

Variabilidad cultural, morfológica y patogénica entre aislados de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes caracteres Cultural, morphological and pathogenic variability among isolates of *Sclerotium rolfsii* Sacc

Carlos Alberto Hernández Medina.¹Lidcay Herrera Isla²

1. CUM Camajuaní. Joaquín Paneca 62. Camajuaní. 52500. Villa Clara, CUBA
2. CIAP-UCLV. Carretera a Camajuaní Km. 5 1/2. Santa Clara.54830. CUBA

E-mail: cahm862@uclv.edu.cu ; lidcayhi@uclv.edu.cu

RESUMEN. Con el objetivo de buscar evidencias de variabilidad se evaluaron una serie de caracteres culturales, morfológicos y patogénicos en 8 aislados de *Sclerotium rolfsii* Sacc. procedentes de frijol y girasol. Existe variabilidad entre ellos en la Tasa de Crecimiento Micelial, número y diámetro de los esclerocios formados, densidad del micelio, presencia de rizomorfos, duración del proceso de formación de esclerocios y patogenicidad sobre frijol y girasol. Estas diferencias unidas a la presencia de incompatibilidad y antagonismo entre los aislados permiten discernir la presencia de diferentes razas del patógeno.

Palabras clave: Aislados, frijol, girasol, patogenicidad, *Sclerotium rolfsii*, razas, variabilidad.

ABSTRACT. A series of cultural, morphological and pathogenic characters were evaluated in 8 isolated of *Sclerotium rolfsii* Sacc. coming from bean and sunflower. Variability exists among them in the Rate of Micelial Growth, number and diameter of formed esclerocios, density of micelium, rizomorphes presence, duration of esclerotium formation process and patogenicity on beans and sunflower. These differences, united to the presence of incompatibility and antagonism among the isolated allow us to discern presence of different races of pathogen.

Key words: Isolates, bean, sunflower, patogenicity, *Sclerotium rolfsii*, races, variability.

INTRODUCCIÓN

Sclerotium rolfsii Sacc. es un hongo fitopatógeno muy importante (Hernández, 2011). Causa tizón, *damping off* y pudrición de las raíces, cuello de la raíz, tallos, tubérculos y frutos, en innumerables cultivos (Quintero, 2002). Debido a su extensa gama de hospedantes se distribuye en todas las regiones agrícolas donde encuentran altas temperaturas y humedad en el suelo. (Aycock, 1966; Marinelli y March, 2002; Hernández y Quintero, 2002)

Punja y Grogan (1982) reportaron que 62 aislados procedentes de 19 hospedantes y 15 áreas geográficas tuvieron diferencias en crecimiento micelial, producción de esclerocios y frecuencia de formación de las fíbulas.

Weerapat y Schroeder (1966) reportaron el fenómeno de aversión y formación de zonas de

antagonismo entre diferentes aislados de *S. rolfsii* procedentes de arroz, algodón y maní crecidos *in vitro*. Encontraron formación de esclerocios a lo largo de la línea de separación entre las colonias. Cuando se parearon colonias del mismo aislado no se presentó este fenómeno.

Punja y Grogan (1983) realizaron un estudio de las interacciones hifales y antagonismo entre aislados de *S. rolfsii* procedentes de diferentes cultivos y lugares, y crearon y aplicaron una escala para medir la intensidad de antagonismo.

Los objetivos fundamentales de este estudio fueron: Determinar las características culturales de 8 aislados de *S. rolfsii*, investigar las características patogénicas de los mismos y buscar evidencias de variabilidad entre ellos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos experimentales *in vitro* y en macetas se realizaron en los Laboratorios de Fitopatología del Centro de Investigaciones Agropecuarias y del Instituto de Biotecnología de las Plantas, pertenecientes a la Universidad Central de las Villas, Cuba. Fueron utilizados 8 aislados de *S. rolfsii* obtenidos de plantas de frijol y de girasol con síntomas típicos de pudrición del pie por *S. rolfsii* encontradas en el campo.

Determinación de los principales caracteres culturales en los 8 aislados de *S. rolfsii*.

Los 8 aislados fueron sembrados en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa siguiendo la siguiente metodología: Se removieron, con un horador de 5 mm. de diámetro, discos en el borde de colonias de *S. rolfsii* de 3 días de edad. Fueron transferidos para el centro de placas de Petri, de 10 cm. de diámetro, conteniendo 20 ml. de medio de cultivo. Las placas fueron incubadas a temperatura de 25,5° C; expuestas a luz fluorescente de intensidad 2000 lux. El crecimiento micelial se observó midiendo diariamente el diámetro de la colonia, en sentidos diametralmente opuestos. Las mediciones se iniciaron a las 24 horas después de la siembra de las placas y continuaron hasta que el hongo cubrió toda la superficie del medio de cultivo.

Para el cálculo de la tasa de crecimiento se utilizó la fórmula propuesta por Lilly y Barnett (1951):

$$T.C. = \frac{CL_2 - CL_1}{T_2 - T_1}$$

Donde:

T.C.=Tasa de Crecimiento.

CL₁=Crecimiento lineal en la primera medición.

CL₂=Crecimiento lineal, segunda medición.

T₁=Momento de la primera medición. (24 h.)

T₂ = Momento en que se realizó la segunda medición. (72 h.)

Además se midieron o contaron los siguientes parámetros:

- Número de esclerocios maduros producidos en cada placa de Petri, a los 21 días de incubación.
- Diámetro promedio de 20 esclerocios maduros por placa. Se midió el largo y ancho de los

esclerocios para después promediarlos. Si eran redondos solamente se midió su diámetro.

c) Densidad del micelio de cada aislado de *S. rolfsii* y presencia de rizomorfos en cada aislado.

e) Tiempo que demoró cada aislado en llegar las diferentes fases del proceso de formación de esclerocios.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 8 tratamientos, representados por los 8 aislados del hongo, con 4 repeticiones.

Pruebas de patogenicidad de los 8 aislados de *S. rolfsii* en frijol y girasol.

Se hicieron las pruebas con la variedad de frijol Turrialba-4 y la variedad de girasol CIAP J-E-94. Se tomaron contenedores de polietileno usados para sembrar las vitroplantas de papa en las biofábricas. En cada compartimiento con tierra se abrió un orificio de 2 cm. de profundidad por 1.5 cm. de diámetro. En el fondo se colocó una semilla que se cubrió con 0.5 cm. de suelo. Luego se colocó un disco de micelio de *S. rolfsii*, de 0.5 cm. de diámetro, crecido durante 72 horas en una placa de Agar Papa Dextrosa y se cubrió con suelo. Las semillas así inoculadas con los 8 aislados se regaron diariamente y se colocaron en los canteros protegidos del área de fase intermedia para evaluar su germinación y la presencia de síntomas.

Ambos experimentos se sembraron en un diseño experimental completamente aleatorizado, con 4 repeticiones y 8 tratamientos correspondientes a los aislados de *S. rolfsii* que se compararon.

Interacción entre los aislados de *S. rolfsii* en cultivo dual.

En este experimento se inocularon las placas, conteniendo 20 ml. de PDA, con discos de micelio de 72 horas de cada uno de los 8 aislados. Estos se parearon en todas las posibles combinaciones. Los discos fueron colocados en puntos opuestos de la placa, a 1,5 cm. de su borde. Las placas se incubaron a 25,5° C, con luz constante, durante 21 días. A los 3, 4 y 21 días de incubación se realizaron observaciones de límites de las colonias y presencia de áreas de inhibición entre ellas.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 36 tratamientos, representados por todas las formas en que se pueden parear los 8 aislados de *S. rolfsii*, con 4 repeticiones.

Los datos experimentales se analizaron estadísticamente con el paquete SPSS 8.0 para Windows en todos los experimentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación de medias por la Prueba de Mínima Diferencia Significativa, con un 1 % de probabilidad de error, entre los 8 aislados de *S. rolfsii*, mostró que los aislados Sf3 y Sg5 presentaron tasas de crecimiento micelial significativamente superiores a

Sg1, Sg8, y Sg10, los que no se diferenciaron entre sí y fueron superiores a Sf11 y Sf2. El aislado Sg6 presentó tasa de crecimiento intermedia entre el primero y segundo grupos (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de Crecimiento Micelial de 8 aislados de *S. rolfsii* a los 3 días de incubación

Aislado de <i>S. rolfsii</i>	Tasa de Crecimiento Micelial (micras/hora)	Diferencia estadística
Sg5	723.17	a*
Sg8	689.58	b
Sf2	622.67	c
Sg10	676.83	b
Sf3	725.67	a
Sg1	691.92	b
Sf11	648.17	c
Sg6	699.00	ab
M.D.S. (*1%) = 29.12		
C.V. = 2.21 %		

Tabla 2. Producción de esclerocios de 8 aislados de *S. rolfsii* con 21 días de incubación

Aislado de <i>S. rolfsii</i>	# de esclerocios por placa	Diferencia estadística
Sg5	328.0	a*
Sg8	261.2	b
Sf2	244.9	c
Sg10	201.9	e
Sf3	220.1	d
Sg1	233.2	cd
Sf11	271.3	b
Sg6	233.0	cd
M.D.S (*1%) = 14.05		
C.V. = 3.03 %		

Se encontraron diferencias significativas al 1 % de probabilidad de error en el número de esclerocios producidos entre los aislados de *S. rolfsii* (tabla 2). El aislado Sg5 produjo un número de esclerocios significativamente superior al de los aislados Sf11 y Sg8 que no difirieron entre si y que superaron al aislado Sf2. Los aislados Sg1 y Sg6 formaron un

grupo intermedio entre Sf2 y Sf3, mientras el aislado Sg10 tuvo la menor producción de esclerocios.

Se encontraron diferencias estadísticas significativas al 1 % de probabilidad de error entre los aislados de *S. rolfsii* en el diámetro de los esclerocios producidos (tabla 3).

Tabla 3. Diámetro de los esclerocios de 8 aislados de *S. rolfsii* con 21 días de incubación

Aislado de <i>S. rolfsii</i>	Diámetro de los esclerocios (micras.)	Diferencia estadística
Sg5	705.4	c
Sg8	637.8	f
Sf2	679.2	d
Sg10	674.9	d
Sf3	651.9	e
Sg1	745.2	a
Sf11	705.8	c
Sg6	726.8	b
M.D.S. (*1%) = 5.46		
C.V. = 0.425 %		

Tabla 4. Resultados de prueba de patogenicidad de 8 aislados de *S. rolfsii* en frijol y girasol

Aislados de <i>S. rolfsii</i>	% de plantas afectadas	Frijol y Girasol
Sg5	93.75ab* 62.50a	62.50a
Sg8	100.0a	62.50a
Sf2	93.75ab	59.38ab
Sg10	87.50b	40.62c
Sf3	100.0a	43.75bc
Sg1	100.0a	50.00abc
Sf11	93.75ab	40.62c
Sg6	93.75ab	40.62c
M.D.S. .399(*5%)		0.324(1%)
C.V. 9.635		10.45

El aislado Sg1 produjo un diámetro de esclerocios significativamente superior al de Sg6 que superó a Sf11 y Sg5 que no difirieron entre si y superaron a los aislados Sf2 y Sg10. Estos superaron al aislado Sf3 mientras el aislado Sg8 tuvo el menor diámetro de esclerocios para un 1 % de probabilidad de error.

En la tabla 4 se observan diferencias significativas al 1 % de probabilidad de error para la patogenicidad, en plantas de frijol entre los 8 aislados de *S. rolfsii*. Los aislados Sg8, Sf3 y Sg1 fueron significativamente superiores al aislado Sg10. Los aislados Sg5, Sf2, Sf11 y Sg6 no difirieron entre si ni con los aislados de los grupos anteriores. También se encontraron diferencias de patogenicidad entre los aislados de *S. rolfsii* sobre plantas de girasol, al 1 % de probabilidad de error. Los aislados Sg8 y Sg5 superaron a los aislados Sg10, Sf11 y Sg6 sin diferencias entre ellos. Los Sf2, Sg1 y Sf3 formaron un grupo de patogenicidad

intermedia sin diferencias entre si ni con los grupos superior e inferior.

Los resultados anteriores muestran que existe variabilidad en la patogenicidad sobre dos especies vegetales entre los 8 aislados de *S. rolfsii*. Esto es un indicador de que, a pesar de encontrarnos en presencia de aislados de una misma especie de hongo, su virulencia varía de uno a otro.

Existen reportes de Cooper (1961), Epps *et al.* (1951) y Weerapat y Schroeder (1966) sugiriendo que las diferencias de virulencia existentes entre aislados de *S. rolfsii* indican la existencia de razas del hongo. En otros patógenos fungosos se han separado razas fisiológicas usando como indicador variedades diferenciales de plantas de comportamiento conocido.

La densidad del micelio y la formación de rizomorfos o cordones de micelio en los 8 aislados tuvo un comportamiento variable (tabla 5).

Tabla 5. Características del micelio de los 8 aislados de *S. rolfsii* incubados en medio Papa Dextrosa Agar a 25,5° C

Aislado de <i>S. rolfsii</i>	Características del Micelio	
	Densidad	Rizomorfos
Sg5	Denso	Abundantes
Sg8	Escaso	Abundantes
Sf2	Escaso	Abundantes
Sg10	Denso	Abundantes
Sf3	Denso	Abundantes
Sg1	Muy denso	Ausentes
Sf11	Denso	Abundantes
Sg6	Muy denso	Abundantes

Tabla 6. Duración de la formación de esclerocios en 8 aislados de *S. rolfsii*

Aislado de <i>S. rolfsii</i>	Horas transcurridas hasta completar cada etapa.			
	Agregado	Esfera blanca	Esfera crema	Madurez
Sg5	72 d*	120 e	168 f	266 g
Sg8	120 b	192 b	241 c	358 c
Sf2	146 a	217 a	272 b	387 b
Sg10	118 b	216 a	288 a	428 a
Sf3	144 a	194 b	240 c	368 c
Sg1	96 c	168 c	217 d	339 d
Sf11	72 d	122 e	170 ef	288 f
Sg6	72 d	144 d	182 e	312 e
MDS* _{p=0,01}	14.3	14.1	12.3	10.7
C.V.	8.89	4.16	2.79	1.58

El proceso de formación de los esclerocios del hongo se inició con la agregación de hifas. Estas conformaron unas pequeñas puntuaciones blancas después de las 72 horas de incubación. Los pequeños agregados evolucionaron hasta tomar forma esférica, ovoide o irregular aumentando su tamaño rápidamente. Posteriormente adquirieron coloración crema, pasando a color marrón oscuro cuando maduraron. Este proceso coincide con lo reportado por Hernández (2000) en sus estudios de laboratorio sobre *S. rolfsii*.

La formación de los esclerocios siguió el mismo proceso en los 8 aislados de *S. rolfsii* estudiados. Los aislados solo se diferenciaron entre si en el tiempo que demoraron en pasar cada una de las etapas del proceso. (Tabla 6).

Goto (1952) reportó que la existencia de diferencias entre aislados de *S. rolfsii* en los caracteres morfológicos y en la habilidad para formar el estado basidial podían ser indicadores de la existencia de razas del patógeno. Sin embargo usar las diferencias morfológicas para diferenciar posibles razas se

dificulta mucho pues son muy influidas por variaciones en factores externos como el medio de cultivo y el ambiente.

Características culturales del pareamiento de aislados de *S. rolfsii* a partir de discos de micelio.

Cinco días después de la transferencia de los discos de micelio para las placas en cultivo dual se pudieron observar tres comportamientos diferenciados en el desarrollo de las colonias del hongo:

a) Cuando se pusieron en cultivo dual discos de micelio de un mismo aislado siempre el micelio procedente de ambos discos se cruzó creciendo sin dificultades en sentidos contrarios. No se observaron zonas de inhibición en el lugar de contacto entre las colonias. Tampoco se encontró formación abundante de esclerocios en la línea de cruce de las colonias. Estos se distribuyeron uniformemente en las placas.

b) Al parrear discos de micelio de diferentes aislados las 2 colonias crecieron exactamente con las mismas características que las descritas

anteriormente. Se cruzan en el punto de contacto avanzando los micelios en sentido contrario sin formar una zona de inhibición entre las colonias ni formarse esclerocios en la línea de delimitación entre ellas. Se comportaron como si se aparearan discos de un mismo aislado.

c) Cuando las colonias de los 2 aislados diferentes se encontraron no hubo superposición de una sobre la otra y los micelios no se cruzaron. Hubo una clara aversión entre ellas. Al transcurrir el tiempo de incubación, en la línea de contacto se formó una zona de demarcación que separó nítidamente las 2 colonias.

A lo largo de la línea de separación ocurrió la producción de esclerocios de cada aislado, siempre dentro de su correspondiente área. Generalmente a ambos lados de la línea de demarcación se pudieron diferenciar las colonias principalmente por la densidad micelial y la cantidad y distribución de los esclerocios producidos.

En la tabla 7 se describen las interacciones entre los 8 aislados de *S. rolfsii*. En base a este comportamiento se formaron grupos homogéneos con los aislados que se comportaron igual en cultivo dual, sin presencia de aversión entre ellos.

Tabla 7. Interacciones entre 8 aislados de *S. rolfsii* en cultivo dual

Aislados	Sg5	Sg8	Sf2	Sg10	Sf3	Sg1	Sf11	Sg6
Sg5	=	=	+	+	=	+	+	=
Sg8		=	+	+	=	+	+	=
Sf2			=	+	+	+	+	+
Sg10				=	+	+	+	+
Sf3					=	+	+	=
Sg1						=	+	+
Sf11							=	+
Sg6								=
LEYENDA: = Compatibilidad + Incompatibilidad								

Tabla 8. Grupos formados en base a la diferenciación de los 8 aislados por su comportamiento en cultivo dual

Grupo	Aislados
I	Sg5 Sg8 Sf3 Sg6
II	Sf2
III	Sg10
IV	Sg1
V	Sf11

Se colocaron en 5 grupos diferentes los aislados cuyas colonias formaron claras líneas de aversión entre ellas. La clasificación de los aislados en grupos en base a su comportamiento en cultivo dual se muestra en la tabla 8.

Punja y Grogan (1983) reportaron que los aislados de *S. rolfsii* que no muestran antagonismo e

incompatibilidad al parearse son somáticamente compatibles y presumiblemente similares genéticamente. Basándose en ello establecieron metodológicamente la separación de aislados de *S. rolfsii* en grupos similares genéticamente. Esto lo hacen en función de la incompatibilidad entre los subgrupos de aislados incapaces de crecer unidos e intercambiar sus contenidos citoplasmáticos.

Las diferencias citoplasmáticas o genéticas que hacen incompatibles a los aislados de *S. rolfsii* pueden ser resultado de su aislamiento en el espacio, su adaptación a diferentes nichos ecológicos, su coevolución con especies o variedades diferentes de plantas y/o su sometimiento a diferentes presiones de selección (Hernández, 2000). Esto los ha convertido en razas diferentes, con comportamiento cultural, morfológico y patogénico distinto.

CONCLUSIONES

1. Existe una marcada variabilidad entre los 8 aislados de *S. rolfsii* estudiados, expresada en diferencias culturales, morfológicas y patogénicas e incompatibilidad y antagonismo entre ellos.

2. La variabilidad encontrada es indicio de la formación de varios grupos de aislados de esta especie que se pueden separar como diferentes biotipos, razas o patotipos en función de su comportamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aycock, B. Stem rot and other diseases caused by *rofsii*. *Agric. Exp. Station. Techn. Bull.* (174):202. 1966.
2. Cooper, W. E. Strains of, resistance to, and antagonists of *Sclerotium rofsii*. *Phytopathology*. 58(5):113-116. 1961.
3. Epss, W. M.; J. C. Patterson; I. E. Freeman. Physiology and parasitism of *Sclerotium rofsii*. *Phytopathology*. 41(4):245-256. 1951.
4. Goto, K. *Sclerotium rofsii* Sacc. in perfect stage, specially in reference to genetics, morphology in primary stage, relations of environments to sporulation and the significance of the stage for the fungus. *Tokai-Kinki Nat. Agric. Exp. Stn. Spec. Bull.* 18(1): 84. 1952
5. Hernández, C. Caracterización cultural, morfológica y patogénica de *S. rofsii* Sacc. y algunos estudios básicos para su control. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Agropecuarias. Santa Clara, Cuba, 74 p. 2000.
6. Hernández, C.; E. Quintero. Posibilidad de uso de la rotación de cultivos como parte de un sistema de manejo integrado de *Sclerotium rofsii* Sacc para el cultivo del frijón en la zona central de Cuba. *Cuadernos de Fitopatología*, 19(74):124-126. 2002.
7. Hernández, C. Manejo Integrado de plagas y enfermedades de las plantas en Cuba. Ed. LAP LAMBERT Academic Publishing. Leipzig. Alemania, 2011, 162 p.
8. Lilly, V. G.; H.L Barnes. Growth. En: Lilly, V. G.; H. L. Barnes. Physiology of the fungi. McGraw-Hill, New York, USA, 244 p. 1951.
9. Marinelli, Adriana; G. March. Enfermedades del maní en Argentina. Guía ilustrada para su identificación de campo. Editorial Biglia impresores. Buenos Aires, Argentina, 244 p. 2002.
10. Punja, Z. K.; R. J. Grogan. Factors contributing to variability in *Sclerotium rofsii*. Abstract. *Phytopathology*. 72(7):932. 1982.
11. Punja, Z. K.; R. G. Grogan. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia (Sclerotium) rofsii*. *Phytopathology*. 73(9):1279-1284. 1983.
12. Quintero, E.; C. Pérez.; C. Andreu.; D. Martín; O. Saucedo.; U. Alvarez.; Z. Martínez.; A. Rivero.; J. Rojas.; M. Díaz.; C. A. Hernández. Manejo sostenible del cultivo del frijón. Resultado de investigaciones. *Centro Agrícola*. (4):79-80. 2002.
13. Weerapat, P.; H. W. Schroeder. Effect of soil temperature on resistance of rice to seedling blight caused by *Sclerotium rofsii*. *Phytopathology*. 56(6):640-644. 1966.

Recibido: 10/01 /2012

Aceptado: 20/11 /2013