

IDENTIFICACIÓN DE *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner, ESTADO TELOMÓRFICO DE *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron.) Deighton var. *herpotrichoides*, AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA OCULAR DEL TRIGO EN LA ZONA SUR DE CHILE

Identification of *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner, teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron.) Deighton var. *herpotrichoides*, the causal agent of eyespot of wheat in southern Chile

O. Andrade^{1*}

ABSTRACT

RESUMEN

From wheat (*Triticum aestivum* L.) culms collected at the end of January, 1995 from farmland affected by a severe outbreak of eyespot, located in southern Chile (38°14' S, 72°38' W), the presence of small, 0.2 to 0.5 mm of diameter, black apothecia at the base of the culms were observed with a stereo microscope. On analyzing these structures, cylindrical to fusoid asci, of 35 to 38 μm x 5.9 to 7.4 μm were also observed. After 24 h in a humidity chamber, the apothecia discharged hyaline, fusoid, 0-1 septate, rounded end ascospores, with an average size of 8.9 μm (7.4 to 10.3) x 2.07 μm (1.95 to 2.34). Monoascosporic cultures effected in a water-agar (WA) + rifampicin medium, originated after 30-35 days colonies with the development of conidia characteristic of *Pseudocercospora herpotrichoides* var. *herpotrichoides*. The pathogenicity tests carried out on 12-day old wheat seedlings, with colonies developed from monoascosporic cultures, resulted in the development of characteristic symptoms of eyespot at the end of 30 days. The morphology of the apothecia, the asci, and the ascospores, as well as the development of characteristic conidia of *P. herpotrichoides* obtained from monoascosporic cultures, and the pathogenicity test carried out on wheat seedlings, demonstrated the presence of *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner, the teleomorphic state of *P. herpotrichoides* (Fron.) Deighton var. *herpotrichoides*, in southern Chile. This is the first identification of *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides* in Chile, and in the American continent.

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

En cañas de trigo (*Triticum aestivum* L.) colectadas a fines de enero de 1995 desde un potrero fuertemente afectado por mancha ocular, en el sur de Chile (38°14' lat. Sur, 72°38' long. Oeste), se observó bajo el microscopio estereoscópico la presencia de pequeños apotecios, sésiles, de color negro, y de 0,2 a 0,5 mm de diámetro. Al analizar estas estructuras se observaron ascos en forma de palizada, cilíndricos a fusoides, de 35-38 μm x 5,9 a 7,4 μm . A las 24 horas de mantenidos en cámara húmeda, los apotecios descargaron ascosporas unicelulares, hialinas, fusiformes, de extremos redondeados, con 0 a 1 septo, y con un tamaño promedio de 8,9 μm (7,4 a 10,3) x 2,07 μm (1,95 a 2,34). Cultivos monoascospóricos efectuados en agar-agua (AA) + rifampicina, dieron origen al cabo de 30-35 días, a colonias con el desarrollo de conidias características de *Pseudocercospora herpotrichoides* var. *herpotrichoides*. Pruebas de patogenicidad efectuadas en plántulas de trigo de 12 días de edad, con colonias desarrolladas desde cultivos monoascospóricos, indujeron al cabo de 30 días plantas con síntomas típicos de mancha ocular. Tanto las características de los apotecios, de los ascos y ascosporas, como el desarrollo de *P. herpotrichoides* a partir de estas ascosporas, y el desarrollo de síntomas típicos de mancha ocular obtenidos en las plántulas de trigo inoculadas con cultivos monoascospóricos, permitieron concluir sobre la presencia de *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner, fase telomórfica de *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides*, en la zona sur de Chile. Esta identificación corresponde a la primera referencia para Chile y para el continente americano.

Palabras clave: mancha ocular, enfermedad de trigo, *Tapesia yallundae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Triticum aestivum* L.

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

E-mail: oandrade@inia.cl * Autor para correspondencia.

Recibido: 19 de julio de 2004. Aceptado: 9 de diciembre de 2004.

INTRODUCCIÓN

La mancha ocular del trigo (*Triticum aestivum* L.), enfermedad causada por el hongo discomicete *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner (Anamorfo = *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron.) Deighton), se caracteriza por la pudrición de la base del tallo, desarrollo de espigas blancas y tendadura de las sementeras. Es una de las patologías más importantes en este cultivo en siembras de otoño de las zonas frías y húmedas, particularmente del noroeste de Europa, noroeste de EE.UU. y Nueva Zelanda (Lucas *et al.*, 2000). Se encuentra distribuida en algunos países de África (Túnez, Sud África, Marruecos), la mayoría de los países de Europa, Japón, América del Norte (EE.UU. y Canadá) (Murray, 1992; Lucas *et al.*, 2000), y recientemente también en Sud América (Chile), donde se identificó por primera vez la presencia de este patógeno el año 1994, en siembras de trigo de la zona sur del país (Andrade, 2003).

La identificación original del agente causal como *P. herpotrichoides*, dio paso posteriormente al reconocimiento de dos variedades del hongo asociados a la sintomatología de campo. Éstos, inicialmente descritos como tipo W y tipo R en base al grado de patogenicidad en trigo y centeno (*Secale cereale* L.) y al desarrollo en medios de cultivo, corresponden en la actualidad a *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides* y *P. herpotrichoides* var. *acuformis*, respectivamente, denominación basada en la morfología de las esporas, en la imposibilidad de cruzamiento entre ellos, y en estudios genéticos fundamentados en secuenciación y marcadores moleculares (Nicholson *et al.*, 1995; Robbertse *et al.*, 1995, citados por Lucas *et al.*, 2000).

El estado sexual de *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides*, *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner, fue reportado por primera vez en Australia (Wallwork y Spooner, 1988). Posteriormente, su presencia fue descrita en Nueva Zelanda (Sanderson y King, 1988), Inglaterra (Hunter, 1989), Bélgica (Moreau *et al.*, 1989, citado por Daniels, 1993), Alemania (King, 1990), y Dinamarca (Sindberg *et al.*, 1994). En el caso de *P.*

herpotrichoides var. *acuformis*, su estado telomórfico *Tapesia acuformis* (Boerema, R. Pieters & Hamers) Crous, sólo ha sido observado en Alemania (King, 1990), Inglaterra (Dyer *et al.*, 1994) y Bélgica (Moreau y Maraitte, 1995). No existen reportes sobre la presencia de *T. yallundae* en el continente americano. En EE.UU., Douhan *et al.* (2002) lograron inducir la formación de apotecios de esta especie bajo condiciones de inoculación artificial con dos aislamientos compatibles del hongo. Por otra parte, los mismos autores detectaron la presencia de *T. acuformis* en siembras naturalmente infectadas del noroeste norteamericano.

El estado sexual de *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides* no se encuentra descrito en Chile, como tampoco en el continente americano. En este trabajo se describe la presencia de la fase telomórfica de *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides* en trigos afectados por mancha ocular en el sur de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis macro y microscópico de plantas afectadas por mancha ocular, y aislamiento del patógeno

Plantas de trigo de las variedades SNA 400 y Francia afectadas por la enfermedad, se colectaron a inicios del año 1995 en la localidad de Quilquén, comuna de Traiguén, IX Región (38°14' lat. Sur, 72°38' long. Oeste). La observación bajo microscopio estereoscópico de las bases de las cañas afectadas permitió detectar la presencia de pequeños cuerpos de color café oscuro a negros, sésiles, de 0,2 a 0,5 mm de diámetro (Figura 1), sobre las vainas foliares basales externas del tejido afectado. Pequeños segmentos de tejido conteniendo estos cuerpos se colocaron adheridos con vaselina a la tapa de placas de Petri con medio agar-agua (AA) + rifampicina (RF) (1 mg L⁻¹), para inducir la descarga de ascosporas. Secciones de estos cuerpos obtenidos con bisturí y depositados sobre un portaobjetos limpio, se observaron bajo el microscopio de luz (Carl Zeiss, Mod. Standard, Oberkochen, Alemania), provisto de contraste de fases, para identificar y medir la presencia de ascos y de ascosporas. Las

mediciones se realizaron sobre un total de siete apotecios, quince ascos y cuarenta y dos ascosporas.

Ascosporas individuales en proceso de germinación, obtenidas de la descarga de los apotecios en medio AA + RF al cabo de 48 h, se identificaron bajo el microscopio de luz y se transfirieron asépticamente bajo campana de flujo laminar a nuevas placas con medio AA. Las placas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio por 10 días y luego a 10 a 12°C de temperatura por otros 20 días.

Prueba de patogenicidad

Cilindros de cañas de trigo sanas, de 1 cm de largo, obtenidas desde siembras de trigo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Centro Regional de Investigaciones Carillanca, Temuco, Chile, se lavaron dos veces con agua corriente y luego dos veces con agua destilada, se esterilizaron en autoclave dos veces consecutivas por 20 min cada vez, se dejaron enfriar y luego se inocularon con micelio desarrollado por 20 días, en medio AA, desde cultivos mono ascospóricos (Macer, 1966). Los matraces inoculados se mantuvieron por 35-45 días para permitir la completa colonización de los cilindros.

Un total de cinco macetas con cuatro plantas de trigo de la var. Otto-Baer, de 12 días de edad, desarrolladas en macetas plásticas desechables de 150 mL de capacidad, con mezcla 1:1 de suelo y arena esterilizada, se inocularon al estado de una hoja, insertando un cilindro colonizado hasta la base de las plantas, cubriendo parte del mismo con arena fina esterilizada, regando con agua destilada y dejado en invernadero por 30 días hasta la evaluación de las mismas. Otras tres macetas con cuatro plantas cada una se dejaron como testigos, inoculando con cilindros de cañas esterilizados, pero sin el hongo.

La evaluación de las plantas inoculadas se realizó a través de la observación visual de lesiones en el tejido de la zona inoculada, la observación bajo microscopio de las vainas foliares desprendidas de la zona de inoculación, la tinción del hipocotilo con una solución al 10% de Tinta azul (Pelikan Hannover, Alemania) en 25% de ácido acético y

su observación bajo microscopio de luz para detectar las placas de infección del hongo y los sitios de penetración de las hifas (Andrade, 2003). Junto con la evaluación, tejido proveniente de las plantas inoculadas se desinfectó superficialmente con hipoclorito de sodio al 1,5% i.a. por 2 min, separando posteriormente las láminas, cortándolas en pequeños trozos y sembrando estos últimos en AA + estreptomycin (St) con el propósito de reaislar el agente causal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis macro y microscópico de plantas afectadas por mancha ocular, y aislamiento del patógeno

La observación macro y microscópica de los cuerpos detectados en la base de las cañas, y dispuestos en cámara húmeda, permitió identificarlos como apotecios, los cuales se presentaban turgentes y abiertos por la parte superior, en forma de copa, sésiles (Figura 1), con un tamaño de 0,3 a 0,6 mm de diámetro (Figura 2). La observación bajo el microscopio de luz de tejido proveniente de estos cuerpos, determinó la presencia de ascos cilíndricos a fusoides, de 35 a 38 μm x 5,9 a 7,4 μm (Figura 3), y de ascosporas hialinas, fusoides, de extremos redondeados, con 0 a 1 septo, de 8,9 μm (7,4 a 10,3) x 2,07 μm (1,95 a 2,34) (Figura 4). Tanto el tamaño de los apotecios presentes en la base de las cañas de trigo, como de los ascos y ascosporas, resultaron muy similares a los descritos por Hunter (1989) para la fase sexual observada en Inglaterra.

Como resultado de la transferencia de ascosporas individuales a medio AA (Figura 5), al cabo de 30 días se obtuvo el desarrollo de colonias de color gris verdoso muy claro, de bordes enteros, y de conidias hialinas, filiformes, rectas a semi curvadas, con 4-6 septos, mayoritariamente con 5 septos, con la zona distal aguzada y la opuesta redondeada, con una longitud promedio de 61,5 μm (rango de 47,2 a 72,4 μm), y un diámetro de 2,2 μm (rango 1,9 a 2,4 μm) (Figura 6). Las conidias se originaban agrupadas desde conidióforos libres, cortos, con ninguna o escasa ramificación. El tamaño y morfología de las conidias resultó similar a lo señalado por Nirenberg (citado por Daniels, 1993), y Murray



Figura 1. Apotecios de *Tapesia yallundae* sobre rastrojo de trigo var. SNA 400 de la zona de Traiguén, afectado por mancha ocular (5X).
Figure 1. Apothecia of *Tapesia yallundae* on wheat cv. SNA 400 culms from Traiguén farmland affected by eyespot (5X).

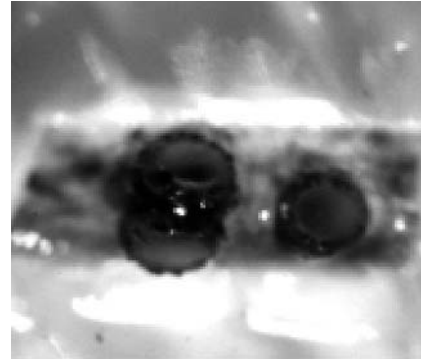


Figura 2. Apotecios de *Tapesia yallundae* después de 24 h de mantenidos en cámara húmeda (8X).
Figure 2. Apothecia of *Tapesia yallundae* after 24 h in a humidity chamber (8X).



Figura 3. Ascis de *Tapesia yallundae* obtenidos desde apotecios presentes en rastrojo de trigo (40X).
Figure 3. Asci of *Tapesia yallundae* observed under the light microscope (40X).

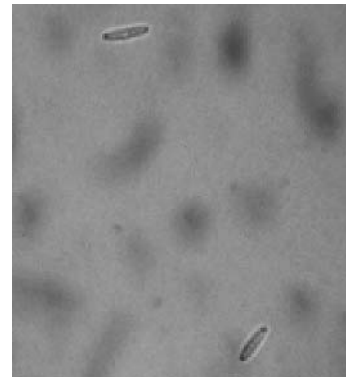


Figura 4. Ascosporas de *Tapesia yallundae* liberadas desde un apotecio sobre agua destilada (40X).
Figure 4. Ascospores of *Tapesia yallundae* released from an apothecium in distilled water (40X).



Figura 5. Ascosporas de *Tapesia yallundae* germinando en medio agar agua + rifampicin (40X).
Figure 5. Ascospores of *Tapesia yallundae* germinating in water agar + rifampicin medium (40X).



Figura 6. Conidias de *Pseudocercospora herpotrichoides* desarrolladas a partir de ascosporas individuales de *Tapesia yallundae*, en medio agar agua (40X).
Figure 6. Conidia of *Pseudocercospora herpotrichoides* developed from single ascospores of *Tapesia yallundae*, in water agar medium (40X).

(1992), para aislamientos de *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides* de Inglaterra, al igual que lo señalado por Andrade (2003), para aislamientos de *P. herpotrichoides* obtenidos desde plantas afectadas por mancha ocular, obtenidas desde el mismo lugar de las muestras analizadas en el presente trabajo.

Pruebas de patogenicidad

En la prueba de patogenicidad se observó a los 25 a 30 días una notoria amarillez de las plantas inoculadas y menor desarrollo de éstas, en comparación a las no inoculadas. La zona de inoculación se presentaba de coloración café a café oscuro. Al observar bajo el microscopio de luz las vainas foliares de la zona inoculada, se determinó 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 material mucilaginoso alrededor de estos sitios (Daniels, 1993; Andrade, 2003). Las plantas testigo sin inocular 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 en medio AA + St de tejido afectado proveniente de las plantas inoculadas con el hongo patógeno, se obtuvo a los 25 a 30 días el desarrollo de colonias características de *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides*.

La presencia del estado sexual de *P. herpotrichoides* tiene una significativa importancia, por las implicancias en la epidemiología de la enfermedad. El estado telomórfico provee una fuente de infección adicional de tipo primaria, una forma de dispersión a gran distancia por las características de las descarga de las ascosporas

desde el apotecio y su diseminación a través del aire, y más importante aún, la generación de variación genotípica en el patógeno producto de la recombinación genética (Sanderson y King, 1988; Dyer y Lucas, 1995; Milgroom, 1996). La recombinación genética puede acelerar la aparición de razas más virulentas que afecten variedades otrora resistentes, y también de razas del patógeno resistentes a fungicidas, método empleado comúnmente en el control de la enfermedad.

CONCLUSIONES

La sintomatología observada en las plantas afectadas en la zona de Traiguén, los resultados obtenidos en las observaciones macro y microscópicas de los apotecios presentes en el tejido afectado, las características morfológicas de los apotecios, ascos y ascosporas, el desarrollo en medio AA de colonias con conidias típicas de *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides* a partir de cultivos mono ascospóricos, la forma y tamaño de tales conidias, los resultados de las pruebas de patogenicidad, con la inducción de síntomas típicos de mancha ocular, la formación y características de las placas de infección y sitios de infección observadas en las vainas foliares internas del hipocotilo de las plantas inoculadas, permitieron identificar la presencia del hongo discomicete *Tapesia yallundae* Walwork & Spooner, en plantas de trigo afectadas por mancha ocular en la zona sur de Chile.

Ésta corresponde a la primera referencia sobre la presencia en forma natural de la fase sexuada de *P. herpotrichoides* var. *herpotrichoides* en Chile, y en el continente americano.

LITERATURA CITADA

- Andrade, O. 2003. Identificación de *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron.) Deighton, agente causal de la mancha ocular del trigo, en la zona sur de Chile. *Agric. Téc. (Chile)* 63:368-374.
- 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.
- Douhan, G.W., T.D. Murray, and P.S. Dyer. 2002. Species and mating-type distribution of *Tapesia yallundae* and *T. aciformis* and occurrence of apothecia in the U.S. pacific northwest. *Phytopathology* 92:703-709.
- Dyer, P.S., and J.A. Lucas. 1995. Incidence of apothecia of *Tapesia yallundae* at set-aside sites in England and sensitivity of the ascospore offsprings to the fungicides benomyl and prochloraz. *Plant Pathol.* 44:796-804.
- Dyer, P.S., M. Papaikonomou, J.A. Lucas, and J.F. Peberdy. 1994. Isolation of R-type progeny of *Tapesia yallundae* from apothecia on wheat stubble in England. *Plant Pathol.* 43:1039-1044.
- Hunter, T. 1989. Occurrence of *Tapesia yallundae*, teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides*, on unharvested wheat culms in England. *Plant Pathol.* 38:598-603.
- King, A.C. 1990. First record of *Tapesia yallundae* as the teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides* var. *aciformis*, and its occurrence in the field in the Federal Republic of Germany. *Plant Pathol.* 39:44-49.
- Lucas, J.A., P.S. Dyer, and T.D. Murray. 2000. Pathogenicity, host-specificity, and population biology of *Tapesia* spp., causal agent of eyespot disease of cereals. *Advances in Botanical Research* 33:225-258.
- Macer, R.C. 1966. Resistance to eyespot disease (*Cercospora herpotrichoides* Fron) determined by a seedling test in some forms of *Triticum*, *Aegilops*, *Secale* and *Hordeum*. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 67:389-396.
- Milgroom, M.G. 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:457-477.
- Moreau, J.M., and H. Maraite. 1995. Bipolar heterothalms in *Tapesia yallundae* for the two varieties of the anamorph *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Mycol. Res.* 99:76-80.
- Murray, T.D. 1992. *Pseudocercospora*. p. 149-152. In Singleton, L., Mihail, J. D. and C.M. Rush (eds.) *Methods for research in soilborne phytopathogenic fungi*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Sanderson, F.R., and A.C. King. 1988. Field occurrence of *Tapesia yallundae*, the teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Aust. Plant Pathol.* 17:20-21.
- Sindberg, S., L. Munk, and H. Schulz. 1994. *Tapesia yallundae*, the teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides* observed for the first time in Denmark. *Zeitschrift Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz.* 101:316-320.
- Wallwork, H., and B. Spooner. 1988. *Tapesia yallundae* – the teleomorph of *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91:703-705.