

DALTON, Enrique G. *

RESUMEN

Durante el verano de 1991 se observó en una plantación de *Pinus taeda* de 4 años de edad, ubicada en Santo Tomé, Corrientes, plantas muertas o con un marcado amarillamiento de la copa. La aparición de estos síntomas coincidió con un período de estrés hídrico.

Las plantas muestreadas revelaron un estrangulamiento del cuello producido por raíces laterales de la planta. Además se observaron raíces jóvenes con la corteza destruida y abundantes microesclerocios de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. El hongo fue aislado y posteriormente inoculado en plantas jóvenes de *Pinus taeda*, produciendo síntomas similares a los observados a campo.

Los esclerocios fueron multiplicados sobre discos de celofán en agar papa glucosado. Por miligramo de muestra se obtuvieron 2695 ± 303 esclerocios. La longitud de los mismos osciló entre 36 y 234 μm , siendo la media de $103,5 \pm 1,3 \mu\text{m}$.

Palabras claves: *Macrophomina phaseolina* - *Pinus taeda*.

SUMMARY

During the summer of 1991 it was possible to observe in a four year-old plantation of *Pinus taeda* in the area of Santo Tomé, Corrientes, dead plants or plants with a marked yellow colouring at the top. The appearance of these symptoms coincided with the period of stress due to lack of water.

* Ing. Agr., Técnico de la E.E.A. INTA - Montecarlo, Misiones.

PRESENCIA DE *Macrophomina phaseolina* EN PLANTAS DE *Pinus taeda*, SANTO TOME, CORRIENTES

The sampled plants revealed strangling of the neck produced by side roots. Moreover, it was possible to notice new roots with destroyed cortical tissues and sclerotia of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. The fungus was isolated and later inoculated in young plants of *Pinus taeda* producing symptoms similar to the ones observed on the field.

Sclerotia were multiplied over cellophane disks in potato dextrose agar. 2695 ± 303 sclerotia were obtained per milligram of the sample. Their length was between 36 and 234 μm , being the average of $103,5 \pm 1,3 \mu\text{m}$.

Key words: *Macrophomina phaseolina* - *Pinus taeda*.

INTRODUCCION

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid [= *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby, = *Macrophoma phaseolina* Tassi, = *Sclerotium bataticola* Taub., = *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Britton-Jones] es un hongo parásito facultativo que produce una enfermedad conocida como podredumbre carbonosa o "charcoal rot". Ataca una gran variedad de cultivos herbáceos y leñosos

principalmente en países tropicales y subtropicales (7).

Se conocen más de 280 huéspedes susceptibles (4). En la Argentina se lo ha citado en maíz, maní, lupino, girasol y plantines de *Pinus taeda*. También puede producir daños de importancia variable en trigo, alfalfa, lino, cebada y avena (3, 8).

En coníferas los daños más importantes los produce en vivero, solo o en combinación con otros hongos (5, 12, 14, 15). Cuando *Macrophomina phaseolina* ataca a las plántulas produce damping-off, mientras que en etapas posteriores se observa detención del crecimiento, marchitamiento, decoloración del follaje y podredumbre de raíces.

Las plantas atacadas presentan abundantes microesclerocios ubicados en el interior de la corteza y en menor cantidad en el xilema. Los mismos son formas de resistencia que suelen encontrarse en el suelo y en los restos vegetales de los viveros infectados. Los exudados radiculares de las plantas cercanas estimulan su germinación (1, 9, 16).

En los tejidos afectados también se suelen encontrar fructificaciones asexuales (picnidios), pero en menor proporción que los microesclerocios.

Las características más sobresalientes de este hongo son: 1) Alta susceptibilidad a los efectos antagónicos de otros microorganismos del suelo, 2) Baja capacidad para crecer libremente en suelos no esterilizados y 3) Los esclerocios juegan un rol importante en la epidemiología de las enfermedades causadas por este patógeno (1, 6, 10, 15).

Macrophomina phaseolina es particularmente agresivo en hospedantes sujetos a un estrés fisiológico (1, 13). Condiciones de baja humedad en el suelo y altas temperaturas reducen la actividad de la microflora benéfica del suelo y afectan el vigor de las plantas. De esta manera se generan condiciones predisponentes para el desarrollo de este patógeno.

Otra característica importante de este hongo es la variación que puede existir entre aislamientos provenientes de un mismo hospedante pero de diferentes regiones. Dhingra, O. D. y Sinclair, J. B. (2) encontraron diferencias entre 9 aislamientos de

M. phaseolina correspondiente a diferentes zonas sojeras de los Estados Unidos. Se observaron diferencias en crecimiento, color y forma de las colonias, tamaño de los esclerocios y patogenicidad.

Durante el verano de 1991, coincidiendo con un período de estrés hídrico, se observó en una plantación de *Pinus taeda* de 4 años de edad, ubicada en Santo Tomé, Corrientes, plantas muertas o con un marcado amarillamiento de la copa.

En los muestreos realizados a campo sobre dichos ejemplares, se comprobó que el cuello de la raíz estaba estrangulado por las raíces laterales de la planta. También se pudo observar raíces jóvenes con la corteza destruida y abundantes microesclerocios de un hongo que posteriormente fue identificado como *Macrophomina phaseolina*.

En el presente trabajo, se informan los estudios realizados con *Macrophomina phaseolina* aislada de los ejemplares muestreados y los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad.

MATERIALES Y METODOS

1. Aislamiento y crecimiento de *Macrophomina* en medio de cultivo

El hongo fue aislado a partir de esclerocios extraídos de raíces afectadas. Los mismos fueron sembrados en cajas de Petri conteniendo 14 ml de agar papa glucosado, pH 6.0 (APG). La incubación se realizó en oscuridad a 30°C.

El crecimiento bajo las condiciones citadas fue evaluado sembrando un trozo de 3,5 mm de diámetro de micelio juvenil en el centro de 50 cajas de Petri conteniendo 14 ml de medio de cultivo. El diámetro de las colonias se midió cada 24 horas.

2. Pruebas de patogenicidad

Con el fin de confirmar la acción patogénica de *Macrophomina* se inocularon 10 plantas de *Pinus taeda* de 30 cm de altura. A cada planta se le practicó una herida a nivel del cuello. En la misma se colocó un trozo de 5 mm de diámetro de APG conteniendo hifas y esclerocios del hongo. Posteriormente las plantas fueron cubiertas con un plástico transparente y colocadas en una cámara de incubación a una temperatura

de 25-28°C y 16 horas de luz. La humedad en el interior de la bolsa se mantuvo mediante un algodón humedecido en agua.

Las cuatro plantas que se utilizaron como testigos recibieron el mismo tratamiento, pero en lugar de inocular el hongo se les colocó en la herida un trozo de APG.

3. Producción y medición de esclerocios de *Macrophomina*

Se utilizó la técnica propuesta por Papavizas y Klag (11). Se hirvieron en agua destilada discos de celofán de 8 cm de diámetro durante 30 minutos. Posteriormente fueron enjuagados con agua y colocados en el autoclave durante 15 minutos. Este paso se realizó colocando los discos en un vaso de precipitado conteniendo agua destilada. Finalmente fueron transferidos a cajas de Petri de 83 mm de diámetro con 12 ml de APG.

En el centro de cada caja se sembró un trozo de 3,5 mm conteniendo micelio joven de *Macrophomina* y se incubó en oscuridad a 30°C durante 7 días.

Las colonias producidas fueron sacadas del celofán con una espátula de acero y puestas en agua destilada estéril. Con el fin de separar los esclerocios del micelio, el conjunto fue colocado en una licuadora a baja velocidad durante 3 minutos. El material obtenido se secó sobre un papel de filtro a temperatura ambiente y a continuación fue descompactado presionándolo suavemente entre dos hojas de papel y realizando movimientos circulares.

La viabilidad de los esclerocios producidos se determinó sembrando 200 en APG e incubándolos en oscuridad a 30°C. Previamente fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,25% durante 8 minutos. Las observaciones se realizaron al cuarto día.

La longitud promedio (diámetro mayor) se obtuvo midiendo 2000 esclerocios bajo un microscopio de campo claro y la cantidad de esclerocios producidos por miligramo se determinó pesando y contando 10 muestras. El conteo se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

RESULTADOS

1. Asilamiento de *Macrophomina*

En la Figura 1, se observa el crecimen-

to promedio de *M. phaseolina* en APG a 30°C. Los bordes de la caja de Petri fueron alcanzados por el micelio del hongo al quinto día.

Al principio las colonias fueron de color blanquecino, para luego adquirir una tonalidad verdosa en la zona central.

Finalmente las colonias se oscurecieron en toda su extensión. En este estado se observaron abundantes microesclerocios del hongo (Foto 1). No se observaron picnidios en el medio de cultivo.

2. Pruebas de patogenicidad

Veinte días después de la inoculación del hongo, las plantas comenzaron a manifestar un amarillamiento generalizado de la parte aérea. La corteza ubicada por arriba y abajo del área de inoculación se desprendía fácilmente con la ayuda de una aguja de disección. En la cara interna de la corteza y en el leño se observaban a simple vista abundantes microesclerocios de *Macrophomina phaseolina*.

Todas las plantas inoculadas con el hongo presentaron los mismos síntomas y signos. Por el contrario las plantas testigo mantuvieron su coloración y vigor normal.

3. Producción y medición de esclerocios

Los esclerocios producidos mediante la metodología anteriormente citada presentaron una longitud promedio de $103,5 \pm 1,3$ μm con un nivel de confianza del 95% (Foto 2). En la Figura N° 2, se indican los porcentajes de microesclerocios para diferentes intervalos de clase. El 79,05% presentaron un tamaño comprendido entre 70 y 140 μm , siendo las dimensiones extremas de 36 y 234 μm .

La cantidad promedio de microesclerocios por miligramo de muestra, fue de 2695 ± 303 con un nivel de confianza del 95 por ciento.

De los esclerocios sembrados en APG y tratados con hipoclorito de sodio, el 93,5% dieron origen a nuevas colonias, observándose un porcentaje mínimo de contaminantes (1%).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El aislamiento de *Macrophomina phaseolina* a partir de plantas de *Pinus taeda* localizadas en Santo Tomé, Corrientes, de-

Figura 1: Crecimiento de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid en APG a 30°C y oscuridad

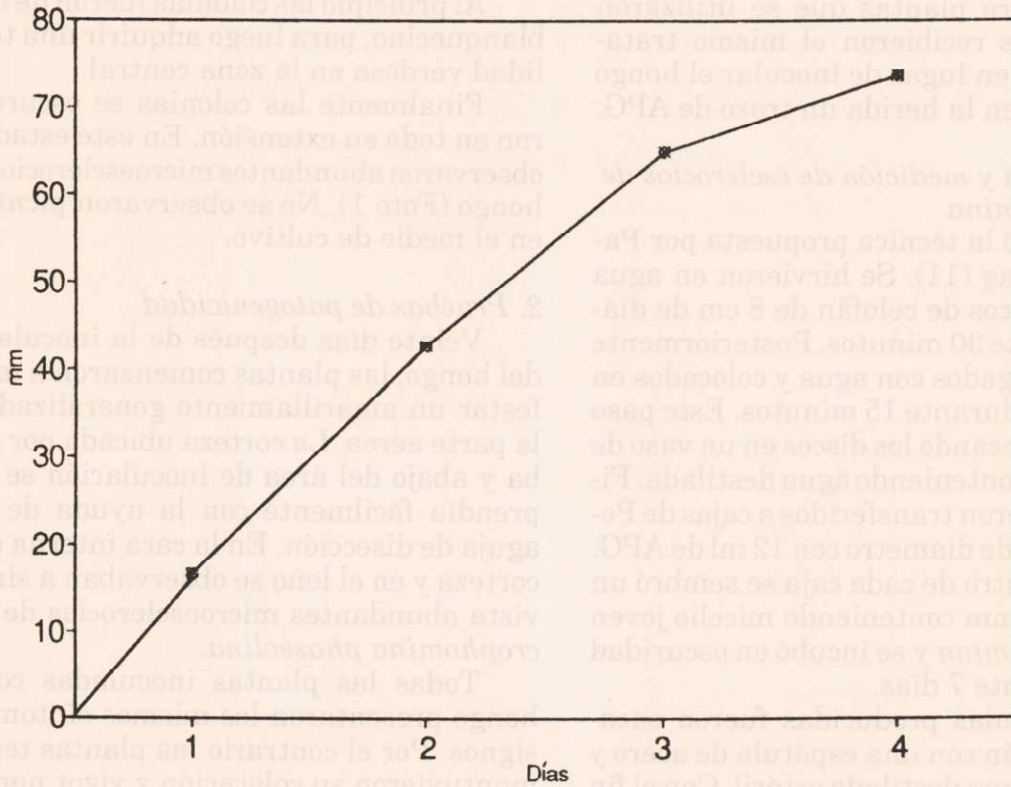
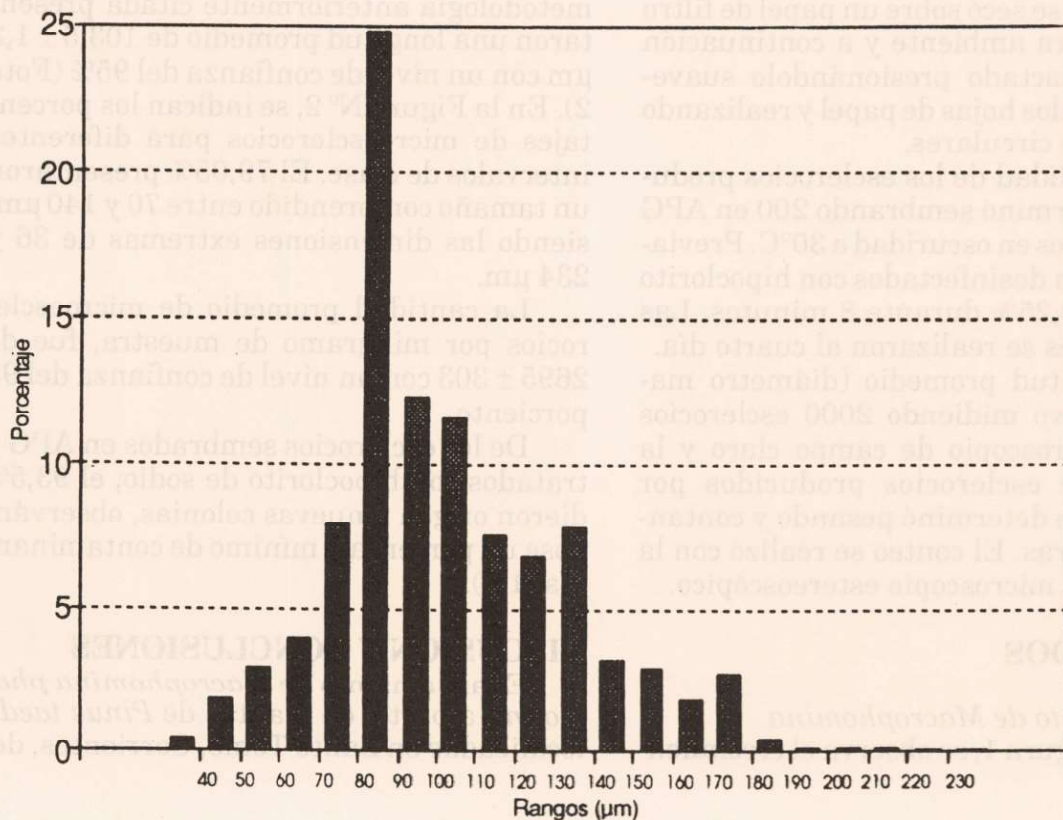


Figura 2: Distribución porcentual según tamaño de esclerocios



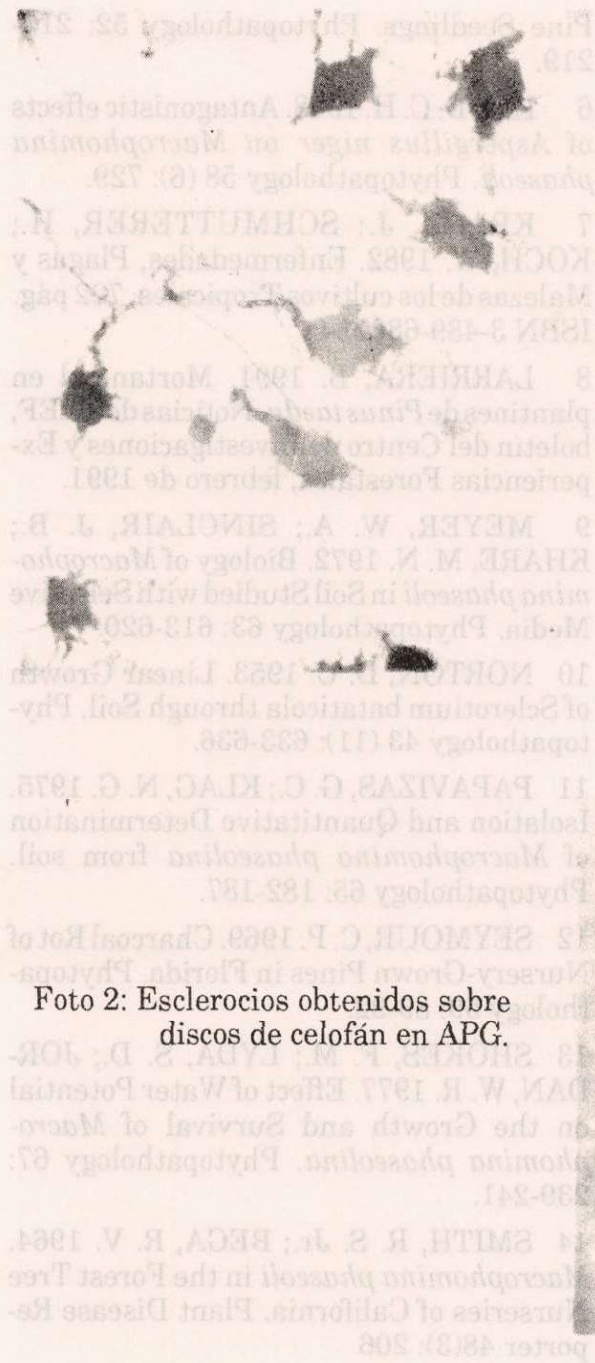


Foto 2: Esclerocios obtenidos sobre discos de celofán en APG.

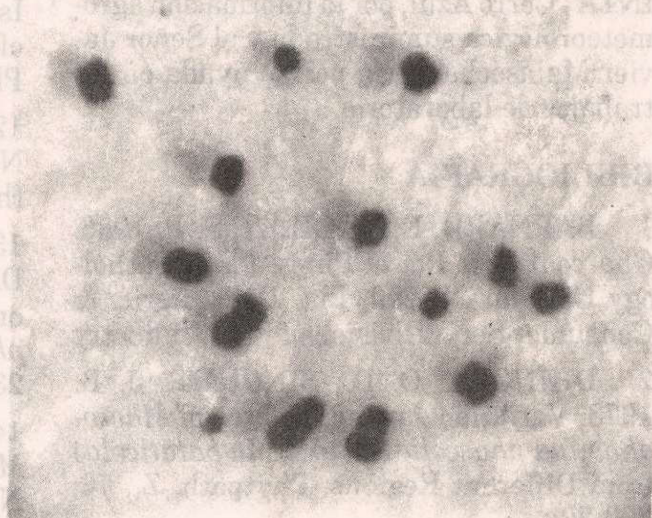
mostró ser altamente virulento al provocar la muerte de las plantas inoculadas.

Debido a esta característica es factible suponer que la podredumbre encontrada en raíces jóvenes de plantas muestreadas se debió a un efecto directo del hongo y no a una actividad saprofítica del mismo. Esta hipótesis se vería fortalecida si se tiene en cuenta que durante los meses de enero, febrero y marzo, se registró un déficit hídrico en dicha zona y las plantas sufrieron un

estrés fisiológico, agravado por el estrangulamiento del cuello de la raíz. Dichas condiciones habrían favorecido el desarrollo del hongo.

La metodología utilizada para producir esclerocios en cantidad demostró ser altamente eficiente al permitir obtener en corto plazo y sin gran complejidad un alto porcentaje de esclerocios viables. Por lo tanto se la considera recomendable para ensayos que involucren inoculaciones artificiales de

Foto 1 : Esclerocios de *Macrophomina phaseolina* desarrollados en APG. (80 X)



Debido al comportamiento diferencial que puede existir entre aislamientos de diferentes zonas, sería importante complementar los trabajos de caracterización de los posibles biotipos existentes en la región.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Marta Aguiar Saba Mendes de EMBRAPA, Brasil, por la identificación taxonómica de *Macrophomina phaseolina*, al Señor José Angel Olvera, de la E. A. E. N. A. por la identificación de *Macrophomina phaseolina* en las raíces de las plantas muestreadas.

3. FRESA R. 1962. Relación patógena de *Macrophomina phaseolina* en distintos cultivos agrícolas. *Revista de Fisiología Vegetal*, 1: 1-10.

suelos utilizando como inóculo a los esclerocios del hongo.

La desinfección de los esclerocios con hipoclorito de sodio no solo redujo el nivel de contaminantes sino que además no afectó la capacidad de germinación de los esclerocios. De cualquier manera y considerando que ciertos aislamientos son susceptibles al hipoclorito (11), sería aconsejable calcular las dosis y tiempos de aplicación más adecuadas para aislamientos de diferentes regiones.

Debido al comportamiento diferencial que puede existir entre aislamientos de diferentes zonas, sería importante completar los trabajos de caracterización de los posibles biotipos existentes en la región.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Marta Aguiar Sabo Mendes de EMBRAPA, Brasil, por la identificación taxonómica de *Macrophomina phaseolina*, al Señor José Angel Olinuck, de la E.E.A. INTA - Cerro Azul, por la información agrometeorológica suministrada y al Señor Javier Malasechavarría por su ayuda en los trabajos de laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- 1 BARNARD, E. L.; GILLY, S. P. 1986. Charcoal Root Rot of Pines. Plant Pathology Circular Nº 290, Fla. Dept. Agric. & Consumer Serv. Division of Plant Industry
- 2 DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. 1973. Variation Among Isolates of *Macrophomina phaseoli* (*Rhizoctonia bataticola*) from Different Regions. Phytopath. Z., 76: 200-204.
- 3 FRESA, R. 1962. Relación patógena de *Macrophomina phaseoli* en distintos cultivos agrícolas. Revista de Investigaciones Agrícolas XVI (4): 415-426.
- 4 FERNANDEZ VALIELA, M. V. 1979. Introducción a la Fitopatología, Volumen IV: Hongos y Mycoplasmas (3ra. edición), 613 páginas. Colección científica del INTA.
- 5 HODGES, C. S. 1962. Black Root Rot of Pine Seedlings. Phytopathology 52: 210-219.
- 6 HSI, D. C. H. 1968. Antagonistic effects of *Aspergillus niger* on *Macrophomina phaseoli*. Phytopathology 58 (6): 729.
- 7 KRANZ, J.; SCHMUTTERER, H.; KOCH, W. 1982. Enfermedades, Plagas y Malezas de los cultivos Tropicales, 722 pág. ISBN 3-489-68826-0.
- 8 LARRIERA, B. 1991. Mortandad en plantines de *Pinus taeda*. Noticias del CIEF, boletín del Centro de Investigaciones y Experiencias Forestales, febrero de 1991.
- 9 MEYER, W. A.; SINCLAIR, J. B.; KHARE, M. N. 1972. Biology of *Macrophomina phaseoli* in Soil Studied with Selective Media. Phytopathology 63: 613-620.
- 10 NORTON, D. C. 1953. Linear Growth of *Sclerotium bataticola* through Soil. Phytopathology 43 (11): 633-636.
- 11 PAPAVIDAS, G. C.; KLAG, N. G. 1975. Isolation and Quantitative Determination of *Macrophomina phaseolina* from soil. Phytopathology 65: 182-187.
- 12 SEYMOUR, C. P. 1969. Charcoal Rot of Nursery-Grown Pines in Florida. Phytopathology 59: 89-92.
- 13 SHOKES, F. M.; LYDA, S. D.; JORDAN, W. R. 1977. Effect of Water Potential on the Growth and Survival of *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology 67: 239-241.
- 14 SMITH, R. S. Jr.; BEGA, R. V. 1964. *Macrophomina phaseoli* in the Forest Tree Nurseries of California. Plant Disease Reporter 48(3): 206.
- 15 SMITH, W. H. 1969. Comparison of Mycelial and Sclerotial Inoculum of *Macrophomina phaseoli* in the Mortality of Pine Seedlings Under Varying Soil Conditions. Phytopathology 59:379-382.
- 16 SMITH, W. H. 1969. Germination of *Macrophomina phaseoli* sclerotia as affected by *Pinus lambertiana* root exudate. Can. J. Microbiol. 15: 1387-1391.