that did not develop symptoms. The examination of the internal sheaths of affected tissue, previously stained, revealed the development of "infection plaques" characteristic of *Pseudocercospora herpotrichoides* as well as mucilage collars at the hyphae infection sites. The results permitted the identification of *P. herpotrichoides* (Fron.) Deighton, as the causal agent of wheat eyespot as being responsible for the symptoms. This is the first report of the presence of *P. herpotrichoides* affecting wheat in Chile.

Key words: eyespot, wheat diseases, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Triticum aestivum* L.

RESUMEN

Hacia fines de la temporada 1994/95, se observó en diferentes localidades de la IX Región, Chile, sementeras de trigo (*Triticum aestivum* L.) con una alta incidencia de tendadura, hasta un 70% en algunas siembras, acompañada de espigas blancas, pudrición, estrangulamiento y quiebre de la base de los tallos. El análisis microscópico del tejido afectado de trigo variedades SNA 400 y Francia, colectados en la zona de Traiguén (IX Región), así como de los aislamientos obtenidos en agar-agua (AA) + sulfato de estreptomina, permitieron observar el desarrollo de colonias de lento crecimiento, de color gris verdoso, de bordes enteros, y la presencia de conidias hialinas, filiformes, rectas o curvadas, aciculares, con 4-6 septas, ocasionalmente 7 septas, y con una longitud de 40,9-81,9 μm y un diámetro de 1,6-2,3 μm . Pruebas de patogenicidad realizadas con el organismo aislado, en plántulas de trigo de la var. Otto-Baer sembradas en suelo estéril e inoculadas en la base de los tallos a los 12 días de emergidas, resultaron en el desarrollo de lesiones ovaladas de color café, en contraste con los testigos que no desarrollaron síntomas. El examen de las vainas internas del tejido afectado, previamente teñidas, reveló el desarrollo de placas de infección y collares de exudado mucilaginoso alrededor de los sitios de penetración de las hifas, estructuras típicas de *Pseudocercospora herpotrichoides*. Los resultados obtenidos permitieron identificar al responsable de esta sintomatología como *P. herpotrichoides* (Fron) Deighton, agente causal de la mancha ocular del trigo. Esta es la primera referencia sobre la presencia de *P. herpotrichoides* afectando al cultivo del trigo en Chile.

Palabras clave: mancha ocular, enfermedad en trigo, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Triticum aestivum* L.

¹ Recepción de originales: 27 de agosto de 2002.

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.
E-mail: oandrade@carillanca.inia.cl *Autor para correspondencia.

INTRODUCCIÓN

La mancha ocular del trigo (*Triticum aestivum* L.), enfermedad causada por el hongo *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, es considerada uno de los problemas fitopatológicos más severos que afectan a este cultivo en siembras de otoño en Europa. Sólo en Inglaterra se reporta una pérdida anual estimada entre 15 a 45 millones de dólares por efecto de esta patología, a pesar de los tratamientos empleados para controlarla (Fitt *et al.*, 1990; Jones, 1993). Estudios realizados entre 1976 y 1992 en ese mismo país, determinaron que la enfermedad estuvo presente en más del 50% de las siembras, a excepción de los años 1976 y 1982. Su impacto depende mucho de las condiciones climáticas, especialmente de la humedad.

La mancha ocular se caracteriza por la formación de lesiones necróticas ovaladas en la base de las cañas del trigo, con márgenes de color café oscuro y un área central más clara con puntos negros en su centro, que corresponden a una masa estromática formada por el micelio, a partir del cual se produce la infección de las vainas foliares internas. El hongo penetra las capas internas que cubren el coleoptilo, formando nuevo tejido estromático denominado placas de infección (Daniels, 1993), produciendo la pudrición de la caña y eventual tendedura de la planta. En este último caso los daños pueden sobrepasar el 50% de pérdida de rendimiento (Scott y Hollins, 1974, citado por Fitt *et al.*, 1990). Comúnmente, las plantas afectadas maduran prematuramente, generando el síntoma conocido como “espigas blancas”, fácilmente confundido con aquel producido por la pudrición radical del trigo causada por el hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Wiese, 1977).

En 1981, Nirenberg (citado por Murray, 1992), dividió a *P. herpotrichoides* en dos variedades: var. *herpotrichoides* y var. *acufiformis* Nirenberg, basado en el tamaño de las conidias y en el número de septas. Posteriormente, King y Griffin (1985) sugirieron que estas dos variedades corresponderían a los patotipos W y R,

respectivamente, ambos descritos originalmente en 1966 por Lange-De la Camp (citado por Daniels, 1993), en base a la habilidad para infectar trigo, cebada (*Hordeum vulgare* L.) y centeno (*Secale cereale* L.). Entre los métodos que se han descrito para clasificar estos patotipos de *P. herpotrichoides* se cuentan la morfología y desarrollo de las colonias en distintos medios de cultivo, la morfología y tamaño de las conidias, y la habilidad patogénica en trigo y centeno. Sin embargo, en todos ellos se han encontrado respuestas variables, por lo que se consideran poco satisfactorios para clasificarlos como tipo W o tipo R (Creighton, 1989; Fitt *et al.*, 1990; Daniels, 1993; Nicholson *et al.*, 1993).

El estado telomórfico de *P. herpotrichoides* corresponde al hongo ascomycete *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner, el cual fue reportado el año 1987 en Australia (Wallwork y Spooner, 1988). Posteriormente se reportó en Nueva Zelanda (Sanderson y King, 1988, citados por Murray, 1992) e Inglaterra (Hunter, 1989).

Esta enfermedad no se encontraba descrita en Chile, como tampoco en Sud América (Murray, 1992), aun cuando plantas con sintomatología atribuible a dicha patología se habían observado esporádicamente en la zona sur del país, en temporadas caracterizadas por alta pluviometría primaveral. Sin embargo, hacia fines del año 1994 se detectó un aumento significativo de la tendedura de sementeras de trigo, asociada a la presencia de espigas blancas, en diferentes áreas de la zona sur, especialmente en suelos rojos arcillosos y transicionales de la IX Región (Traiguén, 38°14' lat. S., 72°38' long. O. a Galvarino, 38°19' lat. S., 72°30' long. O.) y de la X Región (Cudico, 40°14' lat. S., 73°07' long. O. y camino San Pablo a Trumao, 40°23' lat. S., 73°02' long. O.). Las plantas presentaban además una severa pudrición en la base de las cañas, abarcando ocasionalmente hasta el segundo nudo, y con quebradura de las mismas. Esta tendedura no era recuperable, como la producida por lluvias y vientos, por lo que las plantas permanecían totalmente postradas. La magnitud de la situación revistió características de alta severidad en algunas sementeras, afectando incluso a más del 70% de

la siembra, lo cual motivó un estudio más acabado del problema y una prospección preliminar para detectar los sectores afectados.

El objetivo de este trabajo fue identificar al agente causal de la sintomatología descrita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y observación macro y microscópica de plantas afectadas, y aislamiento del agente causal

Plantas de trigo de las variedades SNA 400 y Francia afectadas por la sintomatología descrita, se colectaron a fines del año 1994 en la localidad de Quilquén, a 12 km al noroeste de la ciudad de Traiguén (IX Región). El examen macro y microscópico consistió en la observación de las plantas, del tejido afectado, y en el raspado superficial de la zona afectada con el extremo de un bisturí sobre una gota de agua destilada estéril depositada sobre un portaobjeto limpio. Trozos de 2-3 cm de la zona basal de cañas afectadas se desinfectaron superficialmente en una solución de hipoclorito de sodio al 2% + etanol al 20% por 2 min, seguidos de dos lavados consecutivos en agua destilada estéril, y secados sobre papel filtro estéril bajo campana de aire de flujo laminar. Secciones del tejido afectado de 2-3 mm se sembraron en medio agar-agua (AA) + sulfato de estreptomicina (SE) (150 mg mL^{-1}) y mantenidos por 10 días a temperatura ambiente, seguido de 20 días a 10-12°C.

La identificación del hongo se basó en la observación y medición bajo microscopio óptico (Carl Zeiss, Mod. Standard) con contraste de fases, de las características morfológicas de las conidias desarrolladas en medio de cultivo.

Pruebas de patogenicidad

Se realizaron pruebas de patogenicidad con el hongo multiplicado en AA, en plántulas de trigo de la var. Otto-Baer de 12 días de crecimiento. Para esto, se desarrollaron primeramente cultivos monospóricos en medio AA + SE, colectando conidias con micropipeta accionada repetidamente sobre una gota de agua destilada estéril depositada sobre los conidióforos. Luego, la suspensión

obtenida se distribuyó con rastrillo de vidrio estéril en un nuevo medio AA + SE. Las placas se mantuvieron a temperatura de laboratorio (15-20°C) por 7 días. Posteriormente, se repicaron individualmente las conidias germinadas visualizadas bajo microscopio óptico, a medio AA, incubando las placas por 20 días a temperatura de laboratorio.

Se realizaron dos pruebas de patogenicidad: una de ellas consistió en la inoculación directa de trozos de agar con crecimiento del hongo, en la base de plántulas desarrolladas en mezcla 1:1 de suelo y arena esterilizada contenida en tubos de ensayo de 25 x 190 mm, incubadas en condiciones de laboratorio a 15-20°C por 25 a 30 días. Un total de 12 plantas se inocularon de esta forma, y otras 6 se inocularon con agar sin el hongo para emplearlas como testigos. Las plantas se regaron con agua destilada estéril cada 3-4 días. La segunda prueba consistió en la colocación en forma de anillo de cilindros de cañas de trigo maduras y sanas de 1 cm de largo, en la base de plantas de trigo var. Otto-Baer (Macer, 1966, citado por Murray, 1992), los cuales se esterilizaron previamente en matraces de vidrio en autoclave, inoculados con trozos de agar con crecimiento del hongo y dejados colonizar por el microorganismo por 35-45 días bajo temperatura de laboratorio. Se inocularon un total de 5 macetas con 4 plantas cada una, desarrolladas en mezcla 1:1 de suelo y arena esterilizada contenida en macetas de plástico desechables de 150 mL de capacidad. Otras dos macetas, con 4 plantas cada una, se dejaron como testigos, inoculando con cilindros de cañas esterilizados, pero sin el hongo. Todas las macetas se incubaron en invernadero por 50 días, regándolas cada 4 días con agua destilada hasta la evaluación.

La evaluación de las plantas inoculadas se realizó a través del examen visual de lesiones en el tejido de la zona inoculada, la observación bajo microscopio óptico de las vainas foliares desprendidas de la zona de inoculación, y la tinción del hipocotilo con una solución al 10% de tinta azul Pelikan en 25% de ácido acético, para detectar la presencia de placas de infección del hongo y sitios de penetración de las hifas. Estos

últimos presentan la característica de pequeños collares o anillos de material mucilaginoso extracelular, alrededor del sitio de penetración de las hifas bajo las placas de infección en las vainas foliares internas (Daniels, 1993). Inmediatamente después de la evaluación, tejido proveniente de las plantas inoculadas se desinfectó superficialmente con hipoclorito de sodio al 1,5% por 2 min, separando posteriormente las láminas, cortándolas en pequeños trozos y sembrando estos últimos en AA + SE con el propósito de reaislar el agente causal.

Prospección de sementeras de trigo

Durante las temporadas agrícolas 1994/95 a 1996/97 se revisaron sementeras de trigo ubicadas preferentemente en zonas de suelos rojo-arcillosos a transicionales de la VIII y IX regiones, que presentaban “espigas blancas” y/o tendadura de plantas. Además se examinaron en laboratorio plantas de trigo traídas por agricultores de la X Región. La identificación se basó en la detección de síntomas típicos de la enfermedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observación macro y microscópica de plantas afectadas, y aislamiento del agente causal

El examen macro y microscópico de las plantas afectadas permitió observar los síntomas característicos de la mancha ocular, esto es, lesiones ovaladas en sentido longitudinal de las cañas, con bordes más oscuros y centro grisáceo, y masas estromáticas de color negro en el centro de la lesión (**Figura 1**). Además, micelio grisáceo en el tejido interno de las cañas, pudrición de la base y quiebre de éstas en esta misma zona, “espigas blancas” sin granos o con granos “chupados”, y ausencia de pudrición de raíces. El raspado superficial de la zona afectada permitió observar la presencia de esporas hialinas, filiformes, aciculares, con 4 a 7 septos, de longitud variable entre 50 y 70 μm y diámetro entre 1,8 y 2,8 μm (**Figura 2**).

En la siembra en medio AA + SE, al cabo de 20 días se observaron colonias de desarrollo lento con 0,7 cm de diámetro en promedio, de color gris verdoso muy claro, de bordes enteros, y que produjeron conidias hialinas, filiformes, rectas a curvadas, con 3-6 septas, mayoritariamente con 4-5 y ocasionalmente con 7 septas, aciculares, y una longitud promedio determinada en 87 conidias elegidas al azar, de 63,5 μm (40,9-81,9 μm) (**Cuadro 1**), y un diámetro de 1,9 a 2,8 μm . Las conidias se originaron agrupadas desde conidióforos libres, cortos, con ninguna o escasa ramificación (**Figura 3**). La longitud de las conidias resultó similar a lo señalado por Nicholson *et al.* (1991), para aislamientos de *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides* de Inglaterra (**Cuadro 1**).

Pruebas de patogenicidad

En la prueba de patogenicidad efectuada en tubos de ensayo, a los 30 días se observó en 10 de las 12 plantas la presencia de hojas amarillentas en los tubos inoculados y un menor desarrollo de éstas. En la base de las mismas se observó una coloración café pálida a oscura, longitudinal, de 0,5 a 1,5 cm, en algunos casos circundando el tallo (**Figura 4**). El examen de la zona afectada bajo el microscopio óptico, permitió observar masas estromáticas o placas de infección (**Figura 5**) con hifas corredizas desarrollándose sobre el tejido del hipocotilo y entre las láminas foliares internas, además de sitios de penetración de hifas que conforman una especie de anillo o collar (**Figura 6**). Todas estas estructuras corresponden a las descritas por Daniels (1993). Las plantas testigo presentaron un mayor desarrollo que las inoculadas con el patógeno, con hojas verdes y ausencia de síntomas de la enfermedad en la base de las cañas. De la siembra del tejido afectado proveniente de las plantas inoculadas con el hongo patógeno, a los 25-30 días se obtuvo el desarrollo de colonias características de *P. herpotrichoides*.



Figura 1. Cañas de trigo var. SNA 400 con lesiones elípticas, típicas de la mancha ocular.
Figure 1. Stems of wheat cv. SNA 400 with elliptical “eye” lesions, typical of eyespot.



Figura 2. Conidias de *Pseudocercospora herpotrichoides* obtenidas por raspado de tejido desde plantas de trigo infectadas (40X).
Figure 2. Conidia of *Pseudocercospora herpotrichoides* obtained from infected wheat plants by scraping the affected tissue (40X).



Figura 3. Desarrollo de *Pseudocercospora herpotrichoides* en medio AA + estreptomicina (40X).
Figure 3. Growth of *Pseudocercospora herpotrichoides* on AA + streptomycin medium (40X).

AA: agar agua

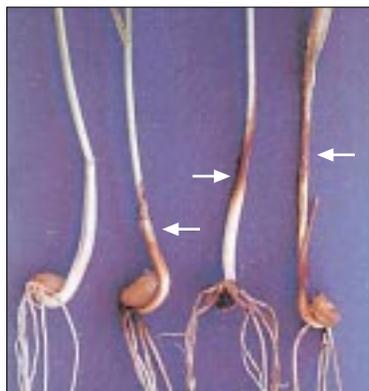


Figura 4. Plantas de trigo var. Otto-Baer inoculadas con *Pseudocercospora herpotrichoides* aislado de la zona de Traiguén. Una planta testigo (izq.) y tres plantas inoculadas mostrando las zonas afectadas (flechas).
Figure 4. Wheat plants cv. Otto-Baer inoculated with *Pseudocercospora herpotrichoides* isolated from the Traiguén farmland area. One check plant (left) and three inoculated ones showing the affected zones (arrows).

Figure 4. Wheat plants cv. Otto-Baer inoculated with *Pseudocercospora herpotrichoides* isolated from the Traiguén farmland area. One check plant (left) and three inoculated ones showing the affected zones (arrows).



Figura 5. Placas de infección observadas en las vainas foliares internas de las plantas de trigo inoculadas (25X).
Figure 5. Infection plaques observed in the internal leaf sheaths of inoculated wheat plants (25X).



Figura 6. Sitios de penetración de hifas de *Pseudocercospora herpotrichoides* observadas en las vainas foliares internas de plantas de trigo inoculadas, con la formación de anillos o collares de mucílago extracelular (flecha) (40X).
Figure 6. Penetration sites of *Pseudocercospora herpotrichoides* hyphae observed in the internal leaf sheaths of inoculated wheat plants, with the formation of extracellular mucilage collars (arrow) (40X).

Cuadro 1. Longitud de conidias (μm) de *Pseudocercospora herpotrichoides* obtenidas desde aislamientos de la zona de Traiguén, IX Región, Chile, comparadas con aislamientos de Inglaterra y Alemania.**Table 1. Length of conidia (μm) of *Pseudocercospora herpotrichoides* obtained from isolates from Traiguén locality, 9th Region, Chile, compared to isolates from England and Germany.**

Especie /variedad	País de origen	Rango de longitud	Longitud promedio
<i>P. herpotrichoides</i> var. <i>herpotrichoides</i>	Inglaterra ^a	43,8 – 80,6	62,2
<i>P. herpotrichoides</i> var. <i>herpotrichoides</i>	Alemania ^b	35,0 – 80,0	52,0
<i>P. herpotrichoides</i> var. <i>acuformis</i>	Alemania ^b	43,0 – 120,0	65,0
<i>P. herpotrichoides</i>	Chile	40,9 – 81,9	63,5

^a Nicholson *et al.* (1991).

^b Nirenberg, 1981 (citado por Daniels, 1993).

En la prueba de patogenicidad efectuada en macetas plásticas con la inoculación de anillos de cañas de trigo colonizadas con el hongo patógeno, a los 20-25 días se observó una notoria amarillez de todas las plantas inoculadas y menor desarrollo de éstas. La zona de inoculación presentó una evidente coloración café a café oscuro, circundando completamente el tallo en la mayoría de los casos, o con el desarrollo de lesiones elípticas longitudinales características de mancha ocular en 4 de 20 plantas. Al observar la zona basal de las láminas foliares bajo el microscopio óptico, se detectó la presencia de placas de infección típicas del agente infeccioso, y los sitios de penetración de las hifas con la formación de collares o anillos de exudados mucilaginosos alrededor de estos sitios. Las plantas testigo presentaron un mayor desarrollo, con láminas foliares verdes y ausencia de síntomas en la base de las cañas.

Prospección de sementeras de trigo

Tanto la prospección de sementeras de trigo como la evaluación de plantas en laboratorio, determinaron la presencia de la enfermedad en las localidades de Mulchén y Santa Bárbara en la VIII Región; Traiguén, Quilquén, Quino, Galvarino, Lautaro y Perquenco en la IX Región; y en los sectores de Cudico y el camino San Pablo a Trumao, en la X Región.

CONCLUSIONES

La sintomatología observada en las plantas afectadas provenientes de la zona de Traiguén, los resultados obtenidos en las observaciones macro y microscópicas del tejido afectado, las características morfológicas del hongo aislado, la forma y tamaño de las conidias, los resultados de las pruebas de patogenicidad, la formación y características de las placas de infección y sitios de infección observadas en las láminas foliares internas del hipocotilo de las plantas inoculadas, permiten identificar la sintomatología descrita como la enfermedad conocida como “mancha ocular del trigo”, y al organismo aislado como *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, hongo Deuteromycete causante de esta patología. Además, de acuerdo a las características de las conidias obtenidas de los aislamientos de la zona de Traiguén, los resultados sugieren que se trataría de *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides*.

La enfermedad se encontró afectando con particular intensidad a sementeras de trigo ubicadas en suelos rojos-arcillosos y transicionales de la zona comprendida entre Quilquén y Galvarino, en la IX Región. También fue detectada en localidades de la VIII y X regiones.

Esta corresponde a la primera detección de la presencia de la mancha ocular y su agente causal afectando sementeras de trigo en Chile.

LITERATURA CITADA

- Creighton, N. 1989. Identification of W-type and R-type of *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Plant Pathol.* 38:484-493.
- Daniels, A. 1993. Differentiation of *Pseudocercospora herpotrichoides* pathotypes. p. 9-27. In Palmer, G.D. (ed.) *Exploring the depths of eyespot*. Schering AG, Berlin, Germany.
- Fitt, B.D., A. Goulds, T.W. Hollins, and D.R. Jones. 1990. Strategies for control of eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) in UK winter wheat and winter barley. *Ann. Appl. Biol.* 117:473-486.
- Hunter, T. 1989. Occurrence of *Tapesia yallundae*, teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides*, on unharvested wheat culms in England. *Plant Pathol.* 38:598-603.
- Jones, D. 1993. Importance of eyespot compared with other diseases. p. 105-109. In Palmer, G.D. (ed.) *Exploring the depths of eyespot*. Schering AG, Berlin, Germany.
- King, J., and M. Griffin. 1985. Survey of benomyl resistance in *Pseudocercospora herpotrichoides* on winter wheat and barley in England and Wales in 1983. *Plant Pathol.* 34:272-283.
- Murray, T.D. 1992. *Pseudocercospora*. p. 149-152. In Singleton, L., J.D. Mihail, and C.M. Rush (eds.) *Methods for research in soilborne phytopathogenic fungi*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Nicholson, P., T. Hollins, and H. Rezanoor. 1993. Classification of a world-wide collection of isolates of *Pseudocercospora herpotrichoides* by RFP analysis of mitochondrial and ribosomal DNA and host range. *Plant Pathol.* 42:58-66.
- Nicholson, P., T.W. Hollins, H.N. Rezanoor, and K. Ananthawat-Jonsson. 1991. A comparison of cultural, morphological and DNA markers for the classification of *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Plant Pathol.* 40:584-594.
- Wallwork, H., and B. Spooner. 1988. *Tapesia yallundae* – The teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91:703-705.
- Wiese, M.V. 1977. *Compendium of wheat diseases*. 106 p. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.