

RECONOCIMIENTO DE ENFERMEDADES FUNGOSAS TRANSMITIDAS POR SEMILLA EN GERMOPLASMA DE *Brachiaria* spp.

Sandra X. García D¹, Benjamín Pineda L.²

104956

¹ Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Biología, ² Laboratorio de Sanidad de Germoplasma, Unidad de Recursos Genéticos, CIAT, AA 6713, Cali.

RESUMEN

El germoplasma del género *Brachiaria* que se conserva en la Unidad de Recursos Genéticos en el CIAT y que comprende más de 700 accesiones de 27 especies es regenerado e incrementado en Popayán (2° 25'n; 76° 40'w), en donde se desconoce la microflora que suele afectar la producción de semilla, requiriéndose así información fitopatológica al respecto. El presente estudio se realizó para determinar cual o cuales hongos transmitidos por semillas se encontraban afectando el proceso de incremento de las especies *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria jubata*. Se seleccionaron para el efecto muestras de semillas de *B. brizantha*, *B. decumbens* y *B. jubata*, cosechadas en Popayán durante 1998 y el primer semestre de 1999, y conservadas en el secador de aire frío. Las muestras se acondicionaron debidamente y se les realizaron en el laboratorio los análisis respectivos, utilizando los métodos de PDA-Ac, cámara húmeda ("Blotter test") e identificación mediante observaciones al esteroscopio y/o microscopio óptico. Los resultados obtenidos mostraron que las accesiones de las tres especies del estudio se encontraban afectadas por hongos de los géneros *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Curvularia* spp., *Chaetomium* spp., *Drechslera* spp., *Cladosporium* spp., *Epiccocum* spp., *Nigrospora* spp., *Penicillium* spp., *Phoma* spp. y otros no identificados; determinándose que *Drechslera* spp. y *Phoma* spp. fueron los de mayor incidencia. Los análisis mediante cámara húmeda mostraron que en las especies *B. brizantha* y *B. decumbens* la incidencia de *Drechslera* spp. fue del 11,25% y 9,14%, mientras que para *Phoma* sp. correspondió al 7,75% y 5,57%. En *B. jubata* la incidencia de *Phoma* sp., fue del 8,1% y el de *Drechslera* spp. 1,3%. En los análisis mediante el método siembra en medio de cultivo PDA-Ac para *B. brizantha* se determinó que *Drechslera* spp. y *Phoma* spp. presentaron incidencia del 5,89% y 12,33%; del 6,86% y 9,07% en *B. decumbens* y del 0,3% y 5,6% para *B. jubata*, respectivamente. Las pruebas de patogenidad con *Drechslera* spp. y *Phoma* spp., realizadas en plántulas y cariósides de las accesiones de *B. brizantha* y *B. decumbens* y no en *B. jubata* por no obtención de plantas, mostraron que dichos hongos ocasionaron infecciones en plántulas y redujeron la germinación, afectando la calidad fitosanitaria de las semillas; revisando por lo tanto importancia cuarentenaria, especialmente para actividades relacionadas con la distribución del germoplasma.

Palabras claves: Colombia, cuarentena vegetal, *Drechslera* spp., pasturas, *Phoma* spp., sanidad de semillas

ABSTRACT

The *Brachiaria*'s germplasm collection maintained in CIAT, contains more than 700 accessions of 27 identified species. The process of regeneration and increase of germplasm is carried out in Popayán (2° 25'N; 76° 40'W) under field conditions. There is little available information about *Brachiaria* seed-borne fungal diseases, requiring phytopathological information to the reference, reason for the who was carried out the present study to establish the kind of fungi transmitted by seeds affecting the process of the increasing of the species *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria jubata*. For this research seed samples of *B. brizantha*, *B. decumbens* and *B. jubata*, harvested in Popayán during 1998 and the first semester of 1999, and conserved in the dryer of cold air were selected. The samples were conditioned properly and carried out them analysis of seed health in the laboratory using a blotter test and agar plate methods, and identification of the fungi by means of microscopical analysis. The gotten outputs showed that the used accesions of the three species of *Brachiaria* were affected by the fungi as *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Curvularia* spp., *Chaetomium* spp., *Drechslera* spp., *Cladosporium* spp., *Epiccocum* spp., *Nigrospora* spp., *Penicillium* spp., *Phoma* spp., and another unidentified fungi. The measured fungi incidence showed that *Drechslera* spp., and *Phoma* spp. were the high incidence fungi observed. In the *B. brizantha* species and *B. decumbens* met, in the analysis by means of humid camera, that the incidence of *Drechslera* spp. it was from the 11.25% and 9.14%, while for *Phoma* spp. it returned at 7.75% and 5.57%. In *B. jubata* the incidence of *Phoma* sp, it you was from the 8.1% and the of *Drechslera* spp. 1,3%. In the analysis by means of the agar plate method (PDA-Ac) for *B. brizantha* was determined that *Drechslera* spp. and *Phoma* spp. showed an incidence of the 5.89% and 12.33%, of the 6.86% and 9.07% in *B. decumbens* and of the 0.3% and 5.6% for *B. jubata*, respectively. Pathogenicity test with *Drechslera* spp. and *Phoma* spp., which were the fungi with high incidence, caused severe symptoms in seedlings. The result of this study should be important for determining the risk of these fungi in the safe movement of *Brachiaria* germplasm.

Key Words: Colombia, *Drechslera* spp., *Phoma* spp., Plant quarantine, Seed Health, Tropical pastures

INTRODUCCIÓN

El pasto del género *Brachiaria*, tiene más de 100 especies que se encuentran distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, en donde se utiliza por su alto valor nutricional en el pastoreo del ganado (Miles, et al., 1998). Además, su adaptabilidad a suelos pobres y ácidos ha permitido una rápida distribución intercontinental (Lenné y Trutmann, 1994), con la consiguiente expansión de las praderas destinadas al pastoreo. Debido a éste incremento las enfermedades también han aumentado de manera considerable

y se han convertido en una limitación de creciente importancia para su producción (Miles et al., 1998). La propagación de la mayoría de especies pertenecientes a este género se hace por medio de semillas, siendo éstas, el sistema más efectivo para la diseminación de los patógenos. (Pineda, 1996).

Factores como la incorporación de nuevas tierras para la agricultura en áreas de diversidad genética, la sustitución de cultivos primitivos por nuevas variedades y la destrucción de los hábitat. (Dickie et al, 1984), entre otros, han obligado a la creación de Bancos de Germoplasma, con el fin de

conservar el material biológico y genético.

El proceso de conservación de germoplasma incluye el refrescado e incremento de semilla, el cual generalmente se efectúa bajo condiciones de campo, en donde los patógenos, especialmente hongos, suelen afectar su producción. Cuando dichos patógenos son transmitidos por semilla pueden ocasionar deterioro durante el almacenamiento o epifitias cuando se establecen en un cultivo; además de, cuando son de interés cuarentenario, impedir el intercambio seguro de germoplasma.

El género *Brachiaria* es afectado por numerosas enfermedades, cuya importancia y severidad varía según el ecosistema (Sabanas isohipertérmicas, isotérmicas, Bosques lluviosos y estacionales), la especie atacada, la clase de agente causal (hongos, bacterias, virus, insectos, etc.) (Lenné y Trutmann, 1994) y el órgano de la planta. En las semillas se han encontrado especies de hongos pertenecientes al género *Drechslera* spp., (Neergaard, 1977; Chagas y Oliveira, 1983), *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Pyricularia* sp., *Cercospora* sp., *Helminthosporium* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp. y *Stemphylium* sp. (Kelemu, 1993 y Lenné, 1990), y sobre las inflorescencias el hongo *Sphacelia* sp. (Fernandes, et al. 1995) ocasionando deterioro y mala calidad del germoplasma.

En Colombia, el CIAT conserva más de 700 accesiones de 27 especies de *Brachiaria*, ya identificadas, cuyo proceso de incremento y rejuvenecimiento se hace en Popayán (2° 25'N; 76° 40'W). Bajo condiciones de campo dicho material suele ser atacado por hongos que al ser transmitidos por semillas afectan la calidad fitosanitaria e impiden el intercambio seguro de germoplasma.

Debido a la poca información disponible al respecto, y al desconocimiento de la microflora que afecta la producción de semilla se adelantó el presente estudio, cuyo objetivo fue determinar cual o cuales hongos transmitidos por semillas se encontraban afectando el proceso de incremento de las especies *B. brizantha*, *B. decumbens* y *B. jubata*; así como la realización de pruebas de patogenicidad para aquellos géneros de hongos que presentasen la mayor incidencia y revistiesen importancia cuarentenaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

La investigación se realizó en el Laboratorio de Sanidad de Germoplasma de la Unidad de Recursos Genéticos (URG) del CIAT durante el semestre B de 1999 y el B de 2000.

Procedencia, acondicionamiento y escarificación de las semillas

Para el estudio se utilizaron muestras de semillas de 18 accesiones de *B. brizantha*, 7 de *B. decumbens* y 5 de *B. jubata*, mantenidas en el Banco de Germoplasma de Pastos Tropicales en el CIAT. Las semillas habían sido cosechadas durante 1998 y en el primer semestre de 1999 y se encontraban en el secador de aire frío, bajo condiciones controladas de temperatura (22°C) y humedad relativa (45%). Al inicio del estudio se acondicionaron siguiendo los procedimientos de limpieza utilizados en la URG los cuales incluyen tamizado, soplado, selección visual y empaque. Después de haber pasado por este proceso y con el fin de eliminar las glumas

que presentaban las semillas, se escarificaron con ácido sulfúrico (H₂SO₄) del 96%. Para lo anterior, se tomaron 2000 semillas de cada accesión y se colocaron en un vaso de precipitado que contenía 5 mL de ácido, en donde permanecieron por un tiempo determinado dependiendo de la variedad, así: 10 minutos para *B. jubata*, 15 minutos para *B. decumbens* y 18 para *B. brizantha*. Una vez escarificadas las semillas se lavaron para eliminar los residuos del ácido y se procedió a almacenarlas en bolsas nuevas de papel hasta el momento en que se requerían para continuar con el estudio.

Análisis de sanidad

Para determinar el estado fitosanitario del germoplasma se programó el análisis de una muestra de 400 semillas, utilizando los métodos de incubación en cámara húmeda (blotter test) y en medio de cultivo, empleados tradicionalmente en la determinación del estatus fitosanitario de semillas, según se describe a continuación:

Cámara húmeda. De cada accesión se tomaron las primeras 200 semillas y dentro de una cámara de flujo laminar se sembraron en 10 platos de Petri de (150 x 25 mm), sobre una hoja plegada de papel absorbente humedecida con agua destilada, a razón de 20 semillas/plato. Una vez finalizada la siembra los platos con las semillas se colocaron en un cuarto de incubación con lámparas de luz blanca fría y azul negra, temperatura 20 -27°C y periodos alternantes de luz y oscuridad de 12 horas; en donde se mantuvieron durante 6 días

Medio de cultivo (PDA-Ac). Las restantes 200 semillas de cada accesión se desinfectaron con alcohol al 75% e hipoclorito de sodio al 1% durante 3 minutos respectivamente. Se distribuyeron en 40 cajas de Petri (100 x 15 mm) estériles con medio de cultivo PDA-Ac (Papa-Dextrosa-Agar Difco, 30 gr, agua 1L y ácido láctico), colocando cinco semillas por plato. Las cajas se mantuvieron durante 5 días bajo las mismas condiciones de incubación utilizadas para la prueba en cámara húmeda.

Análisis microscópico de las semillas. Transcurrido el periodo de incubación de las muestras se procedió a determinar la incidencia o porcentaje de semillas afectadas por cada uno de los géneros de hongos observados. Utilizando el estereoscopio y el microscopio se examinaron una a una las semillas, determinando la presencia ó ausencia de estructuras fungosas y realizando los conteos para la tabulación de los resultados. La identificación y clasificación de los hongos encontrados se hizo mediante comparaciones con las descripciones y gráficas de literatura especializada, (Barnet y Hunter, 1998; ICRISAT, 1993; Neergaard, 1977; Agarwal y Sinclair, 1987).

Pruebas de patogenicidad

Con los hongos de mayor incidencia encontrados en los análisis de sanidad se realizaron pruebas de patogenicidad en plántulas y cariopsides.

Para la prueba en plántulas se colocaron a germinar 360 semillas de cada accesión, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1%, durante 1 minuto y se distribuyeron en 18 platos de Petri, sobre papel humedecido con agua destilada. Cuando la mayoría de las plántulas de cada accesión alcanzaron una altura aproximada de 3 cm de longitud, se procedió a la inoculación de éstas por el método de aspersión aplicando una suspensión de 5x10⁴ esporas/mL para *Drechslera* spp. y 5x 10⁵ esporas/mL para *Phoma* sp. (Pérez, 1999). Las suspensiones se realizaron en una solución de gelatina sin sabor (0,4gr/L). Para aplicar la suspensión se utilizó una jeringa desechable estéril cuya aguja fue curvada en su punta hasta un ángulo aproximado de 90°. Se tomó una alícuota de 5 mL de la suspensión de esporas y se procedió a asperjar uniformemente todas las plántulas.

En la inoculación de los testigos respectivos se siguió el mismo procedimiento, pero utilizando únicamente la solución de gelatina. Los platos de Petri con las plántulas inoculadas se mantuvieron en el cuarto de incubación antes descrito.

Las evaluaciones se efectuaron a los 7, 15 y 20 días después de la inoculación contabilizando el porcentaje de plántulas enfermas y sanas, además de la descripción del tipo de síntomas observados. Posteriormente se realizaron reaislamientos para comprobar los postulados de Koch (González, 1976).

Las pruebas de patogenicidad en cariopsides se realizaron de manera similar a las efectuadas en plántulas, pero utilizando como método de inoculación la inmersión de las semillas en el inóculo. Para la inoculación se seleccionaron 300 semillas de cada accesión de *Brachiaria*, a las cuales previamente se les había removido las cubiertas protectoras (lema y palea), se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante un minuto y se dividieron en tres grupos de 100 para proceder a su inoculación. El procedimiento consistió en sumergir las cariopsides durante 15 minutos en la suspensión de esporas, 5x10⁴ esporas/mL para *Drechslera* spp. y 1x10⁶ esporas/mL para *Phoma* sp. (Pérez, 1999), contenidas dentro de frascos de vidrio estériles. Para los testigos se aplicó el mismo procedimiento anterior, pero utilizando como inóculo 10 ml de solución de gelatina sin sabor.

Las cariopsides se extrajeron de la suspensión y se sembraron en cajas de Petri con papel absorbente humedecido y se trasladaron al cuarto de incubación. A los 7, 15 y 20 días después de la inoculación se realizaron las evaluaciones anotando el porcentaje de germinación y el número de cariopsides sanas y afectadas por los hongos inoculados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de sanidad

Los resultados de los análisis de sanidad mostraron que las semillas de las accesiones de las tres especies de *Brachiaria* utilizadas en el estudio estaban afectadas por hongos en mayor o menor grado (Figura 1).

Ac. Para *B. decumbens* los porcentajes de afección estuvieron entre el 14% y el 37,5% o 13,5% al 40%, y para *B. jubata* entre el 6,5% al 41,5% o 3,5% a 18,5% respectivamente (Figura 1).

En *B. brizantha*, en la determinación mediante cámara húmeda, 15 de las 18 accesiones utilizadas presentaron incidencia de hongos mayor al 20%,

Los géneros de hongos, observados sobre las semillas en cámara húmeda fueron: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium*, *Curvularia* sp., *Chaetomium* sp., *Drechslera* sp., *Epicoccum* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp. y otros no identificados, determinándose que *Drechslera* spp. y *Phoma* spp. fueron los hongos de mayor incidencia (Tabla 1).

En las semillas de las especies *B. brizantha* y *B. decumbens*, analizadas mediante cámara húmeda, se determinó que la incidencia de *Drechslera* spp. fue del 11,25% y 9,14%, mientras que para *Phoma* sp. correspondió al 7,75% y 5,57%, respectivamente. En *B. jubata* la incidencia de *Phoma* sp., fue del 8,1% y el de *Drechslera* sp. 1,3%. En los análisis en medio de cultivo PDA-Ac para *B. brizantha* se determinó que *Drechslera* spp y *Phoma* spp presentaron incidencias del 5,89% y 12,3%, del 6,86% y 9,07 en *B. decumbens* y del 0,3% y 5,6% para *B. jubata*, respectivamente (Figura 2).

Es de anotar que los valores de incidencia determinados para *Phoma* spp fueron superiores a los encontrados en cámara húmeda para *B. brizantha* y *B. decumbens* probablemente debido a que el PDA-Ac favoreció el crecimiento del hongo, facilitando su detección.

La incidencia de los complejos de hongos afectado semillas en general fue muy bajo, 0,3% - 1,61%, a excepción del Cfl *Phoma* que presentó una incidencia del 5,2% sobre *B. jubata* (Figura 2).

Los componentes de los complejos más comúnmente detectados se detallan a continuación:

- Complejo de dos géneros de hongos (Cpf1)

Cpf1: *Curvularia* sp. + Hni 4 ;
Cpf1: *Drechslera* sp. + (*Alternaria* sp.), (*Cladosporium* sp.), (*Curvularia* sp.), (*Epicoccum* sp.), (*Fusarium* sp.), (*Phoma* sp.), (Hni café).

Cpf1: *Fusarium* sp. + (*Cladosporium* sp.), (*Epicoccum* sp.), (Hni café).

Cpf1: *Phoma* sp. + (*Alternaria* sp.), (*Cladosporium* sp.), (*Curvularia* sp.), (*Epicoccum* sp.), (*Fusarium* sp.), (*Penicillium* sp.), (Hni 4), (Hni 6), (Hni café).

- Complejo de tres géneros de hongos (Cpf2)

Cpf2: *Drechslera* sp. + (*Phoma* sp. + *Fusarium* sp.), (*Phoma* sp. + Hni 4)

Cpf2: *Fusarium* sp. + *Epicoccum* sp. + *Nigrospora* sp.

Cpf2: *Phoma* sp. + *Fusarium* sp. + Hni 4

Otros: Bacterias, (*Phoma* sp. + *Alternaria* sp., + *Curvularia* sp. + Hni 4), (*Fusarium* sp. + *Epicoccum* sp. + *Penicillium* sp. + Hni 4), (*Drechslera* sp. + *Alternaria* sp. + *Fusarium* sp. + *Phoma* sp.), (*Drechslera* sp. + *Aspergillus* spp. + *Epicoccum* sp. + *Fusarium* sp.), (*Drechslera* sp. + *Fusarium* sp. +

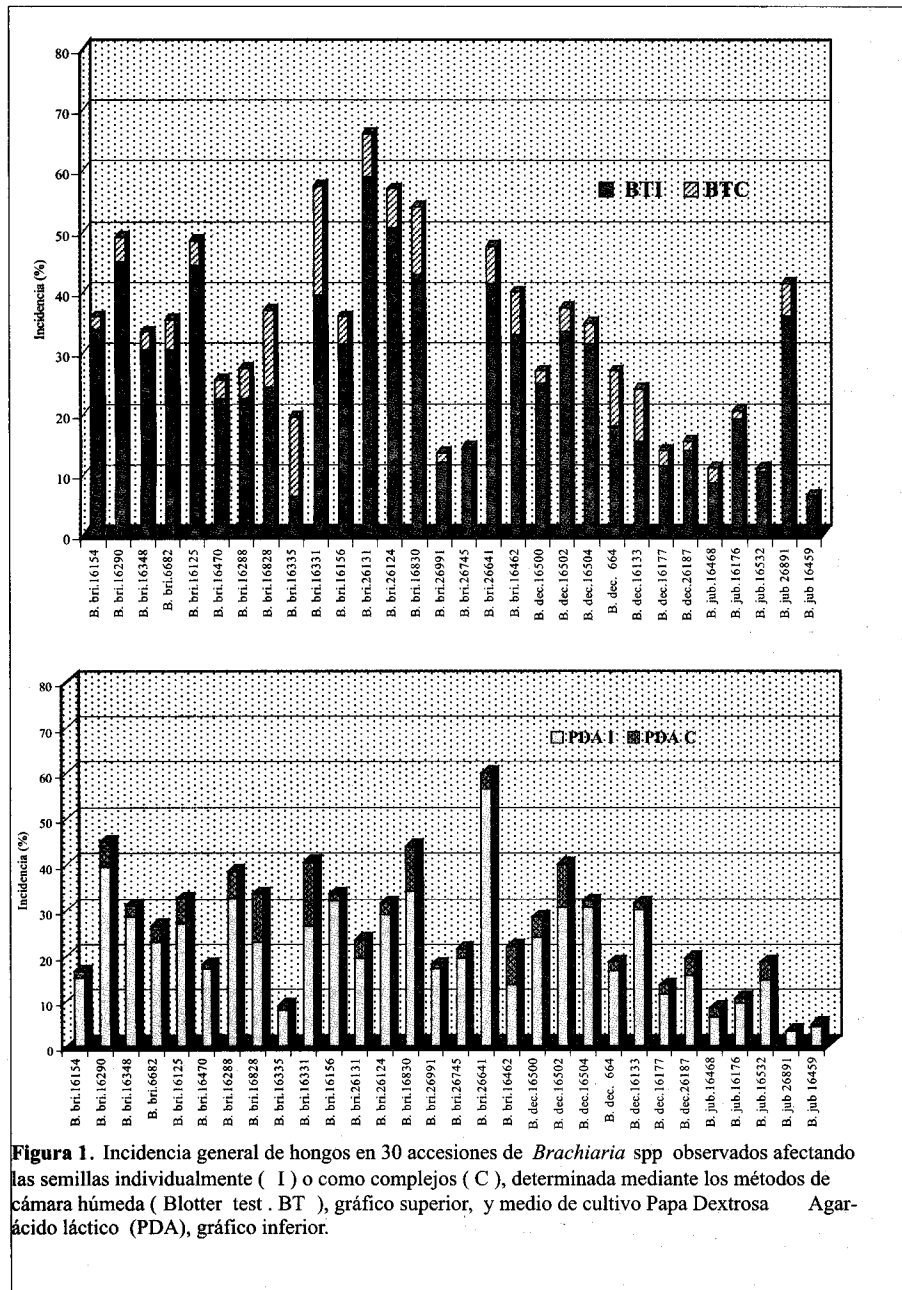


Figura 1. Incidencia general de hongos en 30 accesiones de *Brachiaria* spp. observados afectando las semillas individualmente (I) o como complejos (C), determinada mediante los métodos de cámara húmeda (Blotter test. BT), gráfico superior, y medio de cultivo Papa Dextrosa Agar-ácido láctico (PDA), gráfico inferior.

Se determinó que la incidencia de hongos afectando individualmente las semillas (BTI, PDAI) fue mucho mayor que la de las afecciones complejas (BTC, PDAC).

En cuanto a la distribución de las infecciones por especie se encontró que las accesiones de *B. brizantha* presentaron porcentajes de infección entre el 13,5% y el 66% cuando la determinación se hizo mediante cámara húmeda o entre el 9% y el 60% en PDA-

siendo las más afectadas: 26131 (66%), 16331 (57,5%), 26124 (56,5%) y 16 830 con el 54%. En el análisis en medio de cultivo PDA-Ac la incidencia determinada presentó valores inferiores, siendo la accesión 26641 la de más alta incidencia con 60% de semillas afectadas por hongos (Figura 1).

En *B. decumbens* y *B. jubata* los niveles de incidencia fueron menores en relación con *B. brizantha* sin superar niveles del 41%.

Tabla 1. Incidencia de hongos registrados afectando individualmente las semillas de 30 accesiones de *Brachiaria* spp. (método cámara húmeda y PDA+Ac)

Especie	No CIAT	<i>Drechslera</i> sp.			<i>Phoma</i> sp.			<i>Alternaria</i> sp.			<i>Cladosporium</i> sp.			<i>Curvularia</i> sp.			<i>Chaetomium</i> sp.			<i>Epicoccum</i> sp.			<i>Fusarium</i> sp.			<i>Nigrospora</i> sp.			<i>Aspergillus</i> sp.			<i>Penicillium</i> sp.			Géneros no Identif.		
		BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA	BT	PDA				
<i>B. brizantha</i>	16154	8	4	7,5	7,5	0	0	1,5	1	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5			
<i>B. brizantha</i>	16290	14	6,5	22	2,5	0,5	0	0	1	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,0			
<i>B. brizantha</i>	16348	18	5	5	9	0,5	1	1	0	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,0			
<i>B. brizantha</i>	6682	11	9,5	12	6	0	0,5	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,5			
<i>B. brizantha</i>	16125	16	9	0	8	0	0,5	0	0,5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0			
<i>B. brizantha</i>	16470	8	4	10	7	0	0	0	0,5	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,0			
<i>B. brizantha</i>	16288	5	2,5	12	22	0,5	0	0	0	1	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,5		
<i>B. brizantha</i>	16828	4,5	1,5	8	15	1,5	0	0	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5		
<i>B. brizantha</i>	16335	0,5	0,5	2	6,5	0,5	0	0	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5		
<i>B. brizantha</i>	16331	24	8,5	3	6	1	1,5	0,5	1,5	2,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5		
<i>B. brizantha</i>	16156	14	15	8,5	11,5	1	0	1,5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0		
<i>B. brizantha</i>	26131	31	12,5	1	3	0,5	0	12	0,5	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5		
<i>B. brizantha</i>	26124	9	5	3,5	10	2	0	18	2	1,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,0		
<i>B. brizantha</i>	16830	5,5	2,5	14	22	1,5	0	5	0	5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0		
<i>B. brizantha</i>	26991	4	3	2,5	7	0	0	0,5	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5		
<i>B. brizantha</i>	26745	6,5	3,5	7,5	11,5	0	0	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,5		
<i>B. brizantha</i>	26641	20	11	16,5	41,5	0	0,5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5		
<i>B. brizantha</i>	16462	15	2,5	3	3,5	1	0	3,5	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>B. decumbens</i>	16500	11	9,5	6	10	0	0	3	0	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
<i>B. decumbens</i>	16502	9	9	12	12	2,5	0	7	0,5	3	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3		
<i>B. decumbens</i>	16504	7,5	7,5	2	16,5	1,5	1	9,5	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
<i>B. decumbens</i>	664	3,5	6,5	6,5	5,5	0,5	0,5	3	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5		
<i>B. decumbens</i>	16133	11	5	3	12,5	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5		
<i>B. decumbens</i>	16177	2,5	6	2	3,5	3,5	0	1	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>B. decumbens</i>	26187	3,5	4,5	4,5	3,5	0	1	1	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>B. jubata</i>	16468	1	0,5	4,5	4	0	1,5	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5		
<i>B. jubata</i>	16176	7	0,5	6,5	5,5	0	0,5	2	0	3,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5		
<i>B. jubata</i>	16532	0	0,5	6	11,5	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5		
<i>B. jubata</i>	26891	3	0	24	3	1	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2		
<i>B. jubata</i>	16459	0	0	4	4	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

La incidencia se estimó en % de semillas afectadas por cada uno de los géneros de hongos registrados, calculada sobre un total de 200 semillas

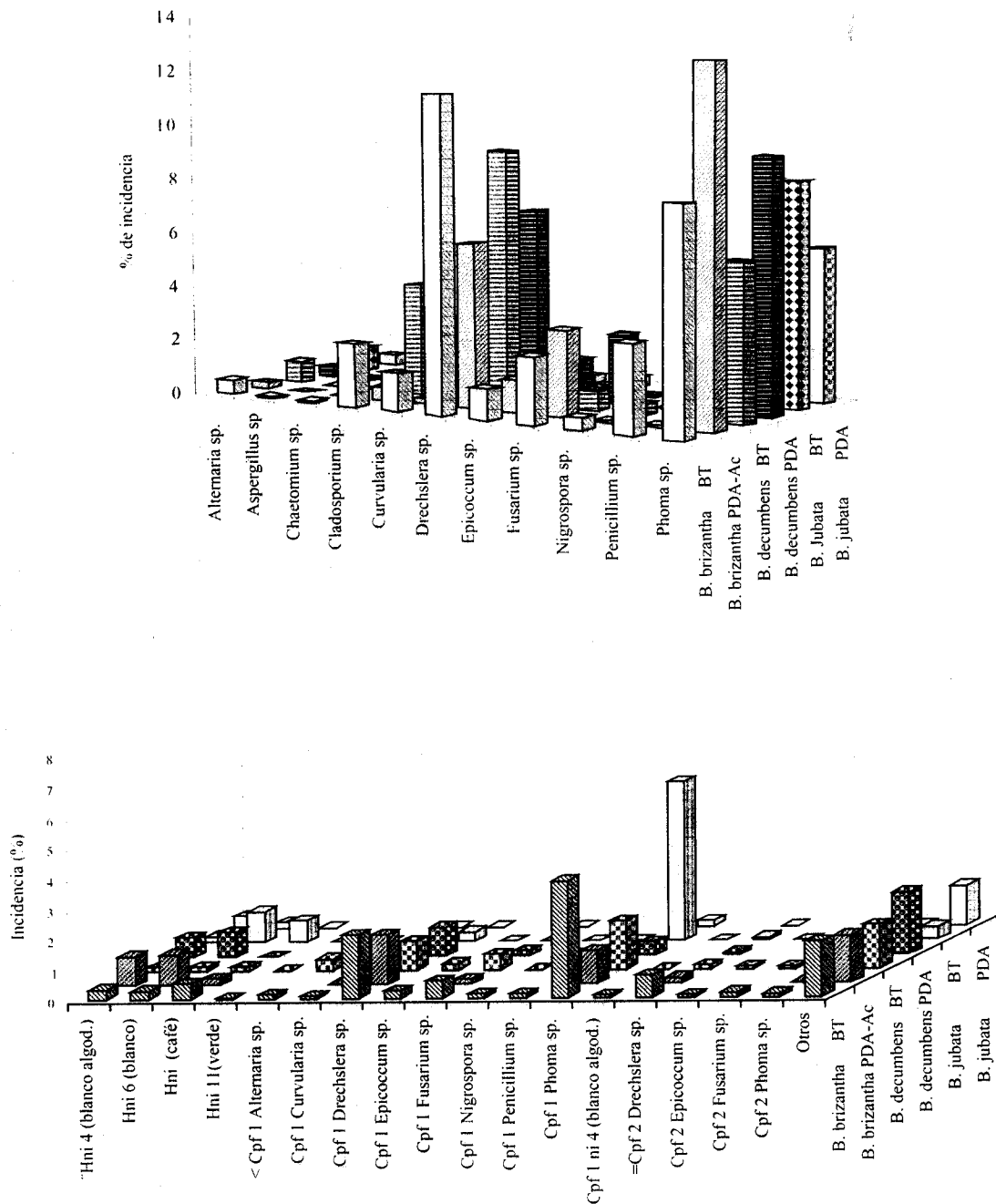


Figura 2 Incidencia de hongos en las semillas de tres especies de *Brachiaria* determinada mediante los métodos de cámara húmeda (BT) y medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA Ac). El gráfico superior muestra la incidencia de hongos afectando individualmente las semillas y el inferior la de los complejos fúngicos y algunos hongos no identificados (Hni) que afectaron individualmente las semillas.

Phoma sp. + Hni 4).

Es importante tener en cuenta que en esta investigación se utilizaron semillas escarificadas con H_2SO_4 y que si bien el ácido destruye las glumas y con éstas los hongos establecidos en ellas, deja intactas las brácteas que recubren la semilla, en donde *Phoma*, *Drechslera*, *Curvularia* y otros hongos registrados por Neergaard (1977) desarrollan sus hifas dentro de las células del parénquima y el esclerénquima; situación que explicaría la presencia de hongos post-tratamiento.

Las observaciones de ésta investigación, respecto al tratamiento con ácido, concuerdan

con las apreciaciones de Dias y Toledo (1994), quienes plantean que para las semillas de *B. decumbens* el ácido sulfúrico no impide el desarrollo de microorganismos, ni tampoco ejerce control sobre ellos; registrando en sus experimentos géneros de hongos como *Fusarium* sp, *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp, *Phyllosticta* sp, *Curvularia* sp, *Drechslera* sp. y *Phoma* sp. post escarificación

En general, se observaron diferencias entre los dos métodos utilizados para la determinación de la sanidad de las semillas. En cámara húmeda se pudo notar la tendencia a

detectar una mayor proporción de hongos, mientras que en PDA-Ac fue ligeramente menor. Las diferencias podrían explicarse quizás por un posible efecto del tratamiento con alcohol e hipoclorito de sodio, aplicado a las semillas colocadas en PDA-Ac, sobre los hongos asociados a los tejidos de las brácteas (Lemma y Palea), por cuanto se utilizaron semillas previamente escarificadas con ácido el cual tiene un efecto desinfectante, además de eliminar las glumas, consideradas como las mayores albergadoras de hongos en las gramíneas Agarwal y Sinclair, 1987; Neergaard, 1977).

Los géneros *Drechslera* spp. y *Phoma* spp. fueron los que se encontraron con mayor frecuencia y en este estudio se hace especial énfasis en su incidencia por ser considerados de importancia cuarentenaria, particularmente *Drechslera* spp., el cual ha mostrado alto nivel de afinidad como patógeno de semillas según lo descrito por Neergaard (1977).

Por otra parte es importante que otros hongos registrados en el estudio como: *Alter-*

nas normal que los microorganismos que afectan a la planta madre también afectan las inflorescencias y por ende pasen a las semillas bajo condiciones de producción (Chagas y Oliveira, 1983). El manejo postcosecha y las condiciones de almacenamiento, también pudieron favorecer el desarrollo de hongos como *Aspergillus* y *Penicillium*, considerados como mohos de almacén y registrados en éste estudio (Tabla 1). Según Valiela (1979),

plántulas, probablemente por dormancia de las semillas.

Para todas las accesiones las pruebas de patogenicidad con *Drechslera* spp. y *Phoma* spp. en plántulas resultaron positivas (Figura 3), según lo establecido en los postulados de Koch (González, 1976), lo cual indica que estos hongos aislados de semillas sí son transmitidos por ellas, revistiendo por lo tanto interés cuarentenario.

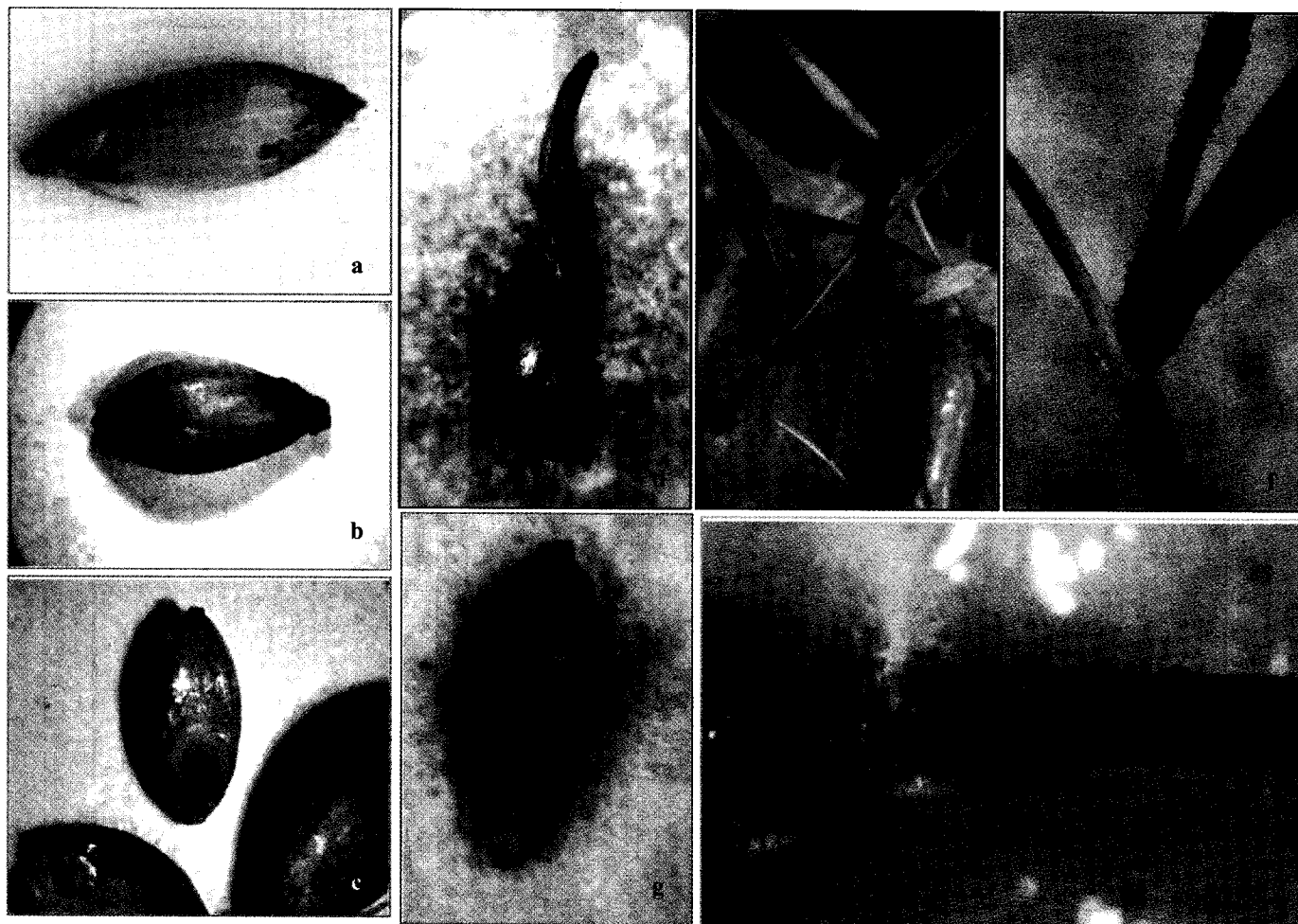


Figura 3. a. Semilla de *Brachiaria* spp. sin escarificar, nótese la presencia de hongos de color negro sobre las glumas; b. Semilla escarificada, mostrando en la base residuos de glumas quemadas por el ácido sulfúrico; c. Cariópside de *Brachiaria* a la cual se le han eliminado las brácteas; d. Semilla de *Brachiaria* spp. germinada, severamente infectada por *Drechslera* sp. (20X); e, f. Síntomas ocasionados por *Drechslera* spp. sobre plántulas inoculadas; g. Semilla afectada por *Phoma* sp. nótese los picnidios de color negro (20X); h. Picnidios de *Phoma* spp. invadiendo el coleóptilo de plántulas inoculadas

naria spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., sean tenidos en cuenta por cuanto pueden ser de importancia cuarentenaria a pesar de su baja incidencia, pues se encuentran en las semillas y se han registrado afectando plantas de *Brachiaria* y otras gramíneas (Kelemu, 1993; Lenné, 1990)

Como posibles causas de la alta incidencia de hongos podrían considerarse las condiciones de manejo del proceso de refrescamiento en la estación del CIAT en Popayán, en donde la humedad ambiental y la precipitación (2000 mm promedio anual) favorecen las infecciones por hongos (Pineda, observaciones no publicadas). De otra parte es ape-

muchas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, son patógenos importantes en frutas, bulbos y granos en almacenamiento y para Christensen y López (1962), citado por Valiela, (1979), estos hongos no infectan los granos antes de la cosecha, y el daño ocurre durante el almacenamiento en donde las condiciones de humedad y temperatura los favorecen.

Pruebas de patogenicidad en plántulas

Las pruebas de patogenicidad se realizaron únicamente para las accesiones pertenecientes a *B. brizantha* y *B. decumbens* y no para *B. jubata* por cuanto no fue posible obtener

Las evaluaciones del progreso de la infección dentro de los platos de Petri, realizadas a los 7, 15 y 20 días después de inoculación, indicaron que *Drechslera* spp. desde los 7 días, en *B. brizantha* dependiendo de la accesión, los porcentajes de plántulas infectadas oscilaron desde el 70,65 % hasta el 100 %, alcanzado niveles entre el 98,65 % y 100% en la evaluación final, 20 días después de inoculación. Para *B. decumbens* los porcentajes de plántulas infectadas variaron entre el 63,51% y el 95,24 % en la primera evaluación, y entre el 93,68% y 100% en la evaluación final (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de plántulas infectadas y cariósides germinadas durante las pruebas de patogenicidad con los hongos *Drechslera* spp y *Phoma* spp aislados de semillas de *Brachiaria* spp.

Especie	No CIAT	% de plántulas infectadas						% de cariósides germinadas			
		Control	<i>Drechslera</i> spp			<i>Phoma</i> sp			Control	<i>Drechslera</i> spp	<i>Phoma</i> sp
			7 días	15 días	20 días	7 día	15 días	20 días			
<i>B. brizantha</i>	16154	9,23	95,08	98,36	98,36	11,94	59,7	83,58	16	0	0
<i>B. brizantha</i>	16290	0	84,38	85,94	100	81,82	92,21	100	34	4	24
<i>B. brizantha</i>	16348	3,85	96,55	96,55	100	12,12	33,33	72,73	9	0	0
<i>B. brizantha</i>	6682	3,08	74,32	93,24	98,65	97,37	98,68	100	20	0	0
<i>B. brizantha</i>	16125	0	95,16	100	100	96,83	98,41	100	14	0	0
<i>B. brizantha</i>	16470	0	88,46	98,72	100	86,11	98,61	100	20	3	8
<i>B. brizantha</i>	16288	12,82	100	100	100	25	64,58	100	20	0	2
<i>B. brizantha</i>	16828	0	93,10	100	100	48,28	100	100	18	0	0
<i>B. brizantha</i>	16331	0	91,67	96,67	100	11,11	66,67	77,78	51	7	6
<i>B. brizantha</i>	16335	-	-	-	-	-	-	-	9	0	0
<i>B. brizantha</i>	16156	6,25	70,65	100	100	1,19	60,71	91,67	14	5	2
<i>B. brizantha</i>	26131	10,77	79,55	96,59	100	4,23	39,44	88,73	4	2	0
<i>B. brizantha</i>	26124	17,72	80,49	97,56	100	1,11	42,22	87,78	41	20	14
<i>B. brizantha</i>	16830	5,56	82,86	97,14	100	11,11	61,11	97,22	41	3	2
<i>B. brizantha</i>	26991	2,11	86,54	100	100	12,66	58,23	92,41	44	6	3
<i>B. brizantha</i>	26745	7,55	78,85	99,04	100	5	77	94	5	1	0
<i>B. brizantha</i>	26641	15,66	81,33	97,33	98,67	72,73	88,31	98,7	23	22	17
<i>B. brizantha</i>	16462	0	86,59	96,34	100	85,57	65,98	90,72	24	5	3
<i>B. decumbens</i>	16500	20,83	79,79	95,74	100	9,09	24,24	94,95	61	14	5
<i>B. decumbens</i>	16502	-	-	-	-	-	-	-	11	0	0
<i>B. decumbens</i>	16504	4,04	72,63	93,68	98,95	5,1	67,35	89,8	56	9	11
<i>B. decumbens</i>	664	5,49	76,74	96,51	100	84,62	100	100	37	0	1
<i>B. decumbens</i>	16133	0	92,59	98,77	100	5,95	32,14	55,95	39	2	14
<i>B. decumbens</i>	16177	4,55	63,51	94,59	100	25	64,06	92,19	16	15	3
<i>B. decumbens</i>	26187	1,64	95,24	100	100	69,81	90,57	100	43	1	15

Los síntomas se manifestaron a partir del séptimo día después de inoculadas, observándose inicialmente en el coleóptilo y posteriormente en las hojas primarias y secundarias. Se caracterizaron por manchas elongadas ó elípticas, de forma irregular que iban desde el amarillo o café claro. A medida que progresaba la enfermedad las manchas se acentuaban hacia el oscuro, cubriendo la totalidad de las hojas, y por último ocasionando la muerte.

Las pruebas de patogenicidad con *Phoma* spp. también resultaron positivas. Las evaluaciones del progreso de la infección mostraron que, tanto para las accesiones de *B. brizantha* y *B. decumbens*, en la primera evaluación a los 7 días los niveles de infección fueron más bajos que para *Drechslera* sp. La evaluación final a los 20 días, indicó que las plántulas de solo 6 de las 17 accesiones de *B. brizantha* inoculados fueron infectadas en su totalidad; mientras que para *B. decumbens* solo dos de las 6 inoculadas se infectaron al 100% (Tabla 2).

Los síntomas empezaron al séptimo día después de inoculado el material, observándose clorosis y amarillamiento en las plántulas. En los tejidos de los coleóptilos, en las hojas primarias y en las secundarias se observaron picnidios negros ligeramente erupentes (Figura 3). A medida que progresaba la enfermedad el amarillamiento de las plántulas aumentó y por último ocasionó la muerte de algunas de ellas.

Es importante mencionar aquí que las semillas utilizadas en el estudio, a las cuales no se les eliminaron las brácteas, presentaron infección por *Drechslera* spp., *Phoma* spp. y

Curvularia spp. (Tabla 2), pero antes de inoculación las semillas y/o plántulas que presentaban síntomas de infección fueron eliminadas del plato Petri en donde germinaron, con el fin de cuantificar correctamente los porcentajes de infección. No obstante la eliminación del material infectado, en los testigos se presentaron infecciones tardías, no identificadas al momento de la inoculación con solución de gelatina estéril, en porcentajes relativamente bajos.

Las infecciones probablemente se presentaron de manera tardía por el lento desarrollo de los hongos establecidos internamente en los tejidos de la lema y la palea o de la cariósida o por inefectividad del tratamiento de desinfección, dadas las condiciones de asociación íntima de estos microorganismos con los tejidos de las semillas.

Sin embargo las diferencias con los porcentajes de infección obtenidos en las plántulas inoculadas fueron lo suficientemente elevados como para dudar de la infectividad de los aislamientos utilizados.

Pruebas de patogenicidad en carióspsides

Los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad en carióspsides, a pesar de la baja germinación de los controles sin inocular probablemente por daño mecánico durante el proceso de eliminación de las brácteas, mostraron que *Drechslera* spp. y *Phoma* sp. ocasionaban reducciones notables en la germinación de las semillas (Tabla 2).

Los síntomas de deterioro en las carióspsides a partir del séptimo día, se caracterizaron por la no germinación y presencia de fructificaciones (conidióforos y conidias de *Drechslera* spp; picnidios globosos de color negro para *Phoma* spp.) sobre ellas. En los pocos casos en los que algunas de las semillas iniciaron la germinación, los coleóptilos emergieron débiles y murieron muy rápidamente. Situación que está de acuerdo con lo observado en otros trabajos de investigación realizados con semillas (Chagas y Oliveira, 1983; Orozco, 1989).

Al evaluar el efecto de cada hongo se observó que éste fue variable para cada accesión: en la prueba con *Drechslera* spp. en *B. brizantha* 7 de las 18 accesiones no germinaron, dos presentaron porcentajes del 20 y 22%, y las 9 restantes valores entre 1 al 7%. En *B. decumbens* dos de las 7 accesiones inoculadas no germinaron y las otras 5 tuvieron porcentajes del 1 al 14%. Es importante anotar que en las accesiones *B. brizantha* 26641 y *B. decumbens* 16177 no hubo efecto sobre germinación, si se compara con el control no inoculado (Tabla 2).

En cuanto a la acción de *Phoma* spp. sobre *B. brizantha*, 8 accesiones no germinaron; 3 tuvieron porcentajes de germinación entre el 14 y 24%, mientras que las demás presentaron valores entre el 2 y el 8%. Sobre *B. decumbens* solo una no germinó y las demás lo hicieron entre el uno y el 15%. El menor efecto sobre la germinación se observó en las accesiones 16290 y 26641 de la especie *B. brizantha*.

Comparando el efecto sobre germinación de las carióspsides se observó que *Drechslera* spp. tuvo un efecto ligeramente mayor que *Phoma* sp. por cuanto solamente 4 accesiones tuvieron una germinación mayor del 10% para el primer caso y 6 para el segundo, (Tabla 2).

CONCLUSIONES

Los análisis de sanidad realizados durante el estudio, mostraron la presencia de hongos transmitidos por semilla en las accesiones pertenecientes a *B. brizantha*, *B. decumbens*; y *B. jubata* cumpliendo de esta manera con el objetivo propuesto en la investigación. Los

géneros de mayor incidencia fueron *Drechslera* spp. y *Phoma* spp., cuya patogenicidad en plántulas y carióspsides se demostró mediante la aplicación de los postulados de Koch. Su efecto se tradujo en la reducción de la germinación e infección de plántulas en porcentajes altos, pero variables según la accesión. Se considera que estos hongos revisten especial importancia en el incremento y refrescado del germoplasma de *Brachiaria* para su conservación y que son de importancia cuarentenaria, especialmente para actividades relacionadas con el intercambio seguro, según normas internacionales.

Además de *Drechslera* spp. y *Phoma* spp. se determinó la presencia de *Alternaria* sp., *Epicoecum* sp. (*Cerebella* sp.), *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp., y *Penicillium* sp., entre otros, como consecuencia de la cosecha tardía, factores ambientales: precipitación y humedad que favorecen la actividad de estos organismos.

Los resultados de esta investigación aportan elementos valiosos para el perfeccionamiento de los planes de regeneración del germoplasma en donde el control de las enfermedades bajo condiciones de campo y el manejo de las semillas post-cosecha sea efectivo y tendiente a obtener germoplasma de alta calidad, tanto para los procesos de conservación como de distribución y repatriación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y al MADR por el apoyo financiero, a Amanda Varela por el apoyo brindado durante la elaboración del proyecto; a Daniel Debouck por animarnos a emprender el estudio y facilitar los recursos necesarios para el mismo, así como por sus valiosos comentarios para la elaboración de este documento. También hacen extensivos sus agradecimientos a José Luis Ramírez, Luz Edith Tavarez, María del S. Balcazar, Armando Bedoya, Arsenio Ciprian, Edwin Rivera, Jorge E. Delgado, Luis Enrique Borrero, Jorge Elicer Caicedo, John Jairo Sánchez, Carlos Cruz, Alba Marina Torres, Benjamin Reinoso, Héctor Becoche, Sandra Albarracín, Orlando Toro, Luis Garzón y Lorenzo Zambrano por su colaboración y ayuda.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, K. y Sinclair, B. 1987. Principles of seed pathology. CRC Press. Boca Raton, Florida. p 29-90
- Barnett, H. y Hunter, B. 1998. Illustrated genera of imperfect Fungi. 4th Ed. APS Press. St Paul, Minnesota, USA. 218 p
- Chagas, D y Oliveira, 1983. Fungos Associados a sementes de Gramíneas e Leguminosas forrageiras. Fitopatología Brasileira 8: 131-135.

Dias, D. C y Toledo, F. F. 1994. Germinação e incidência de fungos em testes com sementes de *Brachiaria decumbens* STAPF, Colhidas em 1988. Rev. de Agricultura 69(1): 27-40.

Dickie, J. B., Linington y Williams, J.T (Eds). 1984. Seed management Techniques for Genebanks. Proceedings of a Workshop held at the Royal Botanic Gardens, Kew, 6-9 Julio 1982, 294 pp

Fernandes, C. D.; Fernandes, A. T y Bezerra, J. L 1995. "Honey dew": A new disease of *Brachiaria* spp. seed in Brazil. Fitopatología Brasileira 20(3): 501-503.

González, C. 1976. Introducción a la fitopatología. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José de Costa Rica. p 12

International Crops Research Institute For The Semi-Arid Tropics - ICRISAT. 1993. A pictorial Guide to the Identification of seedborne fungi of Sorghum, Pearl Millet, Finger Millet, Chickpea, Pigeonpea, and Groundnut. Information Bulletin No. 34 p 193.

Kelemu, S. 1993. Seed Health Testing and Phytosanitary Procedures for Tropical Forages. Tropical Forages Program Plant Pathology. Documento de Trabajo No. 132. Centro de Agricultura Tropical (CIAT). 33 p

Lenne, J. M. 1990. A world list of fungal diseases of Tropical Pasture species. CAB International. UK at the University Press, Cambridge. p 12-17

-----, y Trutmann, P. (Eds). 1994. Diseases of tropical Pasture Plants. CAB International, UK at the University Press, Cambridge. p.170-173 y 292-314.

Miles, W. J., Mass, B. L. y Valle, C. B. 1998. *Brachiaria*. Biología, Agronomía y Mejoramiento. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Palmira-Valle. p. 6-22

Neergaard, P. 1977. Seed pathology. Halted Press, a division of John Wiley and Sons, Inc. New York. p 147-269

Orozco, M. S. 1989. Caracterización de la dinámica de la latencia en semillas de *Brachiaria dictyoneura* (Stapf cv. Llane-ro). Tesis (MSc Sistemas de semillas). Universidad Nacional de Colombia. p. 4-8.

Pérez, W. 1999. Hongos presentes en semilla sexual de maca (*Lepidium meyenii* Walp.). Fitopatología 34 (1): 28-34.

Pineda, B. 1996. Generalidades acerca de la transmisión de Patógenos por semilla. En: Memorias Curso de Patología de semillas. Nov. 25-30. ICA. Palmira - Valle. p. 11-20.

Valiela, F. 1979. Introducción a la fitopatología. Hongos y Micoplasmas. Colección científica del INTA. Buenos Aires, Argentina. Vol iv

Reprinted with permission from ASCOLFI. Originally published in Fitopatología Colombiana 24(2):39-46, Copyright 2000.