



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

TESIS DE DOCTORADO

**HISTOPATOLOGÍA DE USTILAGINALES (CARBONES) EN Poaceas DE
LOS GÉNEROS *Sorghum*, *Bromus* Y *Glyceria***

Tesista: Ing. Agr. (Esp.) Marta Mónica Astiz Gassó

Director de Tesis: Dra Analía E. Perelló

Año 2017



"Gallery of Contemporary Noted Mycologists"
USA

En Memoria a la Dra Elisa Hirschhorn

*"...los genios no son de donde nacen sino del
país al que sirven, los genios tienen por patria el mundo"*

Dedicado

“A mi Esposo Hugo, mis hijos Marina y Hernán por entender que el trabajo docente investigador ocupan más tiempo y dedicación que cualquier otro emprendimiento laboral”

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Elisa por guiarme y enseñarme sobre los carbones cuando comencé en 1976 con la tesina de grado en el Instituto Fitotécnico Santa Catalina y de su apoyo incondicional para que siguiera adelante sobre la temática y ampliar mi horizonte sobre la Fitopatología. Además, de considerar a mis hijos como sus nietos.

A los directores del Instituto del Fitotécnico Santa Catalina: Ing. Agr. Luis. B. Mazoti por permitirme hacer mis primeros pasos como becaria (Experimental Agro-Industrial Obispo Colombres (Tucumán); al Ing. Agr. Miguel Arturi por incluirme como personal profesional, luego para acceder al cargo de Jefe de Trabajos Prácticos y continuar con mis trabajos como docente-investigador. Y actualmente, a la Dra María del Carmén Molina por alentarme y apoyarme a concluir con la Tesis Doctoral.

A mi Directora de tesis y amiga Dra Analía E. Perelló por considerarme su tesista y alentarme para que la realizará por allá en el 2008.

A mi compañero de trabajo y de aventura en la recolección de muestras al Dr Marcelo Lovisolo por su apoyo, además de enseñarme a usar el micrótopo e interpretar esos cortes de la morfología de las gramíneas.

A mi alumna, becaria y ahora colega Ing. Agr. Silvia Sanchez por su colaboración en los trabajos de laboratorio, de campo y de aventuras científicas. Además, de enseñarme a usar los nuevos programas de computación y de ayudarme a preparar mis presentaciones a Congresos y clases.

A la Sra Mirta Streitenberger por su compañerismo y su colaboración en ayudarme con los trámites administrativos de la facultad.

Al personal de apoyo de Laboratorio Blanca T. Canepa y Edit Fleytas por su trabajo y entenderme cuando les solicitaba hacer actividades que iban más allá de su horario laboral. También le agradezco al personal de campo que sin su trabajo no hubiera sido posible hacer los ensayos de investigación.

LISTA DE PUBLICACIONES

I. Publicaciones en revistas científicas

Astiz Gassó M.M. 2010. Carbón de la cebadilla criolla (*Ustilago bullata* Berk), su efecto en la calidad de semilla. Revista de Semillas. 4 (3):54-56. ISSN 1851-1678

Vignale M.V., Astiz Gassó M.M. Novas M.V., y Iannone L. 2013. *Epichloid endophytes* confer resistance to the smut *Ustilago bullata* in the wild grass *Bromus auleticus*. Biological Control 7:1-7. ISSN 1049-9644

Astiz Gassó M.M., Lovisolo M., Perello A. 2015. Biology and histopathology of *Ustilago filiformis* (= *U. longissima*) causal agent of leaf stripe smut of *Glyceria multiflora*. Journal Plant Pathology Research 55 (4):429-437. ISSN1427-4345

Astiz Gassó M.M., Lovisolo M., Perelló A. 2015. *Ustilago longissima* en *Glyceria multiflora*: biología y ciclo del patógeno en Argentina. Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología 33 S 81. Suplemento ISSN-2007-8080

Astiz Gassó M.M., Lovisolo M., Perello A. 2017. Effects of loose kernel smut caused by *Sporisorium cruentum* on *Sorghum halepense*. Journal Plant Protection Research.57 (1): 64-74. ISSN1427-4345.Aceptado

II. Capítulos en Libros

Astiz Gassó Marta M.M., Molina María del C. 2010. MANAGENENT OF FUNGAL PLANT PATHOGENS 2010 Capítulo 11: Physiological specialization of Ustilaginales (smut) of género *Bromus*, *Zea* and *Triticum* in Argentina. Págs. 138-146. CAB International 2010 (Eds. A. Arya & A.E. Perelló). SBN: 81-7233-468-0 Pág.388.

III. Presentaciones en eventos científicos

Astiz Gassó M.M., Pagliocca R., Varaschin M.C.. 2009. Comportamiento del formulado biológico TL en el manejo integrado de *Ustilago bullata* (ustilaginales) en *Bromus catharticus*. Actas VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina y II Congreso Internacional-REDBIO-Argentina. Resúmenes Pág.151.

Astiz Gassó M.M., Galián L.R., Aulicino M.B. 2009. Evaluación de fungicidas para el control del carbón de la cebadilla (*Ustilago bullata*) con diferentes niveles de infestación en *Bromus catharticus*. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resúmenes: PV04.

Vignale, M.V., Novas M.V., Astiz Gassó M.M., Iannone L.J. 2009. Efecto de endófitos *Neotyphodium* sobre la germinación de teliosporas de *Ustilago bullata* y la infección en plántulas de *Bromus auleticus*. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica: Micología y Liqueología Pag. 225. Vol. 44 Suplemento ISSN: 0373-580X.

Astiz Gassó M.M., Galián L.R., Aulicino M.B. 2010 Evaluación de fungicidas para el control de *Ustilago bullata* en *Bromus catharticus*. Actas Jornadas de Mejoramiento Genético de Forrajeras. Resumen Pág. 174.

Vignale Maria Victoria, Novas Maria Victoria, Pinget Albertina Daniela, Astiz Gassó Marta Mónica, De Batista Jose Pedro, Iannone Leopoldo Javier. 2010. The role of *Neotyphodium* on the interaction of *Bromus auleticus* with the smut fungi *Ustilago bullata* and mycorrhizal fungi. Dept. of Coastal Sciences, Gulf Coast Research Lab University of Southern Mississippi, U.S.A. MSA. Abstracts from the Joint Meeting of the MSA and International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses (ISFEG). Págs. 81-82.

Astiz Gassó M.M., Lovisolo M., Perelló A. 2012.- Biología e histopatología del carbón *Ustilago longissima* sobre *Glyceria multiflora*. Actas de las XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Pág. 49.

Astiz Gassó M.M., Lovisolo M.R., Perello A. 2014. Estudio del ciclo biológico de *Ustilago longissima* sobre *Glyceria multiflora*. Acta del 3er Congreso Argentino de Fitopatología. Resumen Pág. 258.

Astiz Gassó M.M., Sanchez S.E., Perello A. 2016. Manejo integrado de *Ustilago bullata* en *Bromus catharticus* en Argentina/Integrated management of *Ustilago bullata* in *Bromus catharticus* in Argentine. Actas 49º Congresso Brasileiro de Fitopatología Pág. 45.

INDICE GENERAL

Índice General.....	7-9
Índice de Figuras	10-12
Índice de Tablas	13
Lista de abreviaturas.....	14
Lista de términos	15
Carbones- Introducción	16-25
Hipótesis de la Tesis	25-26
Objetivos de la Tesis	26-27
Bibliografía.....	28-30
Capítulo 1: Histopatología y alteraciones morfológicas producidas por <i>Sporisorium</i> sp. en rizomas de <i>Sorghum halepense</i>	
Resumen	31-32
Introducción.....	33-36
Materiales y Métodos	36-42
Resultados	42-47
Discusión	48-62
Ciclo Biológico de <i>Sporisorium cruentum</i>	63
Conclusiones	64
Bibliografía	65-70
Capítulo 2: Biología e histopatología del carbón <i>Ustilago filiformis</i> (=U. <i>longissima</i> (Sch) Meyen) sobre <i>Glyceria multiflora</i> Steud. (Poaceae)	
Resumen	71-72
Introducción.....	72-74
Objetivos	74

Materiales y Métodos	74-80
Resultados y Discusión	80-93
Ciclo biológico <i>U. filiformis</i>	94
Conclusión	95
Bibliografía.....	96-98
Capítulo 3: <i>Ustilago bullata</i> (carbón de la cebadilla criolla) en el género	
<i>Bromus</i>	
Resúmen	99-100
Introducción.....	101-102
Objetivos	102
3-1 Biología e histopatología del patógeno <i>U. bullata</i> y su evolución sobre el hospedante <i>Bromus catharticus</i>	
Introducción	103
Objetivos.....	103
Materiales y Métodos	104-106
Resultados y discusión	107-114
Conclusión.....	115
3-2 Determinación de comportamiento y variabilidad patógena de <i>U. bullata</i> en el genero <i>Bromus</i>	
Introducción	116-117
Objetivos.....	117
Materiales y Métodos	117-119
Resultados y discusión	119-122
Conclusiones.....	123
3-3 Manejo integrado para el control del carbón de la panoja	
Introducción	124-125

3-3-1 Diferentes niveles de infestación y dosis de terapicos para el control del carbón de la cebadilla	
Introducción	124-125
Objetivos	125
Materiales y Métodos	126-127
Resultados y discusión	128-130
Conclusiones	131
3-3-2 Acción antagonica de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>U. bullata</i>	
Introducción	132
Objetivo.....	132
Materiales y Métodos.....	133-135
Resultados y discusión	135-138
Conclusiones	138
3-3-3 Experimentos con terapicos y formulado biológico para el manejo integrado de <i>U. bullata</i>	
Introducción	139
Objetivo.....	139
Materiales y Métodos.....	139-143
Resultados y discusión	144-147
Conclusiones	148
Bibliografía.....	149-154
CONCLUSIONES GENERALES	155-157

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Esquema típico del proceso reproductivo de los Carbones 17

Figura 2. Ciclo de vida típico de los Carbones. 18

Figura 3. Clasificación taxonómica de los Carbones. 19

Capítulo 1

Figura 1. Observación macroscópica y microscópica de *S. cruentum* 53

Figura 2. Cortes longitudinales de meristemas de rizomas de sorgo de alepo..... 54

Figura 3. Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) en *Sorghum halepense*..... 54

Figura 4. Alteraciones morfológicas producidas por *S. cruentum*..... 55

Figura 5. Espiguillas infectadas con carbón..... 56

Figura 6. Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) en *S. halepense*..... 57

Figura 7. Brotes de rizomas del sorgo de alepo en placas de Petri..... 57

Figura 8. Materia seca aérea (MSA) de plantas de sorgo de alepo al final del ciclo del cultivo: 58

Figura 9. Materia seca de raíz (MSR) de plantas de sorgo de alepo al final del ciclo del cultivo 58

Figura 10. Experimento en invernadero con *S. cruentum* sobre rizomas de sorgo de alepo..... 59

Figura 11. Ciclo de vida de *Sporisorium cruentum*..... 60

Capítulo 2

Figura 1. A. Plantas de *Glyceria* con infecciones naturales de *U. filiformis*..... 83

Figura 2. Observación de estructuras reproductivas con microscopio óptico (MO) y electrónico de barrido (MEB) en *U. filiformis* 84

Figura 3. Observación macroscópica de la colonia de <i>U. filiformis</i> desarrollada en PDA y muestras de plantas de <i>Glyceria</i> con inoculación artificial	85
Figura 4. Observación de germinación e infección sobre hoja de <i>Glyceria in vitro</i>	86
Figura 5. Inoculación artificial con basidiosporas de <i>U. filiformis desarrolladas</i> con medio de cultivo PC y observación macroscópica de los síntomas	87
Figura 6. Observación microscópica de hoja de <i>Glyceria</i> en plantas cosechadas a campo procedente de inoculaciones artificiales.	88
Figura 7. Observación en corte transversal de la hoja infectada con MO.....	89
Figura 8. Observación macroscópica de hoja de <i>Glyceria</i> en plantas cosechadas a campo procedente de inoculaciones artificiales.	90
Figura 9: Ciclo biológico de <i>U. filiformis</i>	91
Capítulo 3	
Figura 1. Plantas de <i>Bromus catharticus</i> con y sin carbón (<i>U. bullata</i>).....	106
Figura 2. Observación microscópica de <i>U. bullata</i> sobre el tejido del hospedante (microscópico óptico).....	106
Figura 3. Experimento con inoculaciones artificiales de <i>U. bullata</i> sobre <i>B catharticus</i> ...	107
Figura 4. Metodología de clarificación y tinción del material infectado.	108
Figura 5. Cortes histológicos del meristema apical y espiguilla de <i>B. catharticus</i> colonizado por <i>U. bullata</i>	109
Figura 6. Ciclo de <i>U. bullata</i>	110
Figura 7. Ensayos de evaluación a campo de formas fisiológicas de <i>U. bullata</i> sobre especies del género <i>Bromus</i>	116
Figura 8. Evaluación a campo de fungicidas con diferentes dosis del terapico y niveles de infestación del carbón.....	125
Figura 9. Fitotoxicidad producidas por agroquímicos sobre <i>B. catharticus</i>	126
Figura 10. Ensayo de interacción <i>Trichoderma-U. bullata in vitro</i>	131
Figura 11. Evaluación de la supervivencia de los conidios <i>in vitro</i> en un medio semi-selectivo.	136

Figura 12. Evaluación a campo en cebadilla criolla tratada con terápicos y biocontrolador (<i>Trichoderma</i>).....	139
Figura 13. Evaluación de supervivencia de conidios de <i>Trichoderma</i> sp. en interacción con terápicos en semilla de cebadilla criolla.	140
Figura 14. Esquema del manejo integrado de <i>U. bullata</i> en <i>B. catharticus</i> en Argentina.	141

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fuentes de inóculo para ensayo a campo para la determinación de formas fisiológicas y de comportamiento de las especies <i>Bromus</i>	118
Tabla 2: Escala arbitraria de grados resistencia/susceptibilidad para carbones.	119
Tabla 3: Reacción del género <i>Bromus</i> a diferentes poblaciones de <i>U. bullata</i>	122
Tabla 4: Niveles de infestación artificial en la semilla de cebadilla.....	126
Tabla 5: Dosis de terapicos para el ensayo a campo.....	127
Tabla 6: Parámetros de evaluación de antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp.con <i>U. bullata</i> ...	134-135
Tabla 7: Dosis de terapico y formulado biológico Biagro TL®	135
Tabla 8: Resultados de las interacciones <i>U. bullata-Trichoderma</i>	137-138
Tabla 9: Combinación de terapico y formulado biológico Biagro TL®	140

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: agar agua
cm: centímetro
cv: cultivar
Dr: doctor
Dra.: doctora
EEUU: Estados Unidos
FAA: formalina – acético - alcohol
FCAYF: Facultad de Ciencia Agrarias y Forestales
Fig: Figura
g: gramos
ha: hectáreas
°C: grados Celsius
h: hora
l: litros
MSA: masa aérea seca
MSR: masa seca del rizoma
m: metro
Mpa: megapascal
μ: micrón
MEB: microscopio electrónico de barrido
MET: microscopio electrónico de transmisión
MO: microscopio óptico
Mm: milímetro
Min: minuto
PD: papa dextrosa
PDA: papa – dextrosa – agar
Rpm: revoluciones por minuto
Spp: especies
UFC: unidades formadoras de colonia
UNLP: Universidad Nacional de La Plata

LISTA DE TERMINOS

- Células estériles: se definen como las células formadas por partición de hifas no esporogénicas dentro del soro.
- Columela: se define como una estructura formada por material fúngico y huésped, que prolifera después del crecimiento inducido por hifas del meristema huésped, y conecta el soro al huésped. La columela es invariablemente de la misma longitud o ligeramente más corta que la longitud del soro.
- Esporogénesis: dentro del ciclo de vida haplo-diplonte en los hongos, es la parte en la que se producen las esporas.
- Peridio: capa externa en algunas fructificaciones, soro.
- Soro: Una estructura de los carbones donde las esporas se producen.

CARBONES

INTRODUCCIÓN

Los carbones son hongos patógenos de las Angiospermas que afectan a especies de importancia económica en **dicotiledóneas** (tales como papa, cebolla, maní) y **monocotiledóneas** (cereales, gramíneas). Se caracterizan por producir esporas típicas de color marrón a negro. Estas enfermedades son más conocidas en monocotiledóneas, especialmente en los cereales como por ejemplo podemos citar a: *U. hordei* (carbón cubierto) y *U. nuda* (carbón volador) de la cebada, *U. nigra* (carbón volador) de la avena, *Tilletia* sp. (carbón cubierto o caries del trigo) en trigo. En el mundo y hasta el siglo XX, se consideraban la causa de graves pérdidas en los granos y/o semillas, similares a las producidas por las royas, y actualmente se los consideran patógenos secundarios de los cereales, pero poseen el potencial de causar severas epifitias e importantes pérdidas económicas a la agricultura, aún con el uso de tratamientos químicos a las semillas y la utilización de cultivares parcialmente resistentes a estas enfermedades (Fischer & Holton 1957, Vánky 1985, Hirschhorn 1986, Wilcoxson & Saari 1996).

Los carbones pertenecen a la división Basidiomycota, clase Ustilaginomycetes, subclase Ustilaginomycetidae y se ubican sistemáticamente en dos Ordenes: Urocystales y Ustilaginales (Figura 1). Hasta 2012 en el relevamiento mundial realizado por el Dr Vánky se determinó la existencia 1650 especies y 93 géneros de carbones. El investigador considera que solamente se han identificado el 10% de las especies presentes en la naturaleza (Vánky 1985, 2012, Vánky & Abbasi 2013). En Argentina, la Dra Hirschhorn determino 14 géneros sobre aproximadamente 140 hospedantes (Hirschhorn 1986) y

determinó un nuevo género, *Juliohirschhornia* (Linden) Hirschh. Sobre *Paspalum plicatulum* Michx (Valle de Lerma de la provincia de Salta) en honor a su hermano Julio Hirschhorn que fue incluido en el Orden Ustilaginales y convalidado por Vánky (Vánky 2012).

El Orden Ustilaginales está integrado principalmente por dos géneros: *Sporisorium* y *Ustilago*. Las diferencias entre los dos carbonos se deben a las preferencias de las especies que parasitan en subfamilias Poaceae; el género *Sporisorium* infecta exclusivamente a la subfamilia Panicoideae y el género *Ustilago* infecta las subfamilias Pooideae o Chloridoideae (Begerow *et al.* 2006, McTaggart 2010, Mc Taggart *et al.* 2012, Vánky & Abbasi 2013).

Los carbonos son parásitos biotróficos que obtienen su alimento de las células vivas del hospedador. Los biotróficos fúngicos usualmente atacan solo un rango limitado de hospedantes. Estos hongos forman estructuras de infección como los haustorios, producen sustancias en pequeñas cantidades como enzimas o toxinas para estimular el ablandamiento de las paredes celulares y/o pueden entrar por aberturas naturales (estomas). Por este motivo los parásitos biotróficos son subdivididos en dos clases según el nivel de saprofitismo que poseen en la naturaleza (Lutrell 1974):

1.- Holobiotróficos: Hongos parásitos que son difícil de cultivar o crecen pobremente en estado micelial *in vitro* y son incapaces de crecer saprofitamente en la naturaleza, por ejemplo: las royas, oídios.

2.- Metabiotróficos: Hongos parásitos que crecen libre y usualmente en estado de brotación en medios de cultivos y pueden tener una capacidad limitada para un crecimiento similar saprófito en la naturaleza, por ejemplo: los carbonos.

Los carbones son enfermedades monocíclicas y no presentan estructuras sexuales. El monocarion (n) no es patógeno, siendo patógeno el dicarion ($n+n$) cuando se forma la hifa infectiva. Además, las especies son heterotálicas y necesitan de la unión de esporas compatibles para formar las teliosporas (= ustilosporas) que son ($n+n$) y cuando maduran son ($2n$). En la Figura 1 se ejemplifica mediante un esquema el proceso reproductivo de los carbones (Vánky 1987).

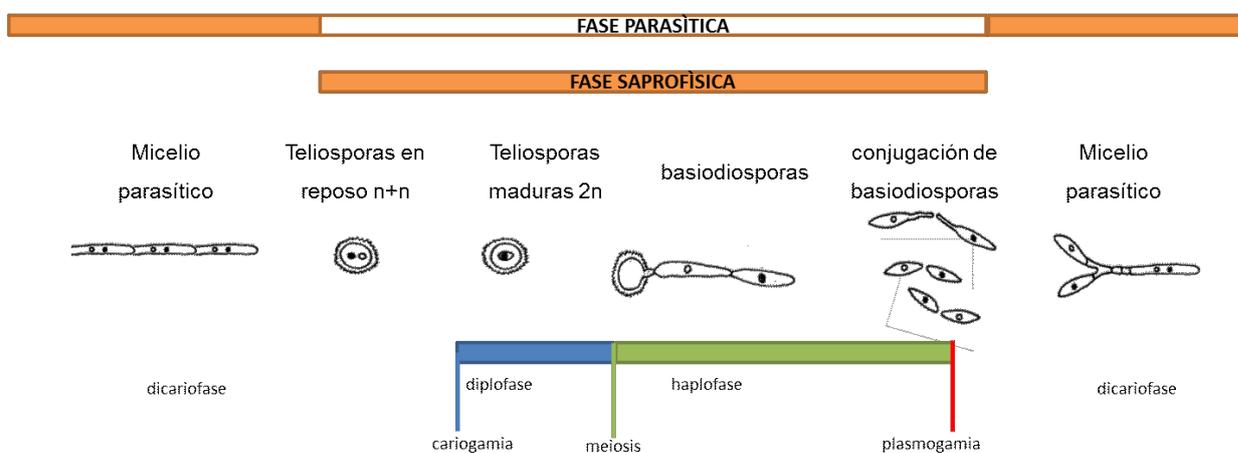


Figura 1: Esquema típico del proceso reproductivo de los carbones, según Vánky (1987).

En base a la información obtenida de los carbones como parásitos metabiotróficos en la Figura 2 se ejemplifica un ciclo de *U. bullata*, agente causal del carbón de la panoja de la cebadilla criolla sobre *Bromus*, tal como lo describe McTaggart (2010) en *U. cynodontis* sobre *Paspalum* sp con un **estado anamórfico** y un **estado teleomórfico**.

EL CICLO DE VIDA TÍPICO DE LOS CARBONES

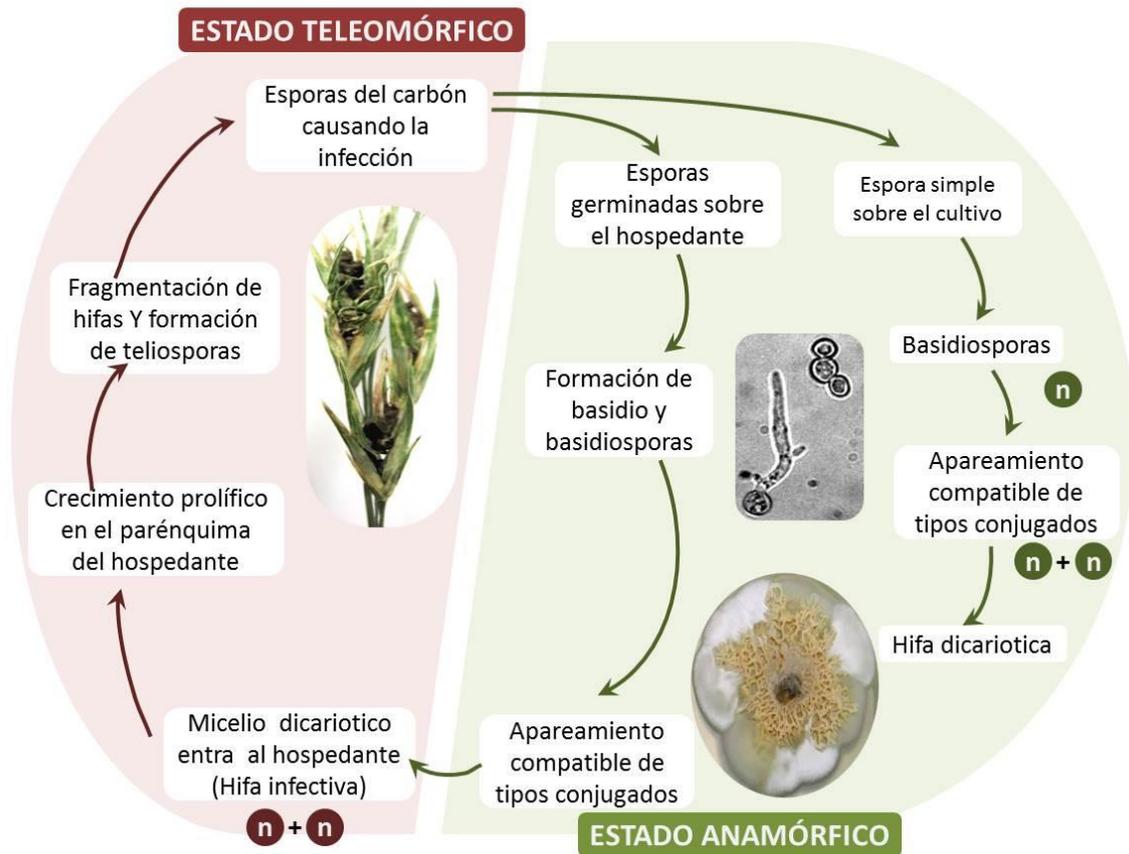


Figura 2: Ciclo de vida típico de los carbones, ejemplo sobre el género *Bromus* (Fotos: Astiz Gassó).

Para la identificación y clasificación taxonómica de los carbones se utilizan diferentes parámetros:

- Observaciones macroscópicas del órgano vegetal que infecta/n por ejemplo:
 - Monocotiledóneas: *U. maydis* (tallos, hojas, inflorescencias, espigas de maíz), *U. nuda* y *Tilletia* sp (espigas de trigo), *Sporisorium reilianum* (inflorescencias de sorgo).
 - Dicotiledóneas: *Thecaphora solani* (tubérculos de papa), *T. frezii* (frutos-cajas de maní), *Urocystis cepulae* (hojas, vainas de hojas y bulbos de cebolla), *Entyloma calendulae* (hojas de la caléndula).

- b. Características del peridio presencia o no de columela, por ejemplo:
 - 1. Con peridio (*Tilletia* sp.), sin peridio (*U. nuda*).
 - 2. Con columela (*Sporisorium cruentum*), sin columela (*S. reilianum*).
- c. Observaciones con microscopio óptico de las teliosporas (forma, color, episporio, etc.), teliosporas solitarias o formando glomérulos, presencia de células estériles, por ejemplo:
 - 1. Teliosporas solitarias (Orden *Ustilaginales*): *Sporisorium* sp.
Tilletia sp. *Ustilago* sp.
 - 2. Teliosporas en glomérulos (Orden *Urocystales*): *Thecaphora* sp.
Urocystis sp.
- d. Observaciones con microscopio de barrido y/o transmisión de la ultraestructura de tejidos afectados por el patógeno y teliosporas.
- e. Características de los ciclos de vida del patógeno: hospedantes que infectan y tipo de infecciones (locales o sistémicas), por ejemplo
 - 1. Infección local y enfermedad sistémica: *U. nuda* (carbón volador de la espiga de trigo y *U. hordie* (carbón volador de cebada).
 - 2. Infección local y enfermedad localizada: *U. maydis* (agalla del maíz) y *U. filiformis* (estría de la hoja de *Glyceria*), *Thecaphora frezii* (carbón de la caja del maní), *T. solani* (carbón del tubérculo de la papa).
 - 3. Infección sistémica: *Tilletia* sp. (carbón cubierto o caries del trigo), *U. bullata* (carbón de la panoja de la cebadilla).
- f. -Determinaciones moleculares que facilitan las resoluciones taxonómicas de los carbones (Figura 3).

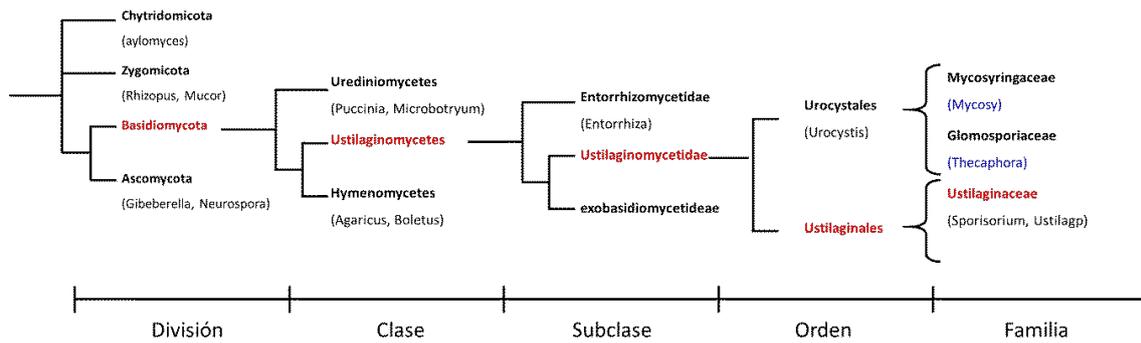


Figura N° 3: Clasificación taxonómica corroborada por métodos moleculares (Vánky & Abbasi 2013).

Hasta el presente existen insuficientes antecedentes sobre las alteraciones a nivel histopatológico y ciclos de vida de estos hongos sobre el género *Sorghum* (sorgo) y dos especies de valor forrajero- *Bromus* y *Glyceria*- registradas comúnmente en praderas y pastizales naturales en la Provincia de Buenos Aires.

La propuesta de tesis doctoral aportará información original para el país con miras a profundizar el conocimiento de la interacción hospedante-patógeno y avanzar en estrategias del manejo de las enfermedades producidas por *U. filiformis*, *U. bullata* y *S. cruentum* en Poáceas de los géneros *Sorghum*, *Bromus* y *Glyceria*.

Sorghum halepense L. (sorgo de alepo) es una de las diez especies de malezas perennes más importantes del mundo (Holm *et al.* 1977), ocupando en Argentina más de 7 millones de has. El sorgo de alepo se reproduce por semillas y por rizomas. En nuestro país para su control se utiliza como práctica cultural habitual la siembra directa y aplicación de herbicidas, pero esta estrategia de control puede producir en el transcurso del tiempo efectos no deseables en el ecosistema o manifestar resistencia a los compuestos

agroquímicos por su uso constante. Dadas las características vegetativas y reproductivas del sorgo de alepo, es de suma importancia desarrollar alternativas que contribuyan al desarrollo de un manejo integrado de la especie, a fin de atenuar su impacto en la producción de los cultivos con los cuales compite (Holm *et al.* 1977; Mitidieri 1984). Hirschhorn (1986) reportó la presencia en *Sorghum* spp. y *S. halepense* de *Sporisorium cruentum* (Kühn) Vánky en la Argentina. Es un hongo biotrófico, que produce una infección de “tipo sistémico” y completa su ciclo de vida en el hospedante. La infección de *S. cruentum* se inicia cuando las esporas están en contacto con la planta y germinan produciendo hifas que penetran en el tejido colonizando brotes y rizomas. Además, este patógeno se difunde internamente hasta alcanzar las inflorescencias formando un soro que se desarrolla a expensas del ovario impidiendo la formación de la semilla (Vánky 1985).

Glyceria multiflora Steud., es una gramínea nativa, perenne invernal y rizomatosa, que habita pastizales bajos, bañados y cubetas del sur de Entre Ríos, ribera Rioplatense y la Cuenca del Salado, en la provincia de Buenos Aires. Se ha señalado su preferencia por los animales por cuanto es clave su persistencia como recurso forrajero en los potreros de una explotación ganadera (Rossi *et al.* 2006, 2009).

Por otra parte, entre las adversidades de origen biótico se reportó un carbón que afecta a las vainas y láminas foliares. *Ustilago filiformis* (= *U. longissima*) (Sch) Meyen es patógeno de varias especies de *Glyceria* incluyendo a *G. multiflora*. La enfermedad, se denomina carbón estriado de la hoja de *Glyceria*. Las plantas infectadas son ligeramente enanas, levemente amarillentas, y manifiestan fallas en la formación de las flores o espiguillas. La

esporulación del hongo puede ocurrir durante todo el desarrollo del hospedante. Las teliosporas son dispersadas por el viento y el agua. La semilla no es considerada como vía de transporte de la enfermedad (Vánky 1985). El primer reporte sobre *U. filiformis* en la Argentina fue realizado por Hirschhorn (1986) en la localidad de La Plata. En el año 2006 la enfermedad fue observada en pasturas de la zona de Jeppener, Provincia de Buenos Aires, y se documentaron aspectos relacionados al comportamiento del patógeno en el hospedante (Astiz Gassó *et al.* 2006).

Bromus catharticus Berk. (Cebadilla criolla, Cebadilla, *Rescue grass*, *Brome grass*) es otra especie nativa constitutiva de las planicies templadas del cono sur. Su ciclo vegetativo es otoño-invernal. Los ecotipos bianuales se hacen perennes en las pasturas por su facilidad de resiembra natural. En la Argentina ocupa el segundo lugar como especie sembrada después de *Festuca arundinacea* (*Festuca alta*). La resiembra de esta pastura se ve frecuentemente limitada por el ataque del carbón de la panoja de la cebadilla (*U. bullata*). Las teliosporas de *U. bullata* se ubican entre/sobre las glumas, entre glumas y cariopse y/o suelo. Es un hongo del “tipo sistémico” cuya infección se inicia cuando las teliosporas germinan y alcanzan la superficie de las plántulas. La viabilidad de las esporas en el suelo es de varios años (Hirschhorn 1986). Este patógeno produce todos los años importantes mermas en la producción de semillas en la región pampeana, afectando la resiembra natural y la disponibilidad comercial de semillas. Este hongo es un patógeno que infesta la semilla y se controla con fungicidas contacto y sistémicos, pero en la resiembra natural se suelen presentar problemas por las panojas infectadas en el segundo año con decrecimiento vegetativo en el campo (Astiz Gassó *et al.*

2004). También se han realizados trabajos tendientes a estimar un “umbral” de esporas presentes en la semilla y dosis de terapicos para lograr un mayor control de la enfermedad (Astiz Gassó *et al.* 2009).

En año 2001, en el Instituto Fitotécnico Santa Catalina (FCAYF UNLP), se iniciaron las primeras investigaciones sobre el uso de un agente biocontrolador (*Trichoderma* sp.) como bioinsumo a incorporar dentro de un esquema de manejo integrado de la enfermedad producida por el patógeno *U. bullata* en plantas de *cebadilla criolla*. Se observó que algunas cepas de *Trichoderma* spp. que se aislaron de la rizósfera plantas de cebadilla que no estaban atacadas por el patógeno, inhibían en crecimiento *in vitro* de las cepas de *U. bullata* (Albertó *et al.* 2001; Astiz Gassó *et al.* 2007). El tratamiento biológico de las semillas con *Trichoderma* spp. se emplea hoy día como estrategia para el combate de hongos fitopatógenos con el objetivo de disminuir la infestación natural acompañante de la misma, y darle protección en el nicho de siembra. Esta técnica es muy utilizada por ser rápida, de fácil aplicación, además de economizar tiempo y recursos. En el proceso de aplicación, es importante tener en cuenta la textura de las semillas (lisas, verrugosas y/o presencia de glumas), y la incorporación de un adherente para asegurar el recubrimiento de estas con la dosis recomendada del producto.

Cabe destacar que estos productos biológicos son uno de los puntales de la agricultura sustentable, y en la actualidad, su producción comercial se ha extendido considerablemente a nivel mundial, aunque es incipiente en Argentina. Los biocontroladores son elementos claves en el manejo integrado de los cultivos, siendo el control biológico una herramienta que utiliza recursos naturales para mantener las poblaciones de especies dañinas en cultivos por

debajo de niveles que causen daños económicos. Pero para incorporar productos biológicos en el manejo de un cultivo, es imprescindible conocer la sensibilidad de los agentes biológicos a los agroquímicos que se emplearán en dicho manejo, con el fin de conservar su capacidad controladora y establecer medidas para su uso eficiente. En este sentido, investigaciones recientes indican que la respuesta de *Trichoderma* varía en dependencia de las combinaciones especie/cepa de microorganismos y productos fitosanitarios evaluados (Martinez *et al.* 2013) por lo que debe ser testeado en cada situación en particular y patosistema a manejar.

Teniendo en cuenta que el uso de controladores biológicos constituye hoy día una necesidad económica y ecológica obligada, convirtiéndolo en insumo interesante a los productores del campo, dada la falta de información existente, se profundizó este aspecto en la presente tesis doctoral analizando la efectividad de *Trichoderma* en el patosistema *B. catharticus-U. bullata*.

HIPOTESIS DE TRABAJO

- *Sporisorium cruentum*, *Ustilago filiformis* y *Ustilago bullata* producen distintos tipos de infección y alteraciones histopatológicas en los tejidos vegetativos y reproductivos de sus hospedantes.
- El conocimiento de las razas de *U. bullata* y la variabilidad genética de *Bromus* sp. permitirán en el futuro aplicarse estrategias en el manejo de *U. bullata* en el género *Bromus*.

- El establecimiento de un umbral de esporas en semillas de *B. catharticus* y la determinación de la dosis de terapicos de semillas logra una mayor eficacia y eficiencia en el control de la enfermedad en el cultivo.
- *Trichoderma* spp. disminuye la infección de *U. bullata* en plantas de *Bromus* spp.
- El uso combinado de *Trichoderma*-terapicos sintéticos aporta un mayor control y mejora el manejo del patógeno *U. bullata* sobre *B. catharticus*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de los carbonos en los tejidos vegetativos y reproductivos de Poáceas de los géneros *Sorghum*, *Glyceria* y *Bromus*, mediante el estudio de la biología de los patógenos *S. curentum*, *U. filiformis* y *U. bullata* respetivamente y el análisis de las alteraciones histopatológicas ocasionadas en dichos hospedantes.
- Evaluar la combinación entre *Trichoderma*-terapicos de semilla para su aplicación en el manejo integrado de *Ustilago bullata* en *Bromus catharticus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los efectos y alteraciones ocasionadas por *S. curentum* a nivel celular en los tejidos vegetativos y reproductivos de las plantas de *S. halepense*.

- Determinar el tipo de infección (sistémica o local) y los cambios histopatológicos resultantes de la evolución de *U. filiformis* en plantas de *G. multiflora*.
- Evaluar los efectos y alteraciones ocasionados por *U. bullata* a nivel celular en los tejidos vegetativos de las plantas de *B. catharticus*.
- Determinar la existencia de formas fisiológicas en poblaciones *U. bullata* y el comportamiento en diferentes especies del genero *Bromus*.
- Determinar el umbral de esporas en semillas de cebadilla y dosis de terapicos para el control con agroquímicos de *U. bullata* en *B. catharticus*.
- Deteminar si aislamientos de *Trichoderma* spp. de la rizósfera de plantas de *B. catharticus* son efectivas para el biocontrol de *U.bullata*.
- Determinar la efectividad de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de *U. bullata* en plantas de *B. catharticus*.
- Evaluar la combinación de *Trichoderma*-terápicos de semilla de cebadilla y su eficacia en el manejo integrado de *U. bullata*.
- Documentar con fotomicrografías las alteraciones histopatológicas y daños producidos en los patosistemas mencionados.

BIBLIOGRAFÍA

- Albertó E.C., Varaschin C.I., Astiz Gassó M.M., Sannazzaro A. 2001.** Ensayos de antagonismos utilizando especies de *Trichoderma* para el control de las Ustilaginales *Tilletia laevis* y *Ustilago bullata*. Jornada Nacional de Planes y Estrategias de Control de Plagas. Morón, Buenos Aires. Resúmenes Pág. 5.
- Astiz Gassó M.M., Galián L.R., Aulicino M.B. 2009.** Evaluación de fungicidas para el control del carbón de la cebadilla (*Ustilago bullata*) con diferentes niveles de infestación en *Bromus catharticus*. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resúmenes: PV04.
- Astiz Gassó M. M., Llama A.M., Lovisolo M., Galián L.R. 2004.** Carbón de la panoja (*Ustilago bullata* Berk) de cebadilla criolla Genesis 54: 24-25.
- Astiz Gassó M.M., Lovisolo M. De Magistris A., Leis R. 2006.** Reporte del carbón *Ustilago longissima* (Sch) Meyen sobre *Glyceria multiflora* Stued. (Poaceae) en la provincia de Buenos Aires. Actas XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Resúmenes Pág. 278.
- Begerow D., Stoll M., Bauer R. 2006.** A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. Mycologia 98 (6) 906-916.
- Holm L.G., Plucknett D.L, Pancho J.V., Herberger J.P. 1977.** The world's worst weeds, distribution and biology. pp. 54-61. University of Hawaii. Honolulu, Hawaii, USA.
- Hirschhorn E. 1986.** Las Ustilaginales de la Flora Argentina. Publicación Especial Editor CIC 530 pp.

- Luttrell E.S. 1974.** Parasitism of fungi on vascular plants. *Mycologia* 6: 1-15.
- Martinez B., Infante D., Reyes Y. 2013.** *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de protección Vegetal* 8 (1): 1-11.
- McTaggart R.A. 2010.** Sytematics of the Ustilago-Sporisorium-Macacpinomyces complex of smut fungi. Ed. CRC Plant biosecurity. Queensland University of Tecnology, Discipiline Biogeosciences. 204 pp.
- Mc Taggart R.A., Shivas R.G., Geering, Vánky K., Scharaschkin, T. 2012.** Taxonomic revisión of *Ustilago*, *Sporisorium* and *Macalpinomyces*. *Persoonia* 29: 116-132.
- Mitidieri A. 1984.** Sorgo de Alepo: importancia, biología y aspectos básicos para su control. *Biokemia* 4:25-36.
- Rossi C.A., Ferrari L., Postulka E. 2006.** Germination conditions for cebadilla de agua (*Glyceria multiflora* Steudel), a native grass of the flooding Pampa Rangeland (Argentine). *International Journal of Botany* 2 (3) 300-306.
- Rossi C.A., González G., De Magistris A.A., Torrá E. 2009.** Composición botánica del pastizal natural en un sistema silvopastoril del Delta del Paraná: clasificación forrajera. *Actas del 1º Congreso Nacional de Sistema Silvopastoriles*. Pág. 321-326.
- Vánky K. 1985.** Carpathian Ustilaginales. *Acta Universitatis Upsaliensis. Symbolae Botanicae Upsalienses XXIV: 2 UPPSALA* 309 pp.
- Vánky K. 1987.** *Illustrated Genera of Smut Fungi*. Ed. Jülich W. Gustav Fischer Verlag. New York 159 pp.
- Vánky K. 2012.** *Smut Fungi of the World*. Ed. APS Press 1458 pp.
- Vánky K., Abbasi M. 2013.** Smut fungi of Iran *Mycosphere* 4 (3): 363-454.

Wilcoxson R.D., Saari E.E. 1996. Bunt and Smut Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Eds México, D.F., CIMMYT.66 pp.

CAPITULO I

HISTOPATOLOGÍA Y ALTERACIONES MORFOLÓGICAS PRODUCIDAS POR *Sporisorium* sp. EN RIZOMAS DE *Sorghum halepense*

RESUMEN

Sporisorium cruentum (Kühn.), es el agente causal de enfermedades en el género *Sorghum* incluyendo *Sorghum halepense* (L.) Pers.. El presente trabajo tuvo por objeto analizar el desarrollo y la evolución del patógeno en los tejidos del hospedante, y evaluar las implicancias de la enfermedad en el crecimiento vegetativo de los rizomas del sorgo de alepo.

Para determinar la presencia del hongo se realizaron cortes histológicos del hospedante que se observaron por medio de microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica transmisión y de barrido (MET, MEB). Se estimó la cantidad de biomasa producida de la parte aérea y de los rizomas de *S. halepense*. El efecto de *S. cruentum* en las diferentes etapas de crecimiento de la maleza se evaluó bajo condiciones de invernáculo. Para la inoculación de los rizomas se utilizaron tres métodos: 1) **T1**: Infecciones con método hipodérmico; 2) **T2**: inmersión de rizomas en suspensión de medio de cultivo caldo papa-dextrosa (PD 2%) con teliosporas realizando vacío a 0.1 MPa; 3) **T3**: inmersión de rizomas en cultivo de esporidias realizando vacío a 0.1 MPa (5 min.) y control: inmersión de rizomas en PD 2%. En los tres casos se observó el proceso de infección a través de los tejidos para detectar la presencia del micelio del hongo en los meristemas vegetativos y reproductivos.

Los tres métodos fueron efectivos para la infección de los rizomas pero se observó que el método **T1** fue el más agresivo debido a que produjo inducción de yemas múltiples. En los tres casos el micelio del hongo se localizó por debajo de meristema apical, en la hoja, los primordios florales y la espiguilla de la panoja. También se observó como síntoma característico del género *Sporisorium*, el acortamiento de entrenudos, la producción de panojas estériles y la formación de filodios en el hospedante. Los tratamientos **T2** y **T3** causaron una disminución total de la masa aérea seca (MSA) de 0,33 g.pl⁻¹ y un 39,2 g.pl⁻¹ en la producción de rizomas (MSR) con respecto al control. De acuerdo a los resultados obtenidos, una vez vencidas las barreras estructurales de los rizomas, *S. cruentum* posee una alta eficacia para producir infecciones en sorgo de alepo. Es importante destacar que debido al efecto que produce sobre la biomasa de los rizomas de *S. halepense*, *S. cruentum* podría ser utilizado como agente de biocontrol para ser aplicado en el manejo integrado de esta maleza para una agricultura sustentable.

Palabras claves: *Sporisorium cruentum*, loose kernel smut, *Sorghum halepense*, Johnsongrass, histopatología, métodos de inoculación.

INTRODUCCIÓN

Sporisorium cruentum (Kühn.) (= *Shacelotheca cruenta*) es el agente causal de enfermedades en distintas especies del género *Sorghum* incluyendo *Sorghum halepense* (L) Pers., aunque ciertas variedades o híbridos de sorgo son inmunes o altamente resistentes a este carbón. El sorgo Sudangrass no es generalmente afectado por este patógeno. *S. cruentum* es el carbón que tiene menor incidencia como enfermedad en el género *Sorghum* (Hirschhorn 1986).

S. cruentum se caracteriza por ser, como en la mayoría de las especies del Orden de las Ustilaginales, un parásito biotrófico del “tipo metabiotrófico”. Estos patógenos poseen la característica de poder desarrollarse como saprófitos en medio de cultivo artificial. Esto se debe a que tienen un estado esporidial que les permite multiplicarse por brotación “tipo levadura” y otro parásito “tipo micelial” en el huésped, completando de esta forma el ciclo de vida (Luttrell 1974).

La infección de *S. cruentum* se inicia cuando las esporas están en contacto con las plantas en el suelo y por el efecto de la interacción entre hospedante-patógeno se induce la germinación de las mismas. Las teliosporas producen hifas infectivas que penetran en la epidermis de las plantas jóvenes y comienzan a colonizar los tejidos de los brotes y los vástagos de los rizomas. Este patógeno tiene la característica de difundirse internamente por el meristema apical hasta alcanzar las inflorescencias donde se forma un “soro”, el cual se desarrolla a expensas del ovario. Generalmente todas las semillas en la panoja son carbonosas y la destrucción parcial es poco común. Algunas panojas pueden ser transformadas en panojas estériles o formar filodios

cuando escapan a la infección. Las panojas carbonosas aparecen anticipadamente en el cultivo. También tienen la característica que se abren antes que las panojas sanas. Las semillas son reemplazadas individualmente por un “soro” que mide 2,5 cm o más de largo, y termina en forma de punta cónica. Esta estructura normalmente se encuentra rodeada por una membrana frágil (peridio) que se rompe rápidamente, y paralelamente se produce la formación de una pequeña columela curvada recubierta de teliosporas (Fischer & Holton 1953, Vánky 1985, Duran 1987).

Sorghum halepense (=Johnsongrass, sorgo de alepo) es una gramínea que pertenece a la familia Poáceae y es una de las diez especies de malezas perennes más importantes del mundo (Holm *et al.* 1977). En Argentina esta especie ocupa más de 7 millones de has (Mitidieri 1984) y su lugar de origen fue situado en un área abarcada por el mar Mediterráneo, Asia menor (Irán y Turquía) y sudoeste de Europa (Piper 1928). De Wet y Huckaby (1967) posteriormente determinan un ecotipo tropical ubicado en el sur de India y en el oeste de Pakistán. Este último es reemplazado por un ecotipo mediterráneo distribuido en Asia menor, sudoeste de Europa y norte de África. Estos autores afirman que el ecotipo mediterráneo fue posteriormente introducido en América y Australia. *Sorghum halepense* se reproduce por semillas y por rizomas. Una planta de esta especie puede producir 80.000 semillas, y 62.5 m de rizomas, con 8000 g de peso, en una estación de crecimiento (Mc Whorter 1961, Anderson 1996).

La capacidad de perpetuación del sorgo de alepo es por medio de las semillas y brotación de rizomas. Luego de los 40-50 días de la emergencia, es muy difícil establecer si la estructura aérea ha sido generada por rizomas o por

semillas. Desde el punto de vista biológico, poblacional y de manejo, no existen diferencias entre plantas adultas generadas por una semilla o un rizoma. En el caso de las semillas de sorgo de alepo, estas le brindan a la especie la posibilidad de ser la fuente principal de dispersión a distancia, además proporcionan variabilidad genética que le permite la adaptación de la población a los diferentes ambientes que afectan a la actividad humana (Ghersa & Satorre 1981, Satorre *et al.* 1981, Mendez Fernández *et al.* 1983, Leguizamón 2012).

En los campos destinados a la agricultura, y especialmente en los cultivos en los que existe superposición de ciclos con el sorgo de alepo, los perjuicios ocasionados por esta especie son a través de los mecanismos de competencia por nutrientes y por acción de sustancias inhibitorias producidas por las raíces. Estas últimas afectan la germinación de semillas de otras especies cultivadas y este efecto alcanza una gran importancia en las áreas productivas (Satorre *et al.* 1981).

Se han determinado diferentes fitopatógenos afectando a *S. halepense*: *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas holcicol*, *Helminthosporium* spp., *Spacelotheca holci*, *Mycosphaerella* sp., *Phoma* sp., *Puccinia purpurea*, *P. graminis*, diferentes virosis (Templeton 1982, Holm *et al.* 1977; Vánky 1985, Masion & Lindow 1986; Millhollon 2000) y *Bipolaris sorghicola* (van Dyke & Winder 1985, Winder & van Dyke 1990). También el sorgo de alepo es considerado un hospedante alternativo de transmisión de varias enfermedades en las áreas de producción agrícola. En la Argentina se identificaron varios patógenos tales como *S. cruentum* (Hirschhorn 1986); *Alternaria* spp, *Drechlera* spp., *Curvularia* spp., *Phyllosticta* spp., *Phoma* spp. (Verdejo *et al.* 1995) y

Bipolaris sorghicola (Acciarsi & Mónaco 1999). Estos patógenos afectan al desarrollo vegetativo, pero tienen en algunos casos escasa influencia en la etapa reproductiva. En el caso de *S. cruentum* evita la formación de las semillas porque son reemplazadas por las teliosporas del carbón y a su vez son dispersadas por el viento para reinfectar otras plantas.

En este capítulo se presentan los resultados de la investigación llevada a cabo para estudiar la implicancia que tiene el patógeno *S. cruentum* a través de su desarrollo y evolución en los tejidos del hospedante (*S. halepense*), y su efecto en el crecimiento vegetativo de los rizomas.

HIPOTESIS

- *Sporisorium cruentum* produce distintas alteraciones histopatológicas en los tejidos vegetativos y reproductivos de plantas de *Sorghum halepense*.

OBJETIVO

- Evaluar los efectos y alteraciones ocasionados por *Sporisorium cruentum* a nivel celular en los tejidos vegetativos y reproductivos de las plantas de *Sorghum halepense*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada en esta investigación fue adaptada y modificada en base a técnicas utilizadas para el estudio de otras especies de Ustilaginales, como lo ha mencionado Fernández *et al.* (1978), Matyac (1985), Craig & Frederiksen (1992) y Moharam *et al.* (2012)

Preparación de los rizomas

Se realizaron dos ensayos en invernadero. Se utilizaron rizomas de *S. halepense* susceptible al carbón, extraídos de un clon cuyas panojas presentaban ataques de carbón procedente de infecciones naturales. Las muestras fueron seleccionadas del campo experimental del Instituto Fitotécnico de Sta. Catalina, situado en la Localidad de Llavallol, provincia de Buenos Aires. Los rizomas se trozaron dejando dos yemas/rizoma, que luego se lavaron bajo una corriente de agua durante 2 horas. Posteriormente, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 20 min y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril para realizar las diferentes experiencias.

Preparación del inóculo

Se tomaron las muestras de las panojas de plantas infectadas naturalmente a campo y luego se observaron con microscopio estereoscópico para determinar y confirmar la especie de carbón.

Las teliosporas fueron extraídas de las inflorescencias para su determinación taxonómica: 1.- Se montaron en lactofenol para su visualización con microscopio óptico (MO) 2.- Se montaron en platina y se metalizaron con una capa de oro paladio para su observación bajo microscopio electrónico de barrido (MEB) (D'Ambrogio Argüeso 1986).

Las panojas infectadas fueron trituradas con mortero para obtener una abundante masa carbonosa y homogenizar la muestra. Luego el material se desinfectó en solución de hipoclorito de sodio al 3% durante dos minutos, mientras se centrifugaba a 3000 rpm, para evitar posibles contaminantes. Posteriormente, se realizaron tres lavados en agua destilada estéril. Este

procedimiento se realizó tanto para el tratamiento de suspensión de las teliosporas como en la obtención de los cultivos axénicos.

Para la preparación de los cultivos esporidiales se tomaron alícuotas de 0,1 ml de suspensión de esporas desinfectadas y se sembraron en placas de Petri que contenían papa-dextrosa- agar al 2% (PDA). Luego fueron incubadas en estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad. A partir de las 12 h se comenzó a observar la germinación de las teliosporas hasta la formación de las colonias. Las cepas se aislaron en tubos en pico de flauta con medio de PDA y se guardaron en heladera a 5°C para luego ser utilizadas en los ensayos. Para la caracterización morfo-cultural (crecimiento, forma, color) se sembró un disco de 6 mm diámetro en el centro de una placa de Petri de 6 cm y se la incubó en estufa a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para la preparación del inóculo con los cultivos esporidiales de las cepas aisladas fueron transferidas al medio de cultivo líquido de caldo-papa-dextrosa al 2% (PD) y se llevaron a incubar a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. El inóculo fue mantenido en agitación continua, utilizando un agitador rotativo hasta que la densidad del inóculo alcanzó una concentración de 10^{6-8} esporidias/ml, luego de 4 días de incubación. (Astiz Gassó *et al.* 2001).

Cuando se obtuvieron los materiales, se programaron dos ensayos sobre los rizomas:

Tratamiento 1: Inoculación de plántulas de sorgo con aguja hipodérmica.

Tratamientos 2-3: Inoculación de yemas al vacío (suspensión de teliosporas y cultivos líquidos de esporidias).

Inoculación de plántulas de sorgo con aguja hipodérmica

Los rizomas se sembraron en bandejas plásticas (10 x 13 x 15 cm) que contenían arena estéril y se regaron con agua destilada estéril. Las bandejas se llevaron a una cámara en condiciones ambientales para favorecer el desarrollo de las plantas a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de 80-90% y ciclos de 16 h luz/8 h oscuridad. Cuando emergieron las plántulas y presentaron un buen desarrollo vegetativo (3-4 hojas) se inocularon con una suspensión de cultivos esporidiales (concentración de 10^{6-8} esporidias/ml), utilizando una jeringa y aguja hipodérmica por debajo del meristema apical (Edmunds 1963). En este ensayo se trataron 30 plantas y un número igual de plantas blanco como testigo. A partir del tercer día, se comenzó la extracción de 5 plantas por cada estado vegetativo hasta completar el ciclo biológico del sorgo de alepo o hasta la aparición de síntomas visibles del patógeno.

Las muestras fueron fijadas en FAA (alcohol etílico, formol, ácido acético glacial) y posteriormente, fueron procesadas en el laboratorio utilizando diferentes técnicas histológicas.

En este ensayo se evaluó la presencia del micelio en las estructuras vegetativas y reproductivas del sorgo de alepo (yema apical, hoja, tallo e inflorescencia).

Inoculación de rizomas con teliosporas y cultivos esporidiales al vacío

Este ensayo se realizó con dos tipos de inóculo, pero aplicando la misma técnica de inoculación:

Tratamiento T1: inmersión de rizomas en PD blanco.

Tratamiento T2: inmersión de rizomas en suspensión en cultivo líquido (PD) + teliosporas (10^{-6-8} esporas/ml) aplicando vacío de 0.1 MPa durante 5 min.

Tratamiento T3: inmersión de rizomas en cultivo líquido (PD) con esporidias (10^{6-8} esporidias/ml) aplicando vacío de 0.1 MPa durante 5 min (Mónaco *et al* 2001; Astiz Gassó *et al* 2001).

Los materiales inoculados se sembraron en bandejas plásticas (10x13x15 cm) que contenían arena estéril y se regaron con agua destilada. Luego éstas se llevaron a cámara en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de las plantas y el inóculo del patógeno (temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa 40-60% y ciclos de 16h luz/8h oscuridad. Cuando las plántulas tuvieron 2-3 hojas fueron transplantadas en macetas de cuatro litros de capacidad que contenían tierra negra desinfectada, para evitar la contaminación con otros microorganismos, a razón de 2 plántulas/maceta en un total de 20 macetas. Luego fueron trasladadas al invernadero para que completen el ciclo vegetativo. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones, sembrándose 2 plántulas/maceta en 20 macetas/tratamiento y controles.

Técnicas histológicas en laboratorio

Para este ensayo se extrajeron periódicamente muestras de las plantas inoculadas en las que se observó el desarrollo de síntomas del patógeno

(clorosis, alteraciones morfológicas, etc.) y de los testigos sin tratar. Las muestras de hojas infectadas (1mm x 1mm del área afectada), las de hojas sanas y de los primordios de yemas vegetativas y florales, se fijaron en glutaraldehído para posteriormente realizar las inclusiones con resinas sintéticas Spurr de baja viscosidad. Para la realización de los cortes se usó un micrótomo Sorvall MT 2-13 con cuchilla de vidrio para obtener secciones semifinas de 1µm de espesor y luego fueron teñidas con azul de toluidina. Las muestras de tallos, yemas apicales, espiguillas de panojas infectadas y controles se fijaron en FAA y posteriormente se pre-trataron con ácido fluorhídrico al 10% durante 7 días, para la eliminación del sílice presente en la epidermis de la familia Poáceas. La inclusión se realizó en parafina para los cortes transversales y longitudinales de aproximadamente 10-12 µm de espesor usando un micrótomo tipo Minot. Para la observación microscópica se realizó la coloración doble de safranina-fast-green y se montaron en DePex. Los preparados fueron observados en microscopio óptico (Bracegirdle & Miles 1975, D'Ambrogio Argüeso 1986).

Evaluación de las inoculaciones al vacío

En este ensayo se extrajeron muestras de hojas que presentaban manchas y se observaron utilizando técnicas de tinción con montaje en azul de trypan en lactofenol. Se observó con microscopio óptico, para confirmar la presencia del patógeno en el tejido.

Para evaluar la evolución de *S. cruentum* y la relación hospedante-patógeno en sorgo de alepo, se extrajeron muestras de meristemas apicales antes de la elongación de los tallos, de espiguillas antes de emerger las inflorescencias de la hoja bandera, y de panojas carbonosas. Al finalizar el ciclo

vegetativo del sorgo de alepo se contabilizaron el número de plantas infectadas y no infectadas con el carbón, para calcular el porcentaje de infección sobre el total de plantas. También se extrajeron 5 plantas completas de sorgo de alepo al azar por repetición y testigos para los tratamientos **T2** y **T3**. Al finalizar el ciclo de crecimiento de la maleza, se procedió a separar la parte aérea de la subterránea para determinar las variables: materia seca aérea (MSA, g.pl⁻¹) y materia seca de rizomas (MSR, g. macetas⁻¹). Para estas determinaciones se colocó el material en estufa y se mantuvo hasta peso constante durante 48 h de acuerdo a la metodología propuesta por Ward *et al.* (1978) y se obtuvo el peso seco de las muestras tratadas y testigo.

Para el análisis estadístico de los datos, se analizaron las medias de los tratamientos y se compararon mediante el método de las diferencias mínimas significativas (LSD) ($p < 0.05\%$) utilizando el método estadístico SAS 6.03 (SAS, 1989).

RESULTADOS

Determinación taxonómica de *Sporisorium cruentum*

Las observaciones macroscópicas confirmaron que los soros corresponden a los típicos de la especie *S. cruentum*, que presentan un peridio frágil y columela curvada (Fig. 1A).

Las teliosporas tienen forma redondeada a subglobosa; episporio equinulado; tamaño de 6-8µm de diámetro y color marrón oscuro, tal como se comprobó en los preparados de microscopio electrónico de barrido (MET) como óptico (Fig. 1 B, C).

Las teliosporas germinaron *in vitro* y emitieron metabasidios (=promicelios) tabicados con 4 células y formación de basidiosporas (=esporidias) laterales. La multiplicación es por brotación, lo que generó una cantidad abundante de nuevas esporidias (Figura 1 D). Las esporidias rápidamente formaron colonias del tipo levadura de color marrón claro al ocre en PDA y presentaron un crecimiento del tipo radial que a los 20 días cubrió la caja de Petri de 6 cm de diámetro (Fig. 1 E).

Evaluación del método de inoculación con jeringa hipodérmica

Las plantas provenientes de rizomas con 4 a 6 hojas desarrolladas fueron inoculadas con las esporidias. A partir del tercer día, se tomaron muestras de los meristemas apicales y de las hojas de las plantas tratadas y testigos para realizar los cortes longitudinales. Los provenientes de las plantas sanas no presentaron infección del patógeno (Figura 2 A), a diferencia de las plantas que fueron tratadas en las que se observó el desarrollo inter e intracelular de las hifas del hongo (Figura 2 B). Entre los 10 a 15 días posteriores a la inoculación se registró en 4 plantas, síntomas del tipo hipoplásico con clorosis leves a marcadas (Figura 2 C) y del tipo metaplásico con producción de pigmentos antociánicos. También se produjo pérdida de hojas por necrosis vascular. En cortes transversales de la vaina parenquimática de los haces vasculares se observó, en los preparados semifinos para MET, la ausencia de cloroplastos o parte de ellos degradados cuando el hongo penetra dentro de la vaina (Figura 2 D). En el testigo, en la misma zona, se visualizó la normal ubicación de los cloroplastos, como se registra en las plantas C4 (Figura 2 E). En las plantas dónde la clorosis fue marcada, se observó un

menor vigor en el crecimiento sin inducir a la muerte de las mismas. Estas observaciones fueron confirmadas a nivel ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión. Las hojas sanas mostraron cloroplastos normales en el clorénquima del mesófilo y de la vaina parenquimática de los haces vasculares. También se observó un desarrollo normal de las estructuras presentes en el citoplasma, tales como glóbulos lipídicos, retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias, y vesículas (Figura 3 A, B). A diferencia de las hojas de las plantas tratadas que presentaron una desorganización de sus células por la presencia de las hifas del patógeno. (Figura 3 C, D).

A partir de los 18-25 días de inoculadas se produjo la elongación del tallo del estadio reproductivo y se observó en los nudos superiores la inducción de la formación yemas múltiples entre 3 a 7 yemas que se originaban en un nudo común, este tipo de anomalía es típica de la especie *S. cruentum*. Posteriormente, se visualizó la emergencia de pequeñas panojas infectadas o la formación de panojas estériles o filodios o pequeños vástagos (Figura 4 A). No se observaron estas anomalías en el testigo. Cuando se realizaron los cortes histológicos de los pequeños vástagos, se visualizó en tres de ellos la formación de yemas: una vegetativa y otra reproductiva, protegidas por la formación de primordios foliares (Figura 4 B). Las hifas del hongo se observaron con microscopio óptico en la base del meristema del vástago (Figura 4 C, D) y se confirmó en detalle con MET (Figura 6 A, B).

En los cortes longitudinales y transversales realizados en los tallos, no se observó la presencia del patógeno en las plantas tratadas y no tratadas siendo el órgano reproductivo infectado por el patógeno.

También se determinó que el patógeno no proliferó hasta que el gineceo estuvo totalmente desarrollado dentro de la espiguilla. De esta manera la invasión del hongo comenzó en primer término por el gineceo, donde se observó que la hifa se fragmenta y produjo la espermogénesis con la formación de teliosporas. El proceso de esporulación continuó por las anteras hasta producir la desintegración total de los tejidos que las componen. Los granos fueron sustituidos por los soros que median 2,5 cm o más rodeados por una membrana delgada de color gris. Esta membrana se rompió al emerger la panoja y las teliosporas de color marrón a negras se desprendieron dejando una estructura larga, negra y puntiaguda, de forma cónica y/o curvada (columela). Las glumas y las glumelas se conservan intactas para proteger el soro (Figura 5 A, B). Cuando se extrajeron las espiguillas en formación, se observó en los cinco especímenes analizados la presencia de las hifas del hongo en la base de los primordios florales. En un estadio más avanzado se observó en los cortes histológicos de las espiguillas basales que las hifas del hongo se encontraban ubicadas en los tejidos de conducción y en el parénquima medular del pedicelo floral (Figura 5 C, D). Esto pudo observarse con mayor detalle en microfotografías realizadas con MET (Figura 6 C, D).

Inoculación al vacío con teliosporas

En este ensayo se registró similitud con el método de la jeringa hipodérmica en cuanto al desarrollo del micelio vegetativo y reproductivo del *S. cruentum* como en el caso anterior. También se examinaron 10 brotes de la base en las plantas inoculadas de 3-4 semanas de edad. En los brotes inactivos se vio solamente trozos de hifas en el tejido meristemático, mientras que en algunos ápices de brotes desarrollados fueron completamente

colonizados en estadios relativamente tempranos del desarrollo. En otros casos se observó plantas con síntomas del tipo metaplásico en las hojas, pero no tan marcados como en el caso de la infección con aguja hipodérmica. No se determinó presencia de hifas del hongo en los tallos.

Inoculación al vacío con esporidias

En este ensayo se examinaron 80 rizomas inoculados con esporidias del hongo y se observó sobre los mismos, la formación de un micelio de color blanco que rápidamente colonizó la superficie y además no permitió el desarrollo de las plántulas. Como consecuencia del ataque del patógeno se registraron las siguientes alteraciones: inhibición de la brotación de las yemas, deshidratación parcial o total y necrosis hasta producir la muerte del rizoma a diferencia del testigo donde las plantas se desarrollaron normalmente. Para verificar si el problema era producido por un defecto de la desinfección, contaminantes u otras causas, se sembraron rizomas inoculados al vacío con esporidias (**T3**) en cajas de Petri sobre papel humedecido con agua destilada estéril y para confirmar la presencia de *S. cruentum* por el re-aislamiento del hongo (Figura 7 A, B).

También en este caso se visualizó que el micelio se desarrollaba de manera intercelular y también se hallaron hifas del patógeno en la base del meristema apical y la región de los nudos. No se observó en los tejidos la fusión entre esporidias, pero sí la formación de hifas intracelulares. En otras plantas se evidenciaron síntomas de clorosis en las hojas, que fue confirmada por medio de cortes histológicos por la presencia de la hifa del hongo. También en este caso se observó la presencia de hijuelos aéreos en los nudos, yemas

múltiples y panojas estériles inducidas por el patógeno. A diferencia del testigo que produjo un desarrollo normal de las plantas.

Masa seca área

Respecto a la MSA, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con inoculación al vacío con teliosporas (**T2**) 0,16 g.pl⁻¹ y con inoculación con esporidias (**T3**) 0,17 g.pl⁻¹, pero ambos fueron altamente significativos LSD ($p < 0,05$) comparados con el testigo 0,52 g.pl⁻¹, este comportamiento se puede visualizar en la Figura 8.

Las plantas presentaron en ambos casos un acortamiento de los entrenudos y disminución en la altura en comparación al testigo (Figura 10 A, B). También se evidenció una floración anticipada en las plantas que presentaron carbón a diferencia de los testigos.

Masa seca de rizomas

Respecto a la MSR, se obtuvo un comportamiento similar a la MSA. Los tratamientos T2 y T3 afectaron significativamente LSD ($p < 0,05$) la producción de rizomas obteniéndose una merma promedio de 19,60 g en **T2** y 22,10 g en **T3**, respecto a la producción de rizomas alcanzada por el testigo que fue de 39,2 g.pl⁻¹ (Figura 9). Este comportamiento se puede visualizar en la (Figura. 10 A-C), donde se observa la menor producción de rizomas debido a la infección con *S. cruentum* respecto al testigo.

DISCUSIÓN

Varios aspectos asociados con la infección de los rizomas y las plántulas de sorgo de alepo se detectaron durante nuestros ensayos. Las inoculaciones con el método hipodérmico resultaron más agresivas porque se observó una mayor cantidad de plantas con hojas con manchas cloróticas o la producción de pigmentos antociánicos Hanna (1929). Se observó la formación de antocianinas en hojas infectadas que fueron producidos por el hospedante como resultado de la acumulación de este pigmento en las células de la epidermis. De acuerdo con los resultados, el micelio fue observado en el tejido parénquimático y en el área nodal. Esta distribución dispersa del micelio probablemente se debió al método de inoculación utilizado, ya que las esporidias fueron forzadas a penetrar el tejido vegetal. El micelio, por lo general, no invade el meristema apical o tejido vascular de los brotes. Trabajos realizados por otros investigadores, indican la presencia de manchas cloróticas conteniendo hifas desarrolladas y ramificadas sobre las hojas emergidas de plántulas de maíz y sorgo inoculadas con *S. reilianum*. Además encontraron correlación entre los ensayos de campo e invernáculo. Dichos trabajos indicaron que este método de inoculación auxilia a la evaluación de diferentes genotipos resistentes o susceptibles al carbón de sorgo granífero. También se determinó que el método fue eficiente para reemplazar los ensayos a campo en los screening de mejoramiento (Wilson & Frederiksen 1970, Matyac 1985, Matyac & Kommedahal 1985; Craig & Frederiksen 1992; Snetselaar & Mims 1994).

De acuerdo a nuestras observaciones realizadas en los cortes transversales de hojas, las hifas del hongo degradaron los cloroplastos y los

haces vasculares fueron invadidos por las hifas. Posteriormente, se colapsaron las células provocando una necrosis generalizada. En varios casos estas hojas se marchitaron, pero la planta siguió su desarrollo hasta completar su ciclo, y la planta presentó el signo característico de la enfermedad cuando la panoja emergió carbonosa. Snetselaar & Mims (1994) y Martinez *et al.* (1999), observaron después de la inoculación de *S. reilianum*, que las plantas jóvenes fueron ligeramente cloróticas y que contenían esparcidas hifas del hongo. Estas últimas, se desarrollaron en las células epidérmicas, paránquimáticas y vasculares, pero no en los espacios intercelulares. Las hifas ramificadas fueron frecuentemente observadas como una infección en progreso.

Según nuestros resultados, las cepas de *S. cruentum* aisladas, fueron agresivas porque se observó la inducción de yemas múltiples que a su vez originaron vástagos vegetativos y reproductivos encerrados entre hoja. Alteraciones morfológicas similares fueron reportadas en otro carbón, *U. scitaminea* Sydow (carbón de la caña de azúcar) en los que se observó modificaciones morfológicas en tallos, hojas e inflorescencias tales como la formación de látigos convolutos que emergían de yemas laterales de los tallos y producía la deformación de los mismos (Sharma 1956; Byther & Steiner 1974). En otros trabajos sobre este carbón describen la formación de látigos simples o múltiples en inflorescencia y la formación de látigos múltiples que emergían de un mismo punto del ápice del tallo. Además se observó disminución en el crecimiento de las plantas y un acortamiento de los entrenudos (Nasr 1976, Astiz Gassó 1988). Una hipótesis que explicaría este tipo de alteraciones sería la producción excesiva de hormonas que estimulan la elongación de los tallos, el acortamiento de los entrenudos, la formación de

filodios y la inducción de cambios de los primordios vegetativos a reproductivos anticipando la floración. Este estadio de la planta es fundamental para que el hongo pueda infectar las inflorescencias y producir rápidamente la fragmentación del micelio y como consecuencia la esporogénesis del carbón. En experiencias realizadas por Matheussen *et al* (1990), sobre la implicancia de las giberelinas en *S. reilianum*, observaron que el hongo producía esta hormona en los primeros días de la infección, y además cuando la cultivaron *in vitro*, las cepas eran productoras de giberelinas. En el caso de *S. cruentum* sería necesario realizar otros estudios complementarios para confirmar si produce esta hormona u otras que induzcan esta anomalía.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en los cortes longitudinales de ápices vegetativos, se observó en algunos casos la presencia de hifas entrecortadas, pero no se visualizó la fusión de esporidias. Resultados similares fueron registrados en *S. reilianum* en inoculaciones artificiales en *Sorghum bicolor* (Wilson & Frederiksen 1970, Osorio & Frederiksen 1998). Además, visualizamos hifas intracelulares y ramificadas por debajo del ápice vegetativo como en estado de latencia hasta que se produjo la diferenciación de los primordios florales y se inició la movilización del micelio a las espiguillas de las inflorescencias. Estas fueron infectadas a nivel del suelo antes de la elongación de los tallos. Respecto a las técnicas histopatológicas empleadas en este trabajo, es importante destacar que las mismas fueron previamente empleadas con éxito en estudios de carbones que afectan otras especies vegetales. Tales como los trabajos de Millhollon (2000) que en sus experiencias, utilizó el método de cortes histológicos de los segmentos nodales de plántulas de *S. halepense* para confirmar la efectividad de las inoculaciones

a campo con suspensiones de teliosporas y esporidias de *S. cruentum*. Así mismo, en las investigaciones realizadas por Sinha *et al.* (1982) se empleó la técnica histológica de montaje con tinción simple de azul de tripan en lactofenol, para detectar la presencia del micelio de *U. scitaminea* a partir de nodos, que fueron confirmados en la parte basal del meristema apical.

De acuerdo a nuestros resultados, se determinó que la infección se produce en el primordio floral y no cuando la panoja está completamente diferenciada y sin emerger de la hoja bandera. En relación a la infección de las espiguillas de la panoja, también observamos que la misma debe estar completamente formada, porque existe una dependencia por los compuestos nutricionales. Tales elementos fueron aportados por el gineceo, los estambres y el estigma floral para inducir a la fragmentación de las hifas seguida de la esporulación y maduración de las teliosporas. No hemos encontrado otros reportes sobre en *S. cruentum*, por lo tanto consideramos que es importante realizar nuevos estudios para dilucidar este proceso.

De acuerdo a los resultados, es importante considerar el efecto que el patógeno ha causado sobre la materia seca de los rizomas, dado que aparece disminuyendo la biomasa subterránea en un momento en que la maleza registra un incremento de la producción de rizomas al finalizar el ciclo del cultivo. Por otra parte, estos resultados resultan ser interesantes dada la preponderancia que posee la reproducción vegetativa respecto de la reproducción por semilla de la maleza. Así, Williams & Ingber (1977) demostraron que ante la ausencia de competencia y en condiciones no limitantes de recursos hídricos y nutricionales, *S. halepense* destinó un 27% de la materia seca hacia los rizomas y sólo un 4% hacia la producción de semillas.

Estos autores establecen que ante la presencia de competencia intraespecífica, la maleza retarda la formación de rizomas. Por otra parte, Smith & Holt (1997) establecieron que el empleo de medidas adicionales de control de malezas y el control biológico no son antagonistas, pero existen efectos sinérgicos (donde los efectos combinados son más que aditivos) que dependen de la tasa reproductiva de la maleza y la densidad a la cual crece. También se observó que la MSA se redujo porque las plantas enfermas tenían menor altura comparadas con los testigos. Los reportes realizados por Luttrell *et al.* (1964) y Millhollon (2000) sobre esta especie mencionan las diferencias de crecimiento de las plantas tratadas con el carbón.

De acuerdo a los resultados obtenidos en todos los casos se registró una alta infección con los métodos de inoculación utilizados y bajo las condiciones ambientales en las cuales se ejecutaron los experimentos. Además, se visualizaron cambios en la morfología estructural del hospedante similares a los registrados en investigaciones realizadas por otros autores en *S. reilianum* (Craig & Frederiksen 1992, Martinez *et al.* 1999). Del mismo modo, se estableció que *S. cruentum* fue quien produjo los cambios morfológicos estructurales en el hospedante, y que los mismos, no fueron inducidos por los métodos aplicados (Astiz Gassó *et al.* 2001).

El sorgo de alepo, como en todas las Poaceae, en el estado vegetativo tienen el tallo verdadero reducido a un disco basal con los nudos y entrenudos muy comprimidos que se elongan en el estado reproductivo, de acuerdo a lo descrito por Maddaloni & Ferrari (2001). Por esta forma de crecimiento de la planta, podemos decir que de acuerdo a las observaciones realizadas el

patógeno migra hacia la inflorescencia localizada en la base de la yema apical produciendo la enfermedad.

El método más efectivo para el control de esta maleza es causando la disminución en la producción de rizomas, ya que esta cumple con un rol importante en la dinámica reproductiva de la maleza (Williams & Ingber 1977). Tal como lo demuestran nuestros resultados de la reducción marcada de rizomas (MRS) producidas por el hongo.

En investigaciones realizadas para el control integrado de malezas, se estudió la posibilidad del uso como biocontroladores de hongos del Orden Ustilaginales que fueron eficaces en el control de las mismas. Tales como el uso de *U. sp.* para el control de *Paspalum virgatum* (Arévalo *et al.* 2000). Otro ejemplo es *U. bullata* que fue utilizado como biocontrolador de la maleza *Bromus tectorum* donde se redujo la producción de semillas por ser reemplazadas por la masa carbonosa del hongo y se establecieron las condiciones ambientales óptimas tales como la temperatura y el momento de mayor eficacia del hongo para producir infecciones en las plantas (Meyer *et al.* 2001, Astiz Gassó *et al.* 2002, Boguena 2003, Boguena *et al.* 2007). Por lo tanto, de este modo sólo dentro de un marco integrado de alternativas se podría establecer fehacientemente la factibilidad del control biológico empleando *S. cruentum*.

Por otra parte, será necesario establecer las posibles interacciones entre la implementación del control biológico con otras alternativas de manejo en el sorgo de alepo, tales como el uso de herbicidas en dosis reducidas y el uso de la habilidad competitiva de los cultivos que compitan con la maleza.

Es importante destacar que deben ser vencidas las barreras estructurales, tales como las yemas que se encuentran protegidas por catáfilas que dificultan la penetración del hongo, la baja viabilidad de las teliosporas en el suelo porque no persiste en el suelo más de 12 meses, y las condiciones ambientales, para producir la enfermedad.

De acuerdo a los resultados obtenidos, sería necesario considerar la realización de nuevas investigaciones para dilucidar la inoculación del patógeno en la maleza bajo condiciones de campo, dado el efecto de la alta eficiencia de *S. cruentum* para producir infecciones en el sorgo de alepo.

CICLO BIOLÓGICO DE *Sporisorium cruentum* SOBRE *Sorghum halepense*

En la Figura 11 se describe el ciclo biológico: En plantas con panojas infectadas el patógeno se disemina por dos vías: las esporas son llevadas por el viento, y las semillas infestadas llevan teliosporas adheridas (Figura 11 1). Las teliosporas en reposo son $n+n$ (Figura 11 2) y en presencia del hospedante se induce a la maduración que luego al fusionarse se transforman en $2n$ (Figura 11 3). A continuación se forman las basidiosporas haploides (n) y la fusión de células compatibles para generar la hifa infectiva ($n+n$). La infección del patógeno se produce cuando la hifa infectiva forma el apresorio y penetra al tejido por ablandamiento de paredes celulares (Figura 11 4) tanto en plántulas originadas desde semillas como por brotación de las yemas de los rizomas. El hongo coloniza el meristema vegetativo. Posteriormente, la infección se produce en el primordio floral en cual el hongo induce la fragmentación de las

hifas seguida de la esporulación y maduración de las teliosporas que son liberadas (Figura 11 1).

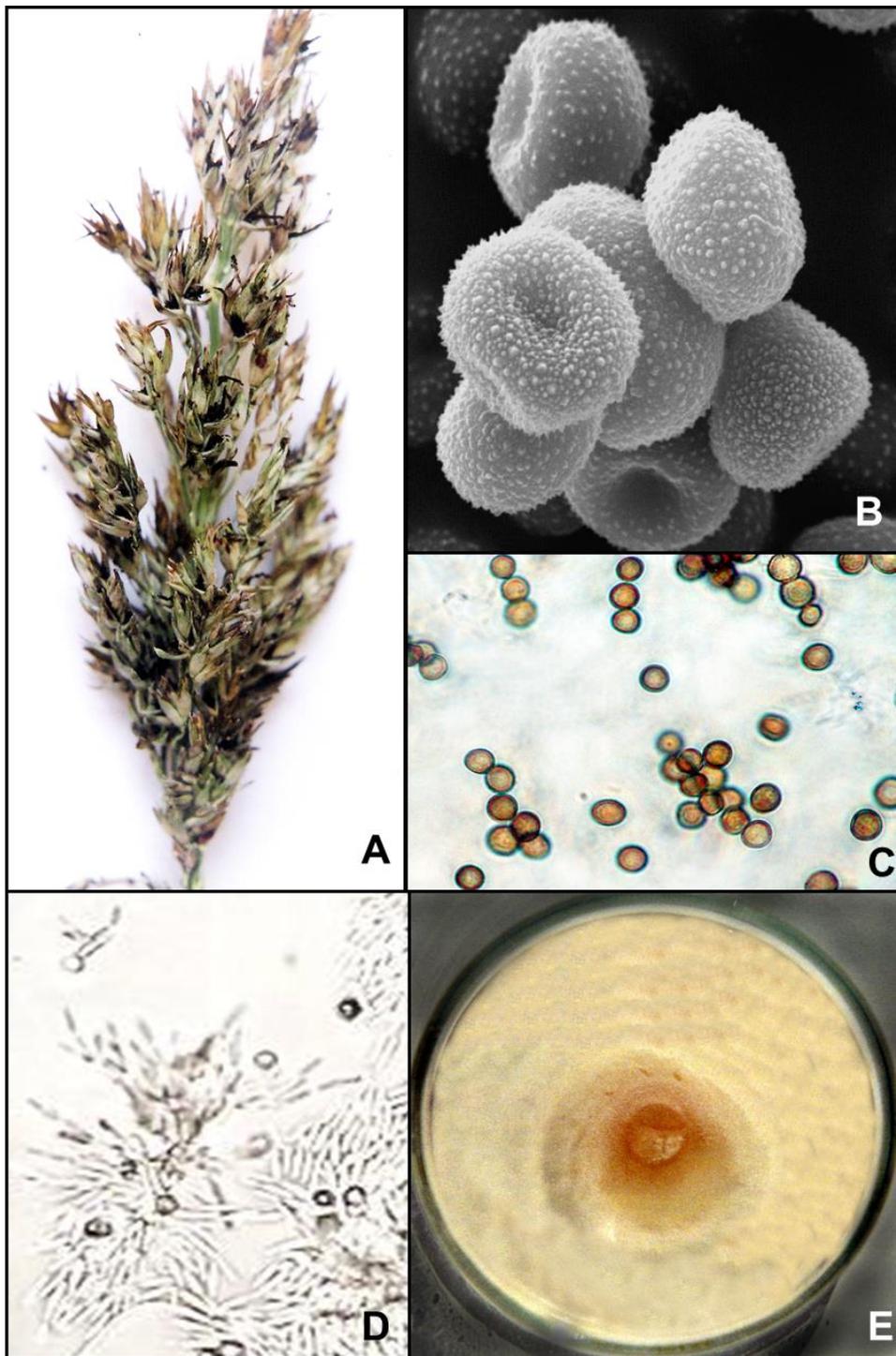


Figura 1. Observación macroscópica y microscópica de *S. cruentum*: **A** Panoja con carbón. **B** Microfotografía de Teliosporas con episporio equinulado observadas en microscopio electrónico de barrido (MEB). **C** Microfotografía de Teliosporas observadas en microscopio óptico (MO). **D** Germinación in vitro de teliosporas tipo esporidial en PDA. **E** Colonia desarrollada en medio de PDA.

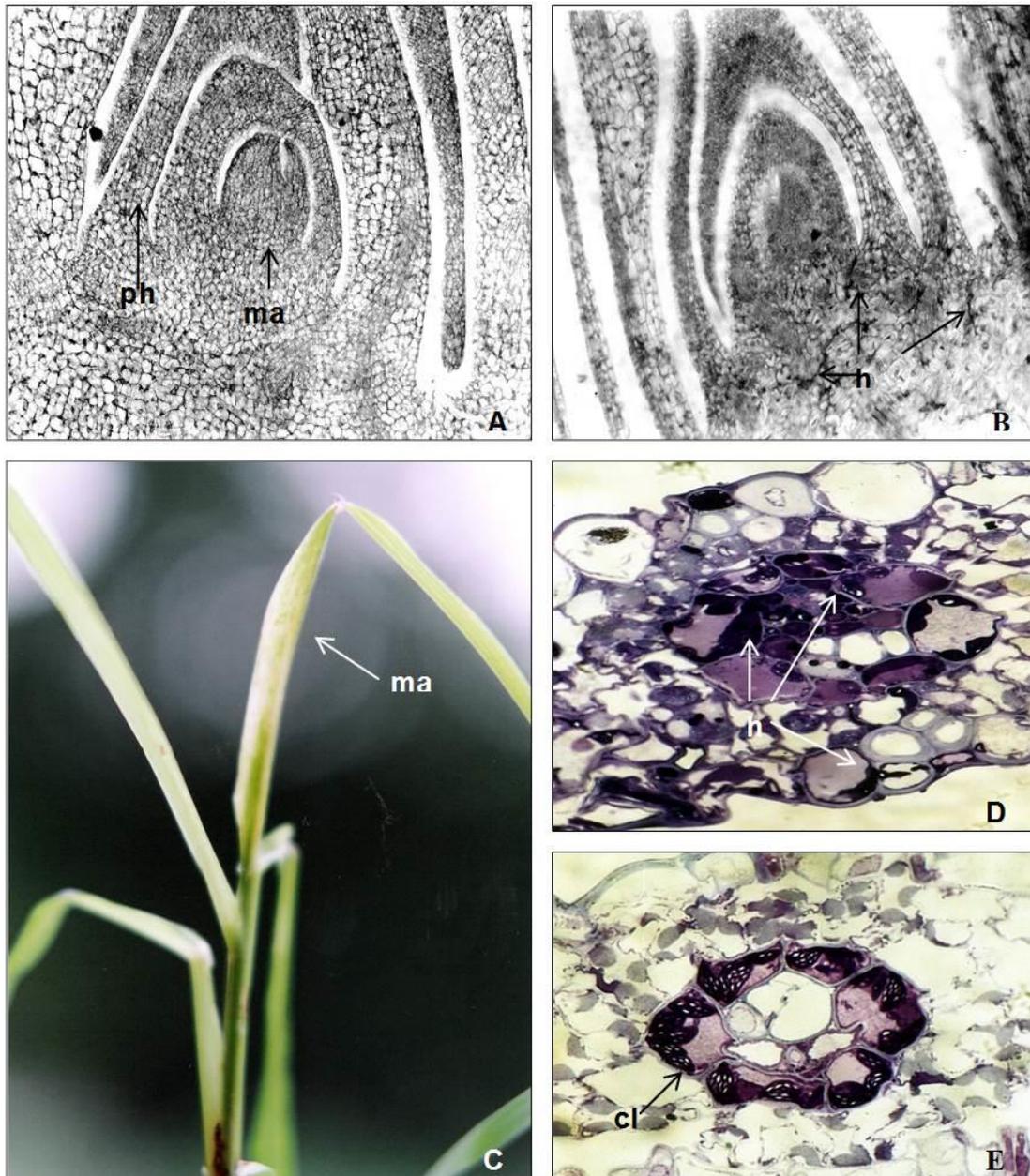


Figura 2. Cortes longitudinales de meristemas de rizomas de sorgo de alepo: **A.** Meristema apical (ma) y primordio de hoja (ph) sin infección procedente del control. **B.** Meristema apical con hifas del hongo procedente de rizomas inoculados con *S. cruentum*; **C.** Hojas de plantas inoculadas con manchas cloróticas (hm). **D-E.** Cortes transversales de hoja: **D.** Hoja de plantas inoculadas con ausencia de cloroplastos y/o degradados por las hifas (h) del hongo que se ubican en los haces vasculares. **E.** Hoja de planta sin inocular con cloroplastos (cl) normales en la vaina parénquimática de los haces vasculares.

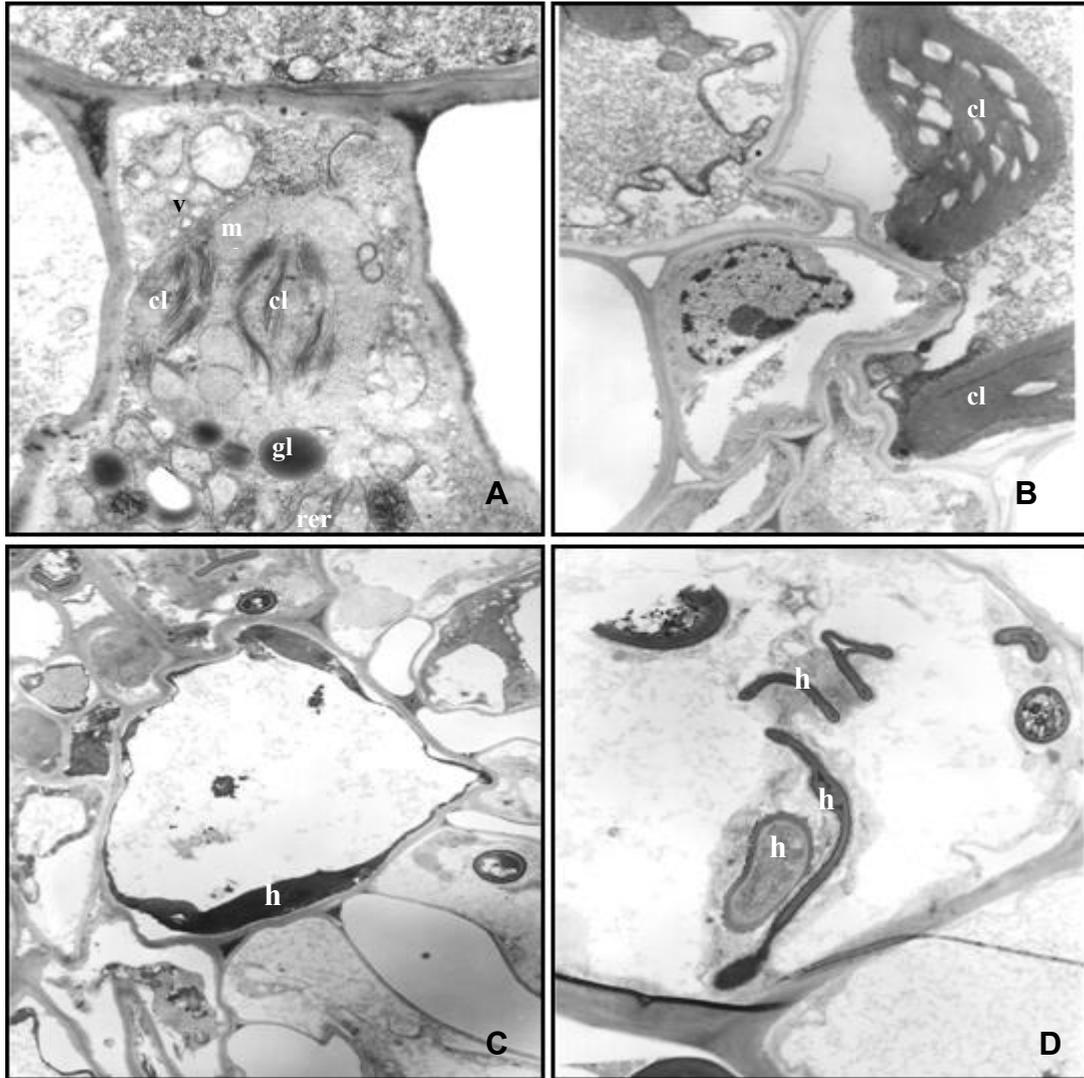


Figura 3. A-D. Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) en *Sorghum halepense*. **A-B.** Ultraestructura de las células del mesófilo de la hoja sana del hospedante. **A.** Célula del clorénquima sano conteniendo cloroplastos (cl), glóbulos lipídicos, mitocondrias (m), retículo endoplásmico rugoso (rer) y vesículas (v) en el citoplasma. **B.** Célula de la vaina parenquimática de los haces vasculares con cloroplastos normales. **C-D.** Células de la vaina parenquimática infectadas con la hifa (h) de *Sporisorium cruentum*. Escalas: **A** = 0,5 μ ; **B** = 1 μ ; **C-D** = 2 μ .

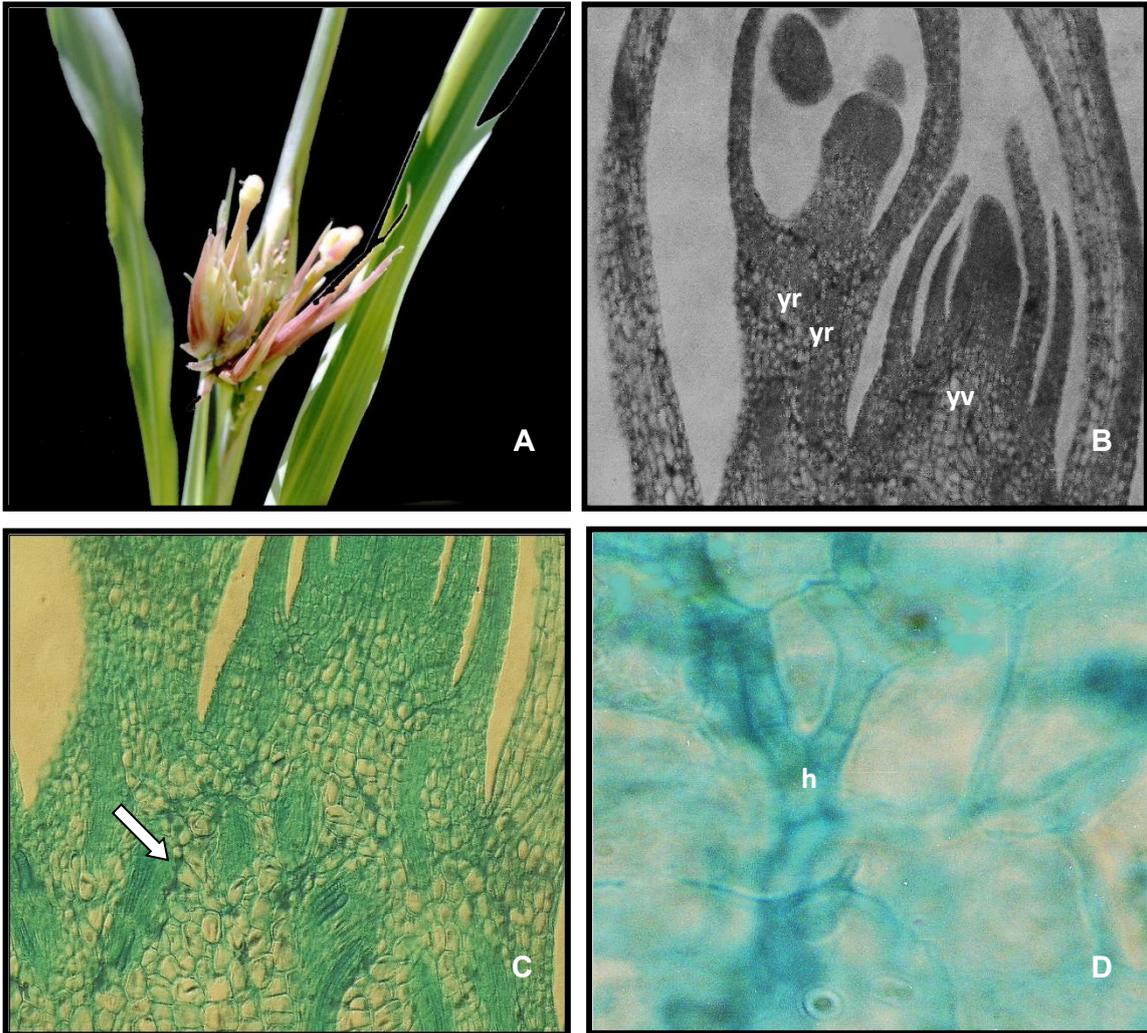


Figura 4. Alteraciones morfológicas producidas por *S. cruentum*. **A.** Yemas múltiples que originan pequeñas panojas infectadas con el hongo. **B–C.** Corte longitudinal de una yema múltiple. Yema vegetativa (yv) y reproductiva (yr). **C.** Base de la yema con presencia de la hifa del hongo (flecha). **D.** Detalle de las hifas ramificadas intracelulares.

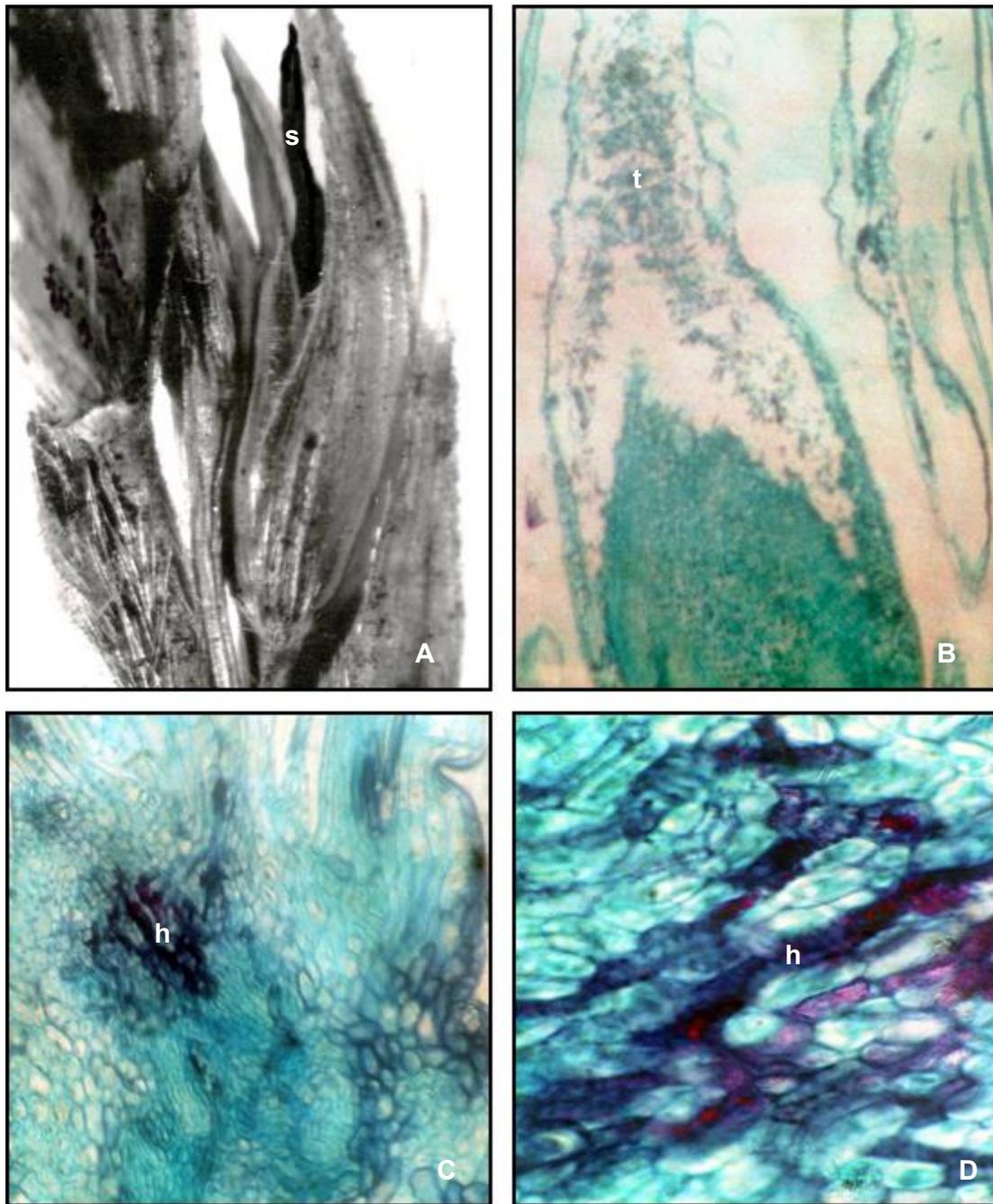


Figura 5. Cortes histológicos de espiguilla con coloración doble de safranina-fast-green **A.** Espiguillas infectadas con carbón, con soro formado por una columela curvada. **B.** Corte longitudinal de la espiguilla con el gineceo curvado y con presencia de teliosporas. **C-D.** Detalle de la base de la espiguilla infectada por el hongo.

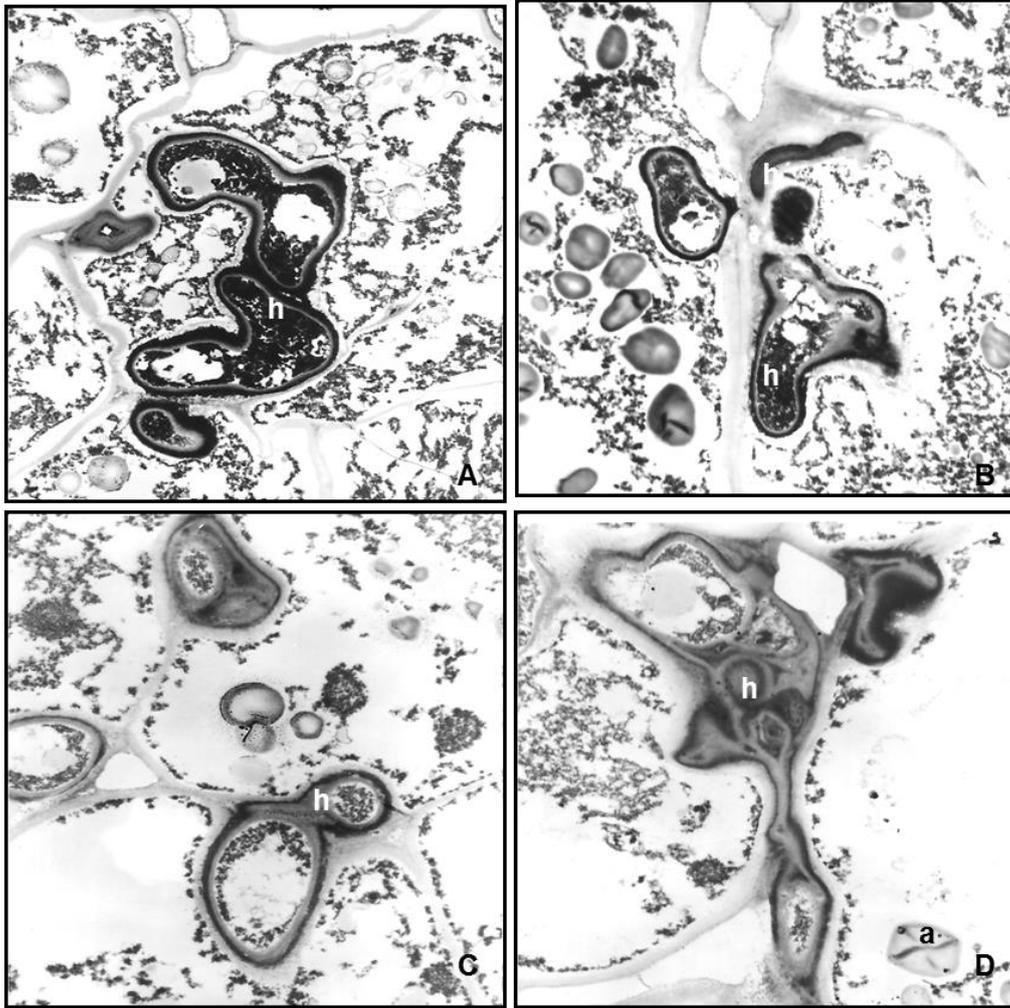


Figura 6. Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) en *S. halepense*. **A-B.** Ultraestructura del meristema vegetativo. **A.** Célula infectada por la hifa del hongo (h). **B.** Citoplasma de la célula infectada conteniendo sustancias de reserva como gránulos de almidón simple (a). **C-D.** Células de la base de la espiguilla infectadas con *Sporisorium cruentum*. Escalas: A, B = 2 μ ; C-D = 1 μ .

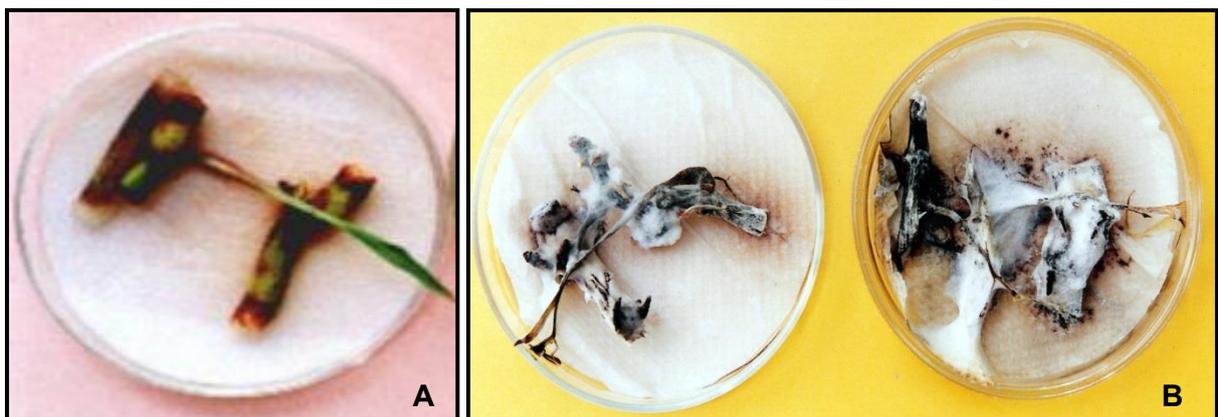


Figura 7. Brotes de rizomas del sorgo de alepo en placas de petri. **A.** Testigo sano. **B.** Rizomas y brotes necrosados por el hongo y desarrollo de micelios blanquecinos.

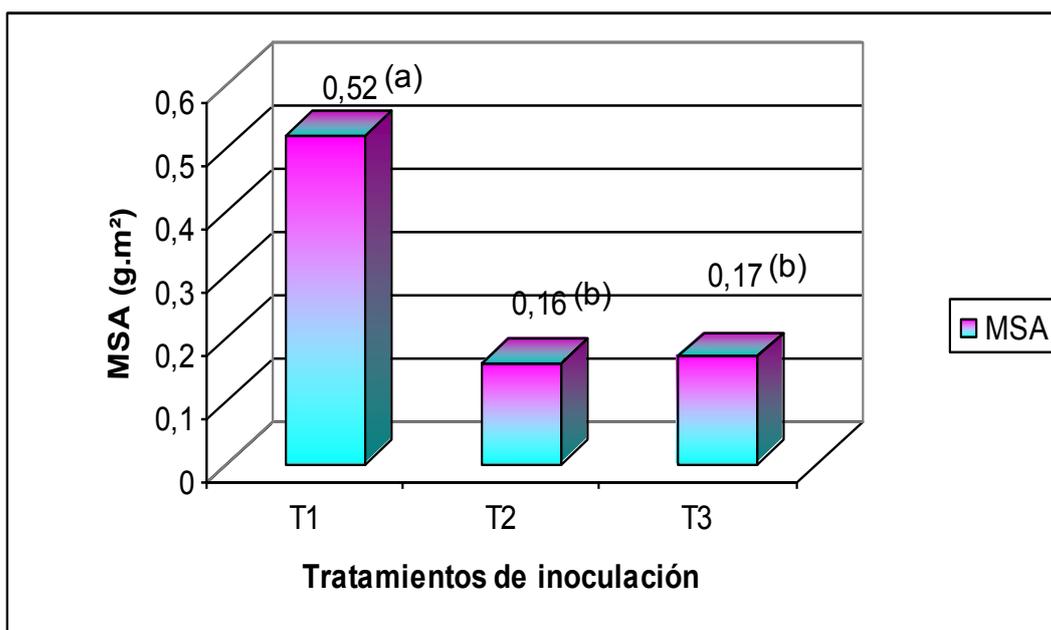


Figura 8. Materia seca aérea (MSA) de plantas de sorgo de alepo al final del ciclo del cultivo: T1, tratamiento control; T2, inmersión de rizomas en suspensión en cultivo líquido + teliosporas; T3, inmersión de rizomas en medio líquido + esporidias. LSD (<0.05)

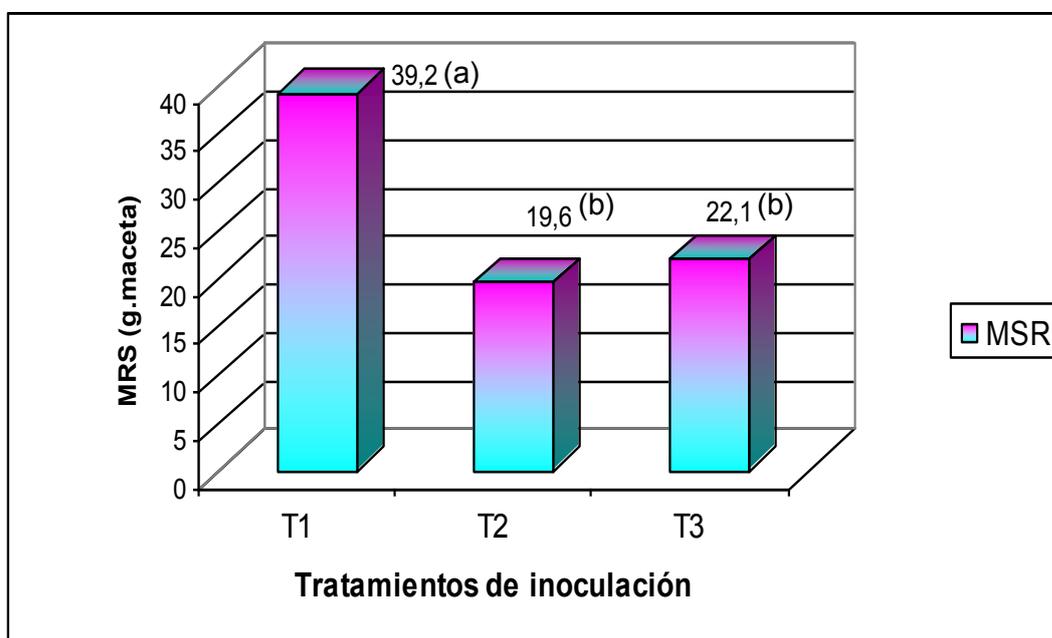


Figura 9. Materia seca de raíz (MSR) de plantas de sorgo de alepo al final del ciclo del cultivo: T1, tratamiento control; T2, inmersión de rizomas en suspensión en cultivo líquido + teliosporas; T3, inmersión de rizomas en medio líquido + esporidias. LSD (<0.05)

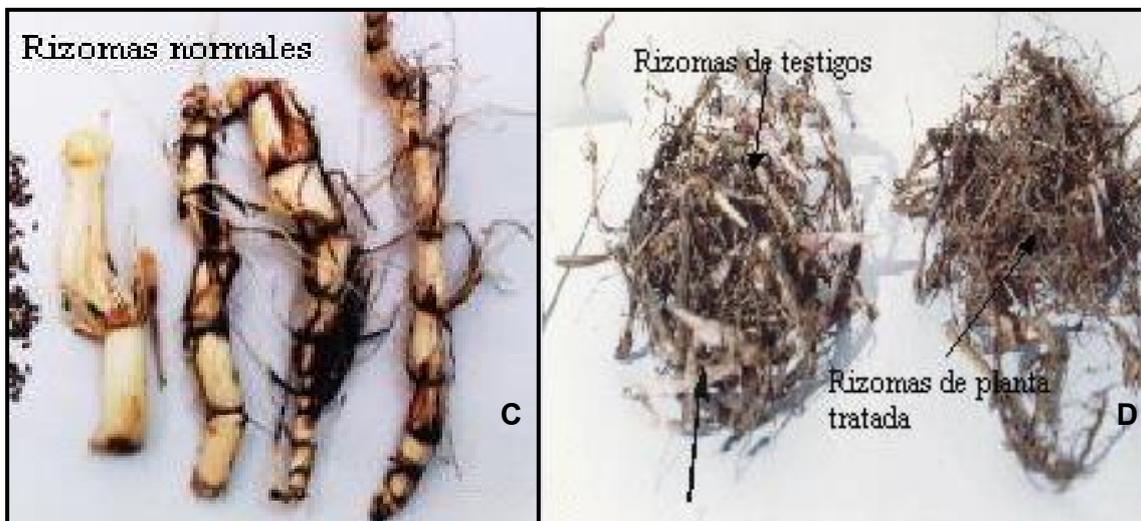


Figura 10. Experimento en invernadero con *S. cruentum* sobre rizomas de sorgo de alepo. **A-B.** Plantas sanas y enfermas con *S. cruentum* procedentes de los ensayos en invernadero. **C-D.** Rizomas procedentes de plantas sanas y enfermas. **C.** Rizomas sanos procedentes de campos naturales. **D.** Rizomas de plantas testigos y plantas tratadas con el patógeno infectadas en condiciones ambientales de invernadero.

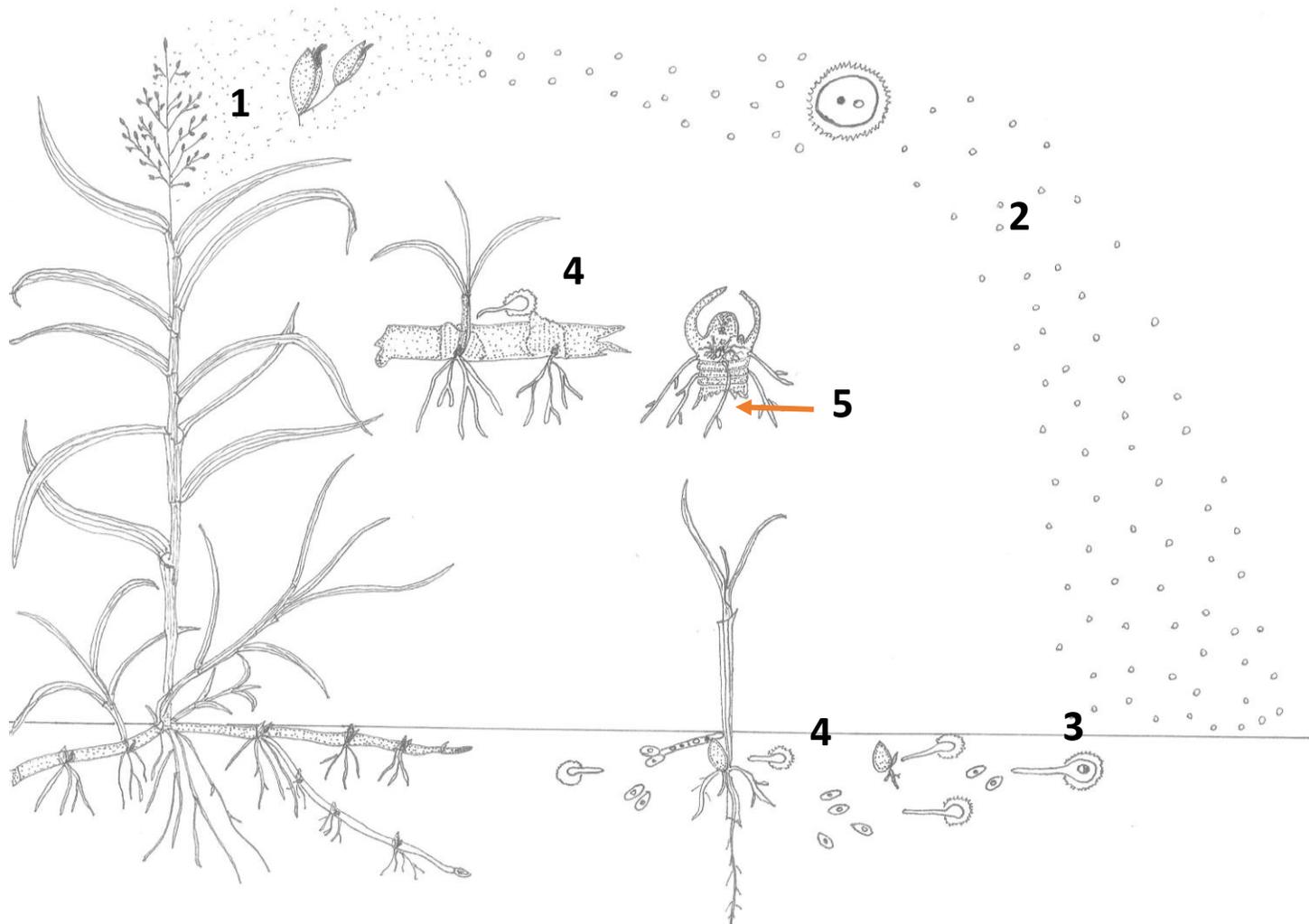


Figura 11. Ciclo de vida de *Sporisorium cruentum*: **1.** En plantas con panojas infectadas el patógeno se disemina por dos vías: las esporas son llevadas por el viento, y las semillas infestadas llevan teliosporas adheridas. **2.** Las teliosporas en reposo son $n+n$. **3.** En presencia del hospedante se induce a la maduración que luego al fusionarse se transforman en $2n$. A continuación se forman las basidiosporas haploides (n) y la fusión de células compatibles para generar la hifa infectiva ($n+n$). **4.** La infección del patógeno se produce cuando la hifa infectiva forma el apresorio y penetra al tejido por ablandamiento de paredes celulares tanto en plántulas originadas desde semillas como por brotación de las yemas de los rizomas. **5.** El hongo coloniza el meristema vegetativo. Posteriormente, la infección se produce en el primordio floral en cual el hongo induce la fragmentación de las hifas seguida de la esporulación y maduración de las teliosporas que son liberadas.

CONCLUSIONES

1. Se establecieron las condiciones ambientales óptimas y el momento de mayor eficacia del hongo para producir infecciones en las plantas de sorgo de alepo. Por lo tanto, de este modo, sólo dentro de un marco integrado de alternativas, se podría establecer fehacientemente la factibilidad del control biológico empleando *S. cruentum*.
2. Sería importante establecer las posibles interacciones entre la implementación del control biológico con otras alternativas de manejo en el sorgo de alepo, tales como el uso de herbicidas en dosis reducidas y el uso de la habilidad competitiva de los cultivos que compitan con la maleza.

BIBLIOGRAFÍA

Acciaresi H.A., Mónaco C. 1999. First report of *Bipolaris sorghicola* on johnsongrass in Argentina. Plant Disease 83:965.

Arévalo E., Cabezas O., Zúñiga L., Chávez M. 2000. Evaluación preliminar sobre el potencial de control del hongo *Ustilago sp.* sobre la Maleza *Paspalum virgatum*. Abstract XV Congreso Peruano de Fitopatología. Revista de Fitopatología Latinoamericana 35:11.

Astiz Gassó M.M. 1988. Efectos del carbón (*Ustilago scitaminea* Syd) sobre *Saccharum officinarum*. Fitopatología 23:37-39.

Astiz Gassó M.M., Monaco C., Acciaresi H. 2001. Efectividad de tres métodos de inoculaciones de *Sporisorium cruentum* en sorgo de alepo. Brazilian Phytopathology 26:466.

Astiz Gassó M.M., Mónaco C., Acciaresi H. 2002. Evaluación de *Sporisorium cruentum* como agente de control biológico en *Sorghum halepense*” Revista Mexicana de Fitopatología 20:141-145.

Boguena T. 2003. Epidemiology of *Ustilago bullata* Berk on *Bromus tectorum* L. and implications for biological control. Ph dissertation. Brigham Young University Provo UT. 102 pp.

Boguena T., Meyer S.E., Nelson D.L. 2007. Low temperature during infection limits *Ustilago bullata* (Ustilaginaceae, Ustilaginales) disease incidence on *Bromus tectorum* (Poaceae, Cyperales). Biocontrol Science and Technology, 17:33-52.

- Bracegirdle B., Miles P. 1975.** Atlas de Estructuras Vegetales. Editorial Paraninfo 125 pp.
- Byther R.S., Steiner G.W. 1974.** Unusual smut symptoms on sugarcane in Hawaii. *Plant Disease Report* 58:401-405.
- Craig J., Frederiksen R.A. 1992.** Comparison of Sorghum seedling reactions to *Sporisorium reilianum* in relation to *Sorghum* head smut resistance classes. *Plant Disease* 7:314-318.
- D'Ambrogio Argüeso A. 1986.** Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Editorial Hemisferio Sur 83 pp.
- De Wet J.M.J., Huckaby J.P. 1967.** The origin of *Sorghum bicolor*. II. Distribution and domestication. *Evolution* 21:787-802.
- Duran R. 1987.** Ustilaginales of México: Taxonomy, Symptomatology, Spore Germination, and Basidial Cytology. Copyright by Rubén Durán 331 pp.
- Edmunds L.K. 1963.** Use of sporidial hypodermic infection to test sorghum for head smut resistance. *Plant Disease Rep.*, 47:903-913.
- Fernández J.A., Durán R., Schafer J.F. 1978.** Histological aspects of dwarf bunt resistance in wheat. *Phytopathology* 68:1417-1421.
- Fischer G.W., Holton T.C. 1953.** Manual of the North American smut fungi. The Ronald Company, New 343 pp.
- Ghareeb H., Becker T.I., Feussner I., Schirawski J. 2011.** *Sporisorium reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize. *Plant Physiology* 156:2037-2052.

- Ghersa C.M., Satorre E.H. 1981.** La dinámica de la población de rizomas de sorgo de alepo en relación con los sistemas de control más frecuentes. Revista Facultad de Agronomía 2:133-138.
- Hanna W.F. 1929.** Studies in the physiologic and cytology of *Ustilago zea* and *Sporisorium reilianum*. Phytopathology 19:415-444.
- Hirschhorn E. 1986.** Las Ustilaginales de la flora Argentina. C.I.C. Ed. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires 530 pp.
- Holm L.G., Plucknett D.L, Pancho J.V., Herberger, J.P. 1977.** The world's worst weeds, distribution and biology. pp. 54-61. University of Hawaii. Honolulu, Hawaii, USA.
- Kosiada T. 2011.** *In Vitro* influence of selected fungicides on *Sphacelotheca reiliana* and *Ustilago maydis*. Journal of Plant Protection Research 51(4): 342-348.
- Luttrell E.S., Graigmiles J.P., Harris B.H. 1964.** Effect of loose kernel smut on vegetative growth of Johnson grass and *Sorghum*. Phytopathology 54:612.
- Maddaloni J., Ferrari L. 2001.** Forrajeras y pasturas del ecosistema templado húmedo de la Argentina. Editado por Universidad de Lomas de Zamora Argentina 520 pp.
- Martinez C., Roux C., Dargen R. 1999.** Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *Zea* in vegetative shoot apex of maize. Phytopathology 89:247-253.
- Martinez C., Roux, Ch., Jaunean D.R. 2002.** The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zea*: an overview using microscopy. Mycología 95:05-514.

- Matheussen A.M., Morgan P.W., Frederiksen R.A. 1990.** Implication of gibberellins in head smut (*Sporisorium reilianum*) of *Sorghum bicolor*. Plant Physiology 96: 537-544.
- Matyac C.A. 1985.** Histological development of *Sphacelotheca reiliana* on *Zea mays*. Phytopathology 75:924-929.
- Matyac C.A., Kommedahal T. 1985.** Occurrence of chlorotic spots on corn seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. Plant Disease 69:251-254.
- Méndez Fernández H., Ghera C.M., Satorre E.H. 1983.** El comportamiento de las semillas de *Sorghum halepense* (L.)Pers. En relación con la población de rizomas. Revista de la Facultad de Agronomía 3:227-231.
- Meyer S.E., Nelson D.L., Clement S.E. 2001.** Evidence for resistance in the *Bromus tectorum-Ustilago bullata* pathosystem: implications for control. Can. J. Plant Pathology 23:19-27.
- Millhollon R. 2000.** Loose kernel smut for biocontrol of *Sorghum halepense* in *Saccharum* sp. hybrids. Weed Science 48:645-652.
- Mitidieri A. 1984.** Sorgo de Alepo: importancia, biología y aspectos básicos para su control. Biokemia 4:25-36.
- Moharam M.H.A., Leclerque A., Koch E. 2012.** Cultural Characteristics of *Sporisorium sorghi* and detection of the pathogen in plant tissue by microscopy and polymerase chain reaction. Phytoparasitica 40: 475-483.

Nasr I.A. 1976. Association of unusual symptoms with smut of sugarcane in the Sudan. Sugarcane Pathology N° 15.

O'Brien T.P., Mc Cully M.E. 1981. The study of plant structure (principles and selected methods). Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd., Australia 357 pp.

Osorio J.A., Frederiksen R.A. 1998. Development of an infection assay for *Sporisorium reilianum*, the head smut pathogen on sorghum. Plant Disease 82:1232-1236.

Piper C.V. 1928. Cultivated grasses of secondary importance. U.S. Department of Agriculture Farmers Bulletin 1433.

Reynolds E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. Journals Cell Biology 55:541-552.

SAS. 1989. SAS User's guide-release 6.03. SAS Institute Inc. (Cary, USA).

Satorre E.H., Ghera C.M., Soriano A. 1981. Dinámica de la población de rizomas de sorgo de alepo. Efecto del cultivo de avena y del corte. Revista de la Facultad de Agronomía 2:115-123.

Sharma R.L. 1956. Morphological modifications in sugarcane plant by systemic infection of smut (*Ustilago scitaminea* Syd.) Int. Soc. Sugar Technol. 9:1134-1168.

Sinha O.K., Singh K., Misra, S.R. 1982. Stain technique for detection of smut hyphae in nodal buds of sugarcane. Plant Disease 66:932-933.

Smith M.C., Holt J. 1997. Analytical models of weed biocontrol with sterilizing fungi: the consequences of differences in weed and pathogen life histories. Plant Pathology 46:306-319.

- Snetselaar K.I.M., Mims Ch.W. 1994.** Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycological Research* 98:347-355.
- Spurr A.R. 1969.** A low-viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. *Journal Ultrastruct Research* 26:31-43.
- Vánky K. 1985.** Carpathian Ustilaginales. Uppsala, Almqvist & Wiksell International Stockholm-New York 309 pp.
- Verdejo J., Della Penna A., Madia M. 1995.** Agentes fúngicos identificados en plantas de malezas. *Proceed. XII Congreso Latinoamericano de Malezas.* Uruguay. Resumen 113-115.
- Ward, K.J., Klepper B., Rickman R.W., Allmaras R.R. 1978.** Quantitative estimation of living wheat-root lengths in soil cores. *Agronomy Journal* 70:675-677.
- Wilson J.M., Frederiksen R.A. 1970.** Histopathology of resistance in the *Sorghum bicolor-Sphacelotheca reiliana* interaction. *Phytopathology* 60:828-932.
- Williams R.D., Igber B.F. 1977.** The effect of intraspecific competition on the growth and development of johnsongrass under greenhouse conditions. *Weed Science* 25:477-481.

CAPITULO II

BIOLOGÍA E HISTOPATOLOGÍA DEL CARBÓN *Ustilago filiformis* (=U. *longissima* (SCH) MEYEN) SOBRE *Glyceria multiflora* STEUD. (POACEAE).

RESUMEN

Ustilago filiformis (=U. *longissima* (Sch) Meyen) es el agente causal del carbón de la estría de la hoja de *Glyceria*, una gramínea hidrófila, perenne y rizomatosa que habita pastizales bajos, y bañados de la cuenca del salado de la Pcia de Buenos Aires. El objetivo de esta investigación fue establecer la biología del hongo, determinar el tipo de infección y describir y documentar por primera vez las alteraciones histológicas asociadas al ataque del hongo. Para la identificación y aislamiento del patógeno se partió de plantas infectadas naturalmente a las cuales se le aplicaron diferentes técnicas fitopatológicas e histológicas de laboratorio. Los análisis realizados demostraron la identidad del carbón como *U. filiformis*. Las pruebas de patogenicidad establecieron que el patógeno tiene una infección del tipo local y produce hipertrofia de los tejidos. Asimismo se comprobó que el órgano de la planta en cual se produce la esporogénesis es la hoja, y que la enfermedad inducida por este carbón produce espiguillas estériles en la panoja. Se concluye que esta enfermedad tiene un efecto directo sobre la producción de semillas y por lo tanto, la reproducción y propagación *G. multiflora* estaría limitada por esta vía,

por la ausencia de simientes en el campo. Otro efecto negativo es la disminución de la disponibilidad de forraje para el ganado por ataque directo de *U. filiformis* sobre las hojas, sumado a la posibilidad de toxicidad en los animales por su consumo. El ciclo biológico de *U. filiformis* sobre *Glyceria* spp. constituye el primer aporte para entender y dilucidar la epidemiología de la enfermedad en nuestro país y en el mundo.

Palabras claves: *Ustilago filiformis*, histopatología

INTRODUCCIÓN

Ustilago filiformis (= *Ustilago longissima* (Sch) Meyen) es el agente causal en diferentes especies del género *Glyceria* como ocurre en *G. fluitans*, *G. grandis*, *G. multiflora*, *G. nemoralis*, *G. obtusa*, *G. pilcata* y *G. striata*. (Mordue 1991). *U. filiformis* produce una sintomatología de clorosis y necrosis sobre las láminas, denominada como “carbón de la estría en la hoja”. El signo enfermedad se manifiesta como una masa carbonosa de teliosporas y es como se propaga el patógeno en el campo. La planta infectada produce nuevos macollos que pueden estar atrofiados y de color verde pálido a verde-amarillento. Estos macollos por lo general no llegan a florecer y en ellos se observa la esporulación del hongo que ocurre durante el desarrollo del cultivo que es de ciclo primavero-estival.

La distribución geográfica está generalizada para distintas zonas templadas del mundo como se detalla (Mordue 1991):

1.- Asia: Zona norte de la India (Nilgiri Hills) y Siberia.

2.- Europa: Suecia, Suiza, Reino Unido, Austria, Bulgaria, Checoslovaquia, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Hungría, Italia, Países Bajos, Noruega, Polonia, Rumania, España, Reino Unido, ex URSS (Estonia, Rep. de Georgia, Letonia, Rusia) y ex Yugoslavia.

3.- América del Norte: Canadá (Alberta, Columbia Británica, Ontario, Que, Sask) y EE.UU. (Connecticut, Colorado, Idaho, Illinois, Iowa, ME, Maine, Michigan, Minnesota, Mt, Nebraska, New Hampshire, Nueva York, Dakota del Norte, Oregón, Pensilvania, Utah, Vermont, estado de Washington).

4.- América del Sur: Argentina (La Plata, Jeppener).

La transmisión del patógeno se realiza a través de las teliosporas que son diseminadas por el viento y por el agua. En la actualidad no hay estudios sobre el proceso de infección del carbón en el hospedante (Hirschhorn 1986, Astiz Gassó *et al.* 2006).

Glyceria multiflora Steudel, es una especie nativa, acuática glabra, perenne, cespitosa ascendente, rizomatosa, con cañas largas, nudos comprimidos en seco, oscurecidos, lígula ancha, panoja laxa angosta, de 20-60 cm de longitud y fruto cariopse elíptico-alargado rojizo-oscuro (Burkart 1969). Es una especie sudamericana, común en Argentina y en Chile. En nuestro país habita las zonas de pastizales bajos de la Mesopotamia y la cuenca del Salado. Vegeta en invierno y florece en primavera. Habita lugares anegadizos, los bordes de las lagunas, zanjas, etc. Es considerada una forrajera valiosa, muy común en la provincia de Buenos Aires, donde es muy buscada y apreciada por el ganado (Vidal &

Piergentili 1973). La alta productividad y la buena palatabilidad de esta especie constituyen aspectos relevantes desde el punto de vista forrajero. Existen estudios para su posible uso como una alternativa forrajera en áreas marginales ganaderas de nuestro país (Rossi *et al.* 2006).

HIPOTESIS

- *Ustilago filiformis* produce distintos tipos de infección y alteraciones histopatológicas en los tejidos vegetativos y reproductivos de plantas de *Glyceria multiflora*

OBJETIVOS

- Determinar el proceso de infección del patógeno.
- Clarificar la biología reproductiva de *U. filiformis*.
- Analizar las alteraciones histopatológicas asociadas al ataque del hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las metodologías utilizadas en este ensayo se adecuaron para el tipo de ambiente donde crece y se desarrolla el hospedante, en base a la adaptación de otras técnicas utilizadas para carbones del orden Ustilaginales y hongos fitopatógenos (Fernández *et al.* 1978, Matyac 1985, Craig & Frederiksen 1992), Maurya *et al.* (2010), Kosiada (2011).

Aislamiento y cultivo in vitro del hongo

Las muestras de *Glyceria* sp. Libre de la enfermedad e infectadas con *U. filiformis* fueron recolectadas en el año 2009 en la localidad de Jeppener (35°16'39.5"S 58°11'53.7"O 35.277639, -58.19825.), perteneciente a la Cuenca del Salado, ubicada en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Posteriormente las plantas con síntomas fueron llevadas al laboratorio para realizar las observaciones morfobiométricas del hongo e identificar la especie del carbón. Además, se efectuaron aislamientos del hongo para estudiar el tipo de germinación de las teliosporas y el desarrollo de colonias.

Para la identificación taxonómica del hongo se realizaron preparaciones microscópicas de las esporas que fueron montadas en lactofenol y observadas con microscopio óptico (MO). Además, se acondicionaron los preparados de teliosporas del hongo para microscopía electrónica. Para ello se montaron en platina y se metalizaron con una capa de oro paladio para su observación bajo microscopio electrónico de barrido (MEB).

Para el aislamiento se procedió a desinfectar 0,5 g de esporas del hongo con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante tres minutos. Posteriormente fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril para retirar el exceso del desinfectante y centrifugadas a 200 rpm.

Una parte de las teliosporas así, tratadas fueron sembradas en dos medios de cultivo: i. agar agua al 2% (AA) para realizar observaciones sobre la germinación; ii. papa dextrosa agar al 2% (PDA) para analizar la morfología de las colonias del hongo y obtener cultivos axénicos.

Los cultivos obtenidos en ii fueron refrigerados a 5°C ±2°C para ser utilizados posteriormente en inoculaciones sobre el hospedante.

Pruebas de patogenicidad

Preparación inóculo

Para este experimento se partió de cultivos de basidiosporas axénicos obtenidos a partir de la metodología descrita anteriormente. Los cultivos del hongo fueron sembrados en Erlenmeyers con 200 cm³ de medio cultivo caldo de papa dextrosa al 2%. Posteriormente, fueron colocados en agitador rotativo (CAT-S20) a 200 rpp y llevados a estufa de cultivo (BINDER KBF LQC) a 25°C ±2 °C en oscuridad. Cada 24 h se extrajo una muestra de la suspensión para cuantificar el inóculo de basidiosporas. Para la determinación se usó una cámara de recuento de esporas (hematocímetro de Neubauer). Cuando la concentración de las basidiospora alcanzó 10⁶⁻⁸/ml se procedió a conservarlas en refrigeración hasta ser utilizadas en las inoculaciones de laboratorio y campo.

Acondicionamiento de plantas de *G. multiflora*

Un total de 6 plantas sanas de *G. multiflora* fueron extraídas con el pan de tierra del humedal donde habita esta especie en marzo-abril del año 2009. Para realizar el trasplante de las plantas, previamente se acondicionaron dos contenedores de 2 m de ancho x 10 m de largo que se revistieron con plástico negro de 200 micrones de espesor para evitar la pérdida de humedad y conservar las condiciones ambientales semejantes a dónde se desarrolla esta especie. En

cada contenedor se colocaron tres plantas que se mantuvieron inundadas en forma permanente para evitar la desecación durante el período otoño-invernal. En la primavera (septiembre-octubre) cuando se inició el crecimiento vegetativo de las plantas con la aparición de los macollos, se comenzó con la extracción de las muestras de brotes para realizar las experiencias de laboratorio y se seleccionó un contenedor para las inoculaciones a campo.

Métodos de inoculación

Las metodologías utilizadas en esta investigación fueron adaptadas y modificadas en base a técnicas utilizadas para el estudio de otras especies de Ustilaginales, como se ha mencionado por Fernández *et al.* (1978), Matyac (1985), Craig & Frederiksen (1992).

1. Ensayo de inoculación en laboratorio

Para este ensayo se extrajeron muestras de las plantas jóvenes mantenidas en el campo y que se procesaron en el laboratorio realizando cortes de hojas de 2 cm, las cuales se inocularon con: i. basidiosporas producidas por el hongo en el caldo de cultivo PD; ii. Suspensión en agua destilada estéril de teliosporas a razón de una concentración 10^{6-8} esporas/ml.

i. Inoculación con basidiosporas:

Los cultivos obtenidos de basidiosporas del hongo procedentes del medio PD, fueron inoculados sobre tejidos de la lámina de glicerina utilizando una alícuota de 0,01ml, extraída con micropipeta (concentración 10^{6-8} basidiosporas/ml).

Los testigos fueron tratados con medio PD sin el cultivo del patógeno. El material tratado se dispuso en portaobjetos colocados sobre papel de filtro estéril húmedos con agua destilada estéril en cajas de Petri. Luego llevados a estufa de cultivo BINDER KBF LQC a 25°C ±2°C con fotoperíodo de 12h luz/12h oscuridad. A partir de las 24 h se procedió a extraer muestras que fueron observadas con microscopio óptico (Olympus CX21).

ii. Inoculación con teliosporas

Se utilizó una alícuota de 0,01ml extraída con micropipeta de la suspensión de teliosporas que se inoculó sobre la lámina de la hoja de *Glyceria*. Las muestras se acondicionaron como en el caso anterior.

Para ambos ensayos se procedió a extraer las muestras de tejidos de la hoja y realizar cortes histológicos, los cuales fueron montados en lactofenol-azul de algodón para la observación del hongo.

2. Ensayo de inoculación a campo

Durante la primavera del año 2009, se seleccionó un contenedor con tres plantas de *G. multiflora* para inocular con el patógeno, y otro contenedor con tres plantas se que reservó sin inocular.

Para estimular la infección del hongo se procedió a usar el inoculó previamente preparado en un Erlenmeyer que contenía 200 cm³ de medio de PD y una concentración de (10⁶⁻⁸ esporas/ml). Las plantas no tratadas (controles) fueron regadas con el medio PD sin el patógeno.

Para inocular las plantas se procedió a usar la técnica de riego sobre la zona o área de emergencia de los macollos de *Glyceria*. Esta metodología se ejecutó cada vez que las plantas producían los rebrotes de yemas vegetativas, (aproximadamente cada 20 días). Las infecciones se realizaron entre los meses de noviembre-diciembre del año 2009 en condiciones de campo.

Las observaciones y extracción de las muestras a campo se realizaron a partir de las 24h de inoculadas las plantas, tanto para las plantas inoculadas como los controles, y hasta observar los primeros síntomas y el signo producido por el patógeno.

Posteriormente, las plantas se dejaron por dos años (2010- 2011) en el campo para verificar si se producían reinfecciones de *U. filiformis* en forma natural. Para comprobar la evolución de esta patología se realizaron observaciones macroscópicas, microscópicas y reaislamientos del hongo durante este periodo.

3. Cortes histológicos para el análisis histopatológico

Para estos experimentos se extrajeron periódicamente muestras de las plantas *G. multiflora* inoculadas a campo en las que se observó el desarrollo de síntomas del patógeno (clorosis, alteraciones morfológicas, etc.) y los controles sin tratar. Las muestras de hojas infectadas y los controles se fijaron en formalina-acético-alcohol (FAA). Posteriormente, se pretrataron con ácido fluorhídrico al 10% durante 24 h, para ablandar el tejido y eliminar el sílice presente en la epidermis. La inclusión se realizó en parafina para los cortes transversales y longitudinales de aproximadamente 10-12 μm de espesor usando un micrótopo tipo Minot (Senior

Rotary micrótomo Marca Arcano, Modelo-RTM-30). La observación microscópica se realizó en microscopio óptico (Olympus CX21), siguiendo la metodología indicada por Bracegirdle & Miles (1975) y D'Ambrogio Argüeso (1986) utilizando la coloración doble de safranina-fast-green y el adhesivo de montaje bálsamo de Canadá.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de la especie y morfología de las colonias

Las observaciones macroscópicas y con lupa estereoscópica de los síntomas de la lámina de *Glyceria* confirmaron que los Soros corresponden a los típicos de la especie *U. filiformis*. Esta especie forma estrías oscuras de color marrón a negras, de tamaño de 1-2 mm a varios centímetros de longitud (Figura 1 A, B) (Hirschhorn 1986; Mordue 1991).

Las teliosporas son simples, de forma redondeada a sub-globosa; tamaño de 4-7 x 3-5 μm ; episporio aparentemente liso y de color amarillo claro a marrón oscuro, tal como se comprobó en los preparados de microscopio óptico (Figura 2 A). La observación de la ornamentación de la espora con microscopio electrónico de barrido (MET) permitió visualizar un episporio finamente granuloso (Figura B). En nuestra investigación verificamos el tipo de germinación in vitro los cuales corresponden a la especie y las características morfológicas de las teliosporas comparado con la información registrada en observaciones realizadas por Brook 1957 y Hirschhorn (1986).

Las teliosporas germinaron *in vitro* sobre el medio A.A. después de 3 días cuando emitieron las basidiosporas de 10-100 μm de largo, con septos o formación de escasos septos. Las basidiosporas (= esporidios) hijas, pueden ser laterales o terminales. La multiplicación es por brotación y se producen a su vez una cantidad abundante (Figura 2 C-D). Resultados similares fueron registrados por Butler *et al.* (1978). Las basidiosporas forman rápidamente colonias del tipo levadura de color marrón claro al ocre, con rugosidades en la superficie de la colonia y zonas de hifas del tipo algodonoso de color blanco en PDA. También presentan un crecimiento del tipo radial que a los 10 días cubrió la caja de Petri de 9 cm de diámetro (Figura 3 A).

Ensayos de laboratorio

La metodología aplicada en las inoculaciones *in vitro* sobre trozos de hoja de *Glyceria*, tanto con la utilización de basidiosporas o de teliosporas, fueron igualmente eficientes para producir la infección y dilucidar el proceso infectivo del carbón de la estría de *Glyceria* y su interacción con el hospedante.

En la Figura 3 B,C,D se registran los pasos del procedimiento. En el caso de las basidiosporas, se observó una rápida multiplicación y producción de nuevas basidiosporas (**n**) por brotación tipo levadura sobre la lámina de la hoja dentro de las 6-8 h de inoculadas. Paralelamente, se observó sobre en el tejido los apareamientos entre basidiosporas compatibles (**-n+n**) que originan posteriormente a la hifa infectiva (Figura 4 A,B). En el caso de las teliosporas la germinación se produce entre 3-6 días de inoculadas y rápidamente se inicia la

proliferación de basidiosporas laterales, proceso que continúa hasta la formación de la hifa infectiva como se registró en la aplicación de basidiosporas (Figura 4 C,D).

Pruebas de patogenicidad a campo

El experimento de pruebas de patogenicidad, en el que se utilizó como inoculó basidiosporas en condiciones a campo, nos permitió observar que las primeras lesiones del ataque del patógeno se evidenciaron entre los 10-15 días de la inoculación en las plantas de *Glyceria* (Figura 5 A,B. Los síntomas correspondientes a la primera etapa de la infección de *U. filiformis* se evidenciaron en forma sub-epidérmica, paralelas a las nervaduras. Se observó i. clorosis, en algunos casos amarillamiento, y posterior necrosis del tejido epidérmico. Cabe destacar que este síntoma no es usual en el orden de las Ustilaginales por tratarse de patógenos biotróficos. Asimismo se observó ii. Formación de estrías oscuras y/o ampollas sub-epidérmicas. Posteriormente, estas lesiones maduran y se produce la ruptura de la epidermis. Como resultado, se liberan las teliosporas oscuras correspondientes al signo de la enfermedad (Figura 5 C,D,E). También se observó la presencia de panojas con espiguillas estériles comparadas con las plantas testigos que no presentaron síntomas ni signos de la enfermedad. Esta sintomatología fue similar a las registradas en otras especies del orden de las Ustilaginales tales como ejemplo las estrías y ampollas sobre la hoja producidas por el carbón de la hoja bandera del trigo (*Urocystis agropyri*=*Urocystis tritici*) y la presencia de espiguillas estériles producidas por *Sporisorium reiliana*, carbón de la

panoja del sorgo (Wilson & Frederiksen 1970, Bhatnagar *et al.* 1978; Mordue & Walker 1981, Beniwal 1992, Vánky & Shivas 2008).

También se registraron reinfecciones naturales de *U. filiformis* procedentes de las inoculaciones artificiales originalmente realizadas en el año 2009, que fueron comprobadas por la observación periódica de síntomas y signos correspondiente al carbón y análisis en laboratorio.

Análisis histopatológico

La anatomía de la hoja de *Glyceria* vista en corte transversal presenta una estructura de tipo **festucoide**. Los cortes de los testigos sanos presentan un clorénquima poco desarrollado y espacios intercelulares muy notables entre los haces vasculares secundarios, en donde se observó la presencia de células estrelladas correspondiente al tejido parenquimático con reserva de aire denominado comúnmente aerénquima (Figura 6 A). El desarrollo de éste último se debe a que la planta habita en zonas anegadas que permiten la oxigenación y flotación de plantas (Burkart 1969). Las observaciones sobre el material infectado, en comparación con el testigo, mostraron que el hongo penetra en la lámina a través de los estomas o por el ablandamiento de las paredes celulares y de la laminilla media, producido por enzimas (Figura 6 B). Luego el micelio fúngico penetra en el clorénquima, en posición subepidérmica, invadiendo lateralmente los tejidos e incluso se observa también por debajo de los haces vasculares (Figura 7 A,B). Las hifas penetran principalmente por la cara abaxial de la hoja o filodio. Una vez que el micelio se fragmenta, se induce a la esporogénesis y los espacios

intercelulares entre haces vasculares, donde estaba ubicado el aerénquima, se observan expandidos por hipertrofia de los tejidos con las paredes interiores cubiertas de teliosporas de color marrón oscuro. Estas zonas, externamente presentan síntomas en estrías o ampollas castaño-oscuro entre las nervaduras paralelas de la hoja o filodio (Figura 8 A), a diferencia de lo observado en la superficie de la hoja sana (Figura 8 B). Dichas estrías no se encuentran dispuestas en forma continua a lo largo de la superficie de la lámina, sino que están interrumpidas. No se observó la presencia del hongo en los cortes realizados en los tallos de las plantas infectadas ni en los meristemas vegetativos y reproductivos. Por lo expuesto, se puede establecer que la infección de *U. filiformis* es de “tipo local” y no sistémica. Resultados similares se registraron para otros carbones que producen la enfermedad en el mismo órgano que infectan, colonizan y esporulan, como por ejemplo es el caso de *Ustilago maydis* y *Thecaphora frezii* (Hirschhorn 1986; Astiz Gassó & Molina 2010; Astiz Gassó *et al.* 2010).

Los resultados preliminares aquí obtenidos fueron presentados en un reporte preliminar (Astiz Gassó *et al.* 2012). Además, nos permitió confeccionar el ciclo biológico de *U. filiformis* en *Glyceria*, tal como se detalla a continuación (Figura 9).

Ciclo Biológico de *Ustilago filiformis* (Astiz Gassó *et al.* 2013)

El proceso infectivo del carbón de la estría de *Glyceria* comienza con hojas infectadas con teliosporas del hongo, que son diseminadas y dispersadas por el

viento (Figura 9 1). Las plantas de *Glyceria* se encuentran en humedales donde las teliosporas llegan a la superficie del agua y por flotación se aproximan a las hojas (Figura 9 2). Las teliosporas en reposo son **n+n** y en presencia del hospedante se induce a la maduración que luego al fusionarse se transforman en **2n** (Figura 9 3). A continuación se forman las basidiosporas haploides (**n**) y la fusión de células compatibles para generar la hifa infectiva (**n+n**) (Figura 9 3-8). La infección del patógeno se produce cuando la hifa infectiva forma el apresorio y penetra al tejido a través de estomas o por ablandamiento de las paredes celulares (Figura 9 5). Posteriormente, se produce la colonización de la hoja de *Glyceria* y la infección del hongo avanza entre los haces vasculares formando estrías o ampollas internervales (Figura 9 5,6). Las teliosporas (**n+n**) se forman en el clorénquima aerífero del mesófilo o aerénquima (Figura 9 5,6). La presión que ejercen las teliosporas sobre el tejido y se produce la ruptura de la superficie de la hoja y son diseminadas por el viento y/o el agua (Figura 9 1). La supervivencia del patógeno es a través de las teliosporas que se encuentran en el suelo, como así también, en los restos vegetales infectados.



Figura 1. **A.** Plantas de *Glyceria* con infecciones naturales de *Ustilago filiformis*. **B.** Observación macroscópica sobre la hoja con síntomas de clorosis y necrosis. Manifestación del signo por la presencia de teliosporas negras sobre el hospedante.

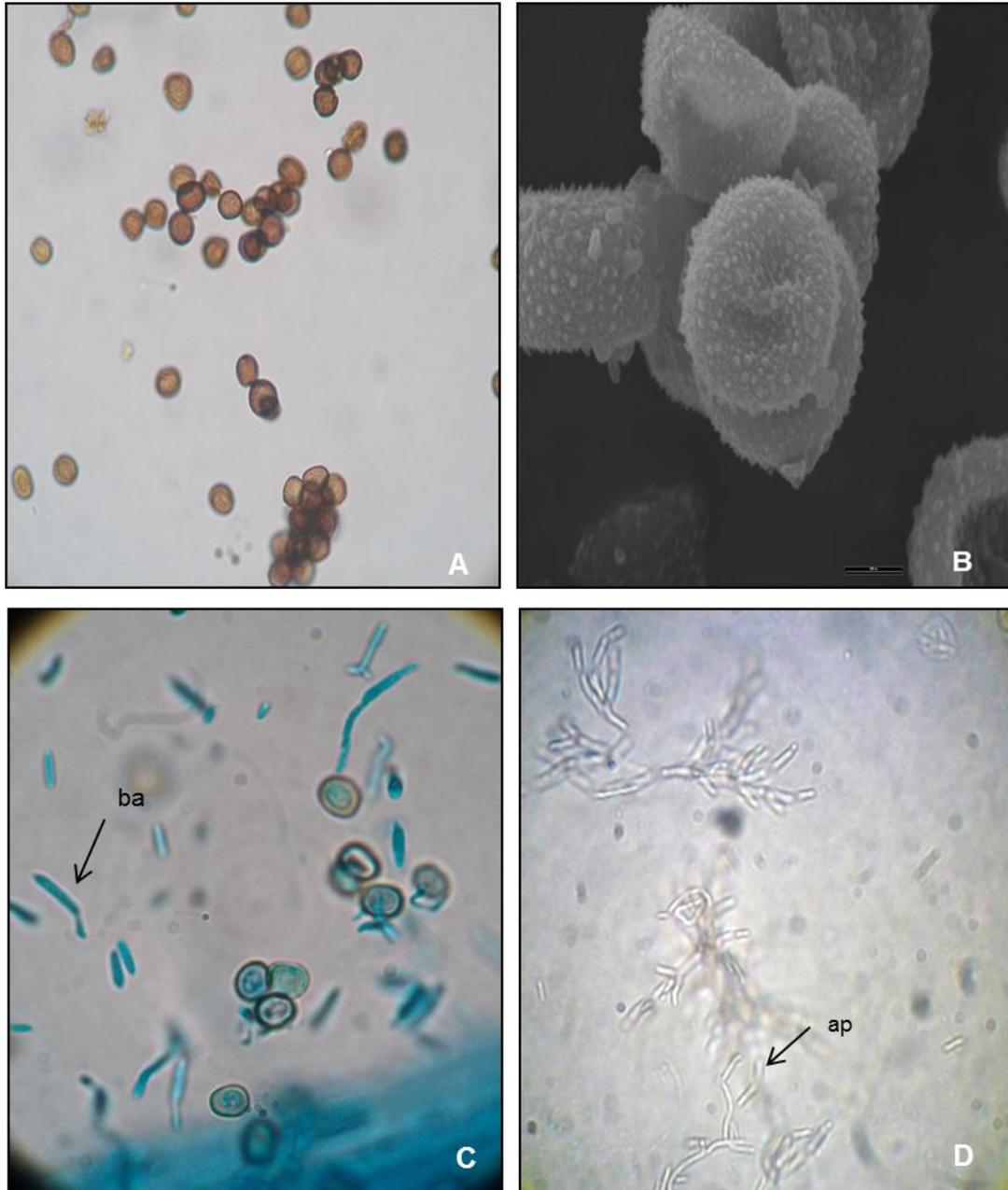


Figura 2. Observación de estructuras reproductivas con microscopio óptico (MO) y electrónico de barrido (MEB) en *U. filiformis*; **A.** teliosporas de *U. filiformis* (MO) escala bar= 14 μ ; **B.** teliosporas de *U. filiformis* (MEB) escala bar= 22 μ ; **C-D.** Germinación in vitro de teliosporas de tipo levadura con formación de basidiosporas (ba) y apareamiento (ap) entre basidiosporas observados en PDA.

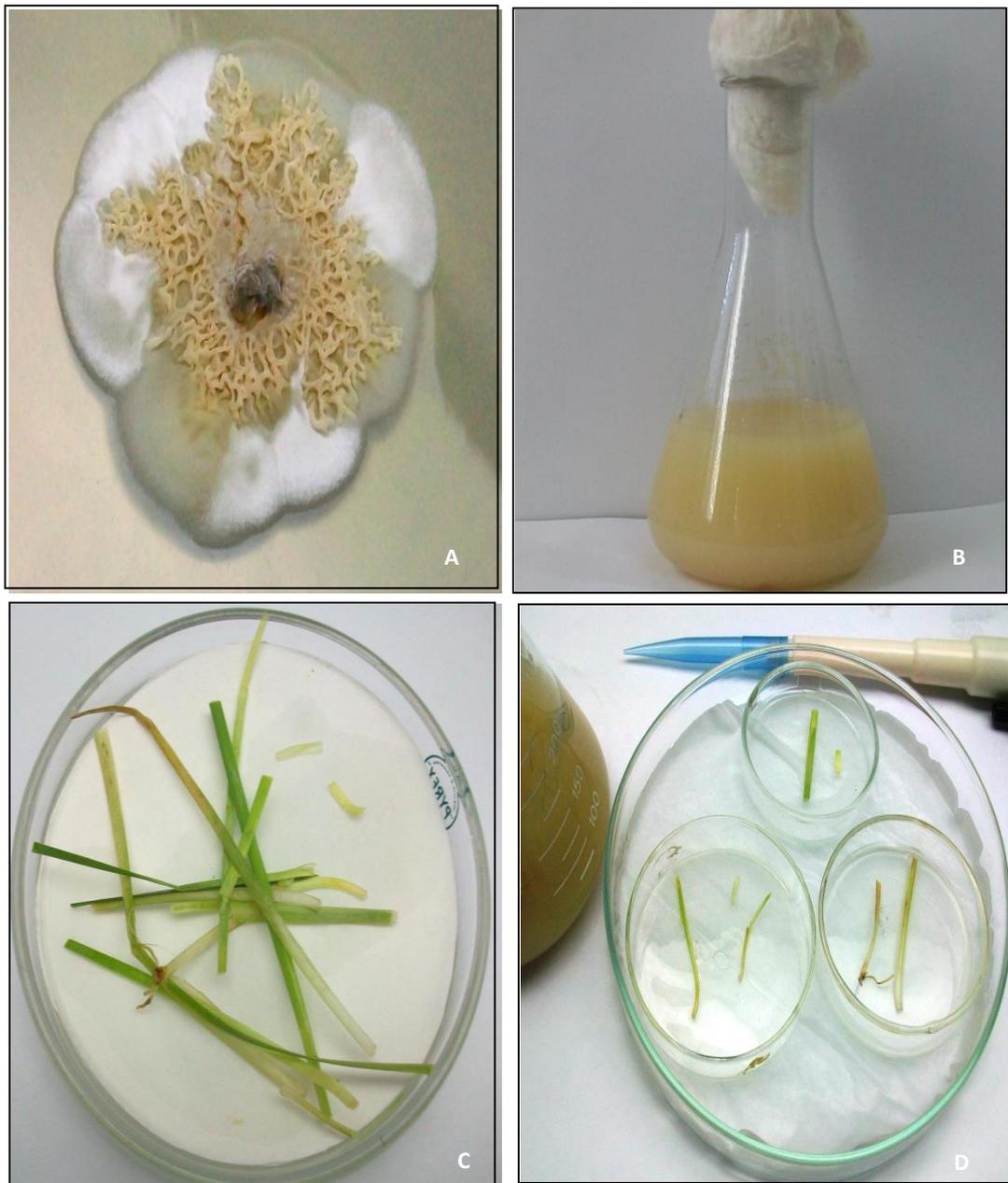


Figura 3. **A.** Observación macroscópica de la colonia de *U. filiformis* desarrollada en PDA; **B.** Crecimiento de *U. filiformis* en PD para ser utilizado en las inoculaciones *in vitro* y a campo; **C.** Muestras de plantas de *Glyceria* para la inoculación con teliosporas y basidiosporas para realizar las pruebas de patogenicidad *in vitro*; **D.** Cámara húmeda.

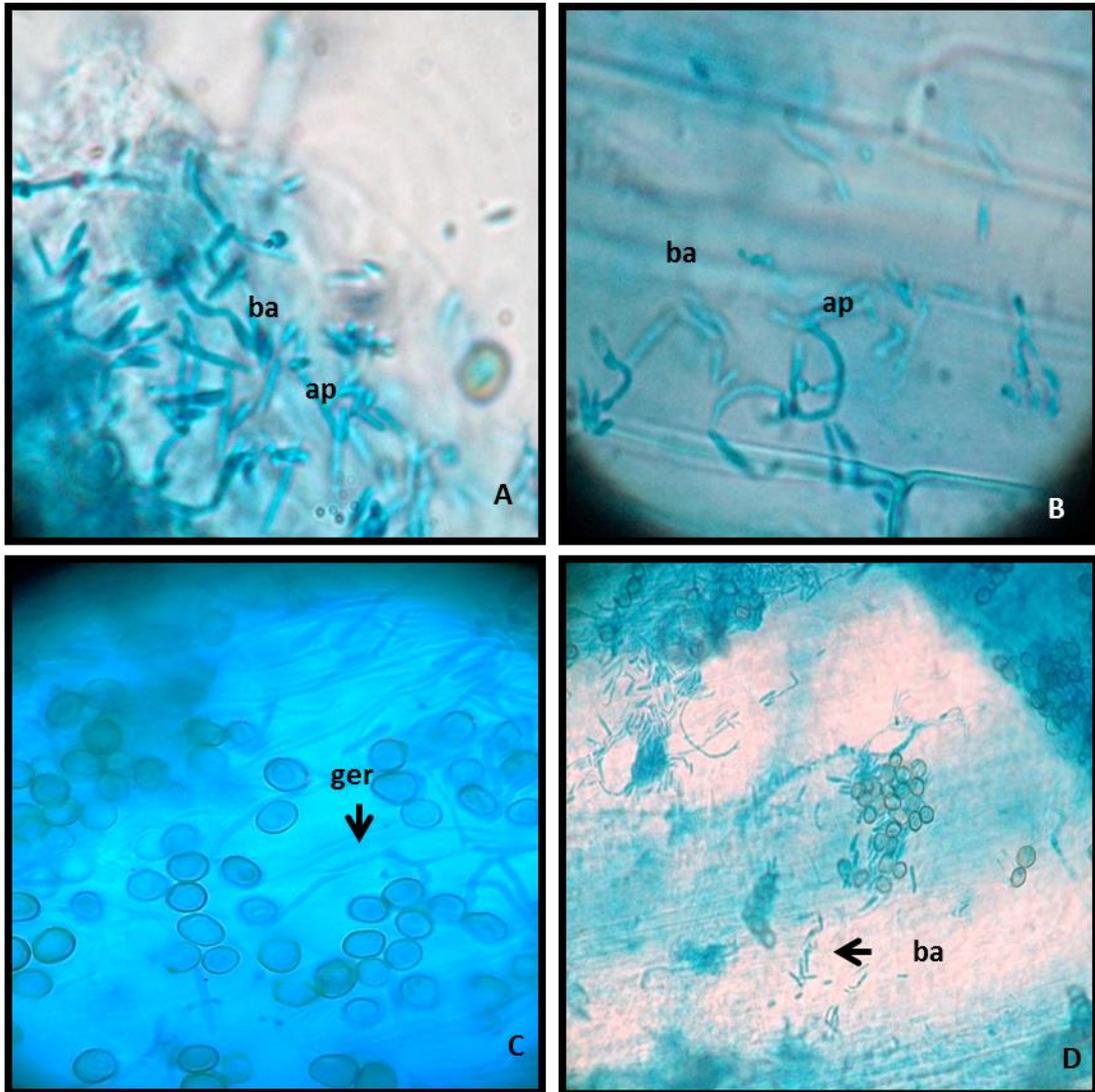


Figura 4. Observación de germinación e infección sobre hoja de *Glyceria in vitro*: **A-B.** Inoculación con basidiosporas (ba) y observación de los apareamientos entre basidiosporas compatibles (ap); **C-D.** Inoculaciones con teliosporas en las que se observa la germinación (ger) y formación de basidiosporas (ba) sobre la hoja.

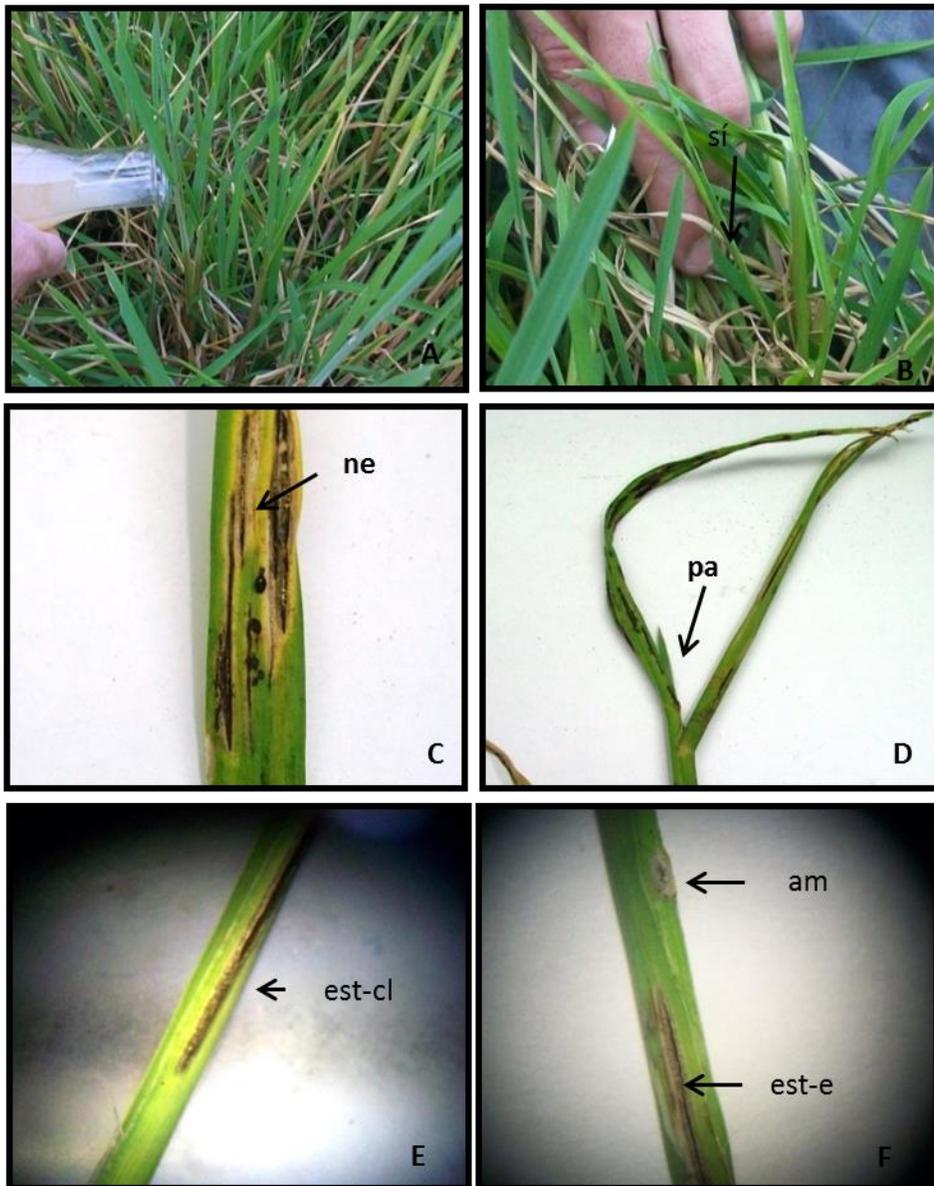


Figura 5. Inoculación artificial con basidiosporas de *U. filiformis* desarrolladas con medio de cultivo PD y observación macroscópica de los síntomas: **A.** Inoculación a campo en el rebrote de las plantas de *Glyceria*; **B.** Aparición de los primeros síntomas y signos de la enfermedad (si); **C.** Presencia de amarillamiento y necrosis internerval (ne) sobre la hoja; **D.** Aparición de panojas estériles inducidas por el patógeno (pa); **E-F.** Distintas sintomatologías sobre la hoja. **E.** Observación de estrías con clorosis (est-cl). **F.** Estrías errupentes con liberación de teliosporas (est-e) y formación de ampollas (am) producidas por el hongo.

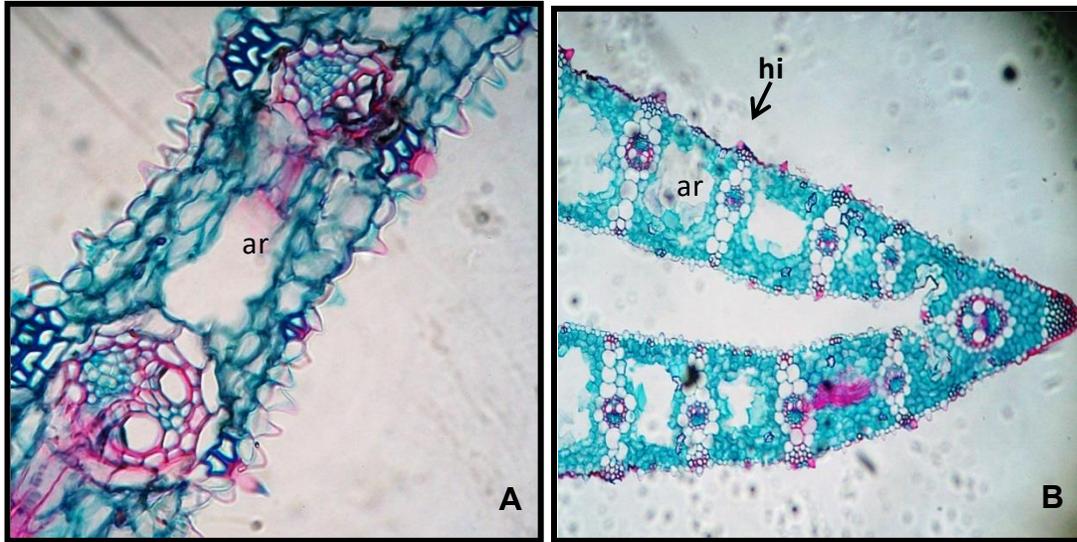


Figura 6. Observación microscópica de hoja de *Glyceria* procedente de inoculaciones artificiales a campo. **A.** Hoja sana de *Glyceria*: Corte transversal de la hoja con aerénquima (ar) sano en MO; **B.** Corte transversal de la hoja con la hifa (hi) del hongo sobre la epidermis y el aerénquima (ar) aún no hipertrofiado en MO.

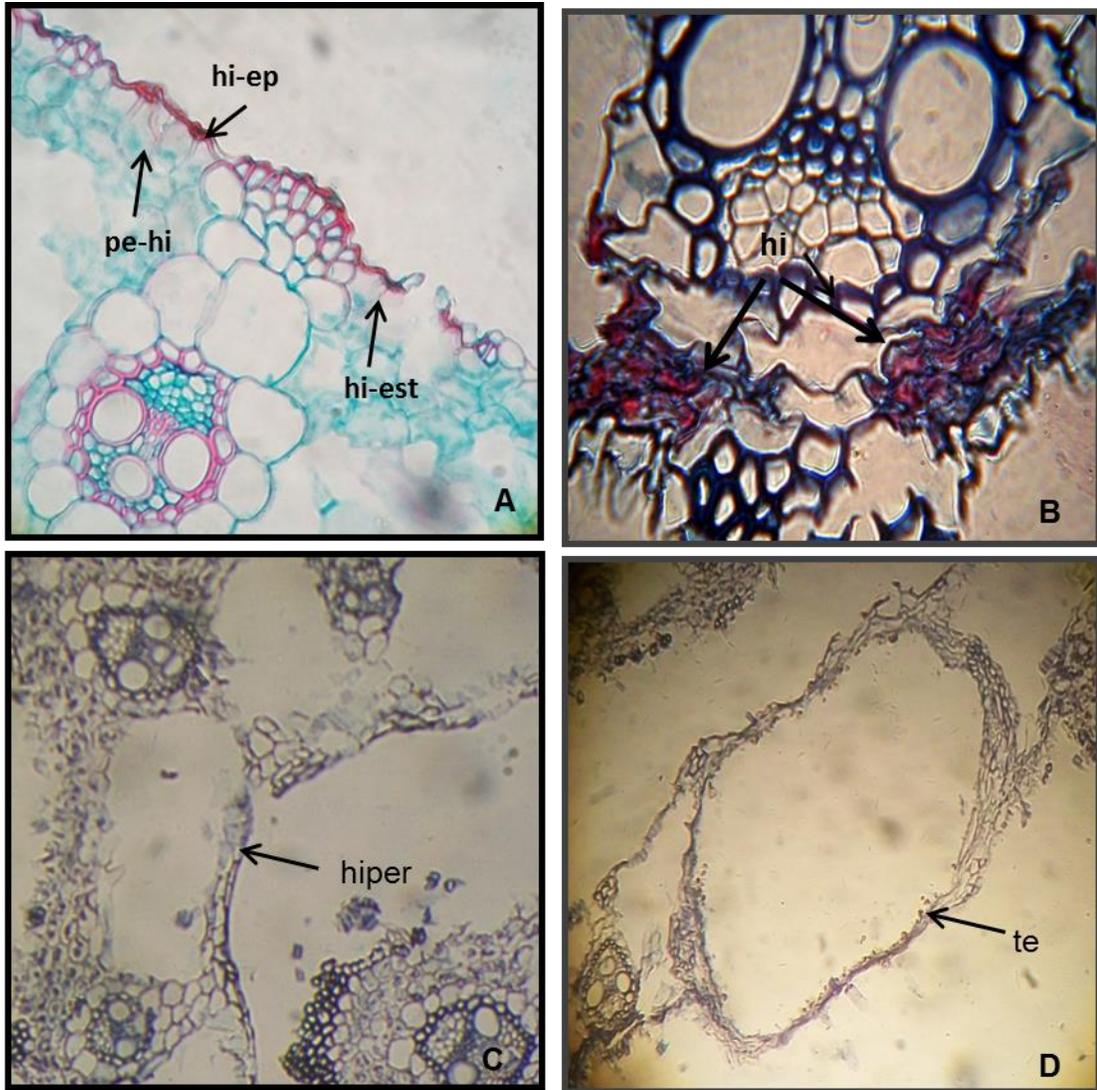


Figura 7. Observación en corte transversal de la hoja infectada con MO. **A.** Presencia de hifas sobre el estoma (hi-est) y la epidermis (hi-ep) y penetración de las mismas (pe-hi) por ablandamiento de las paredes celulares inducidas por el hongo; **B.** Tejidos colonizados por las hifas del hongo cercano a los haces vasculares; **C-D.** Hipertrofia del tejido (hiper) entre los haces vasculares donde se ubica el aerénquima con ocupación de las teliosporas (te).

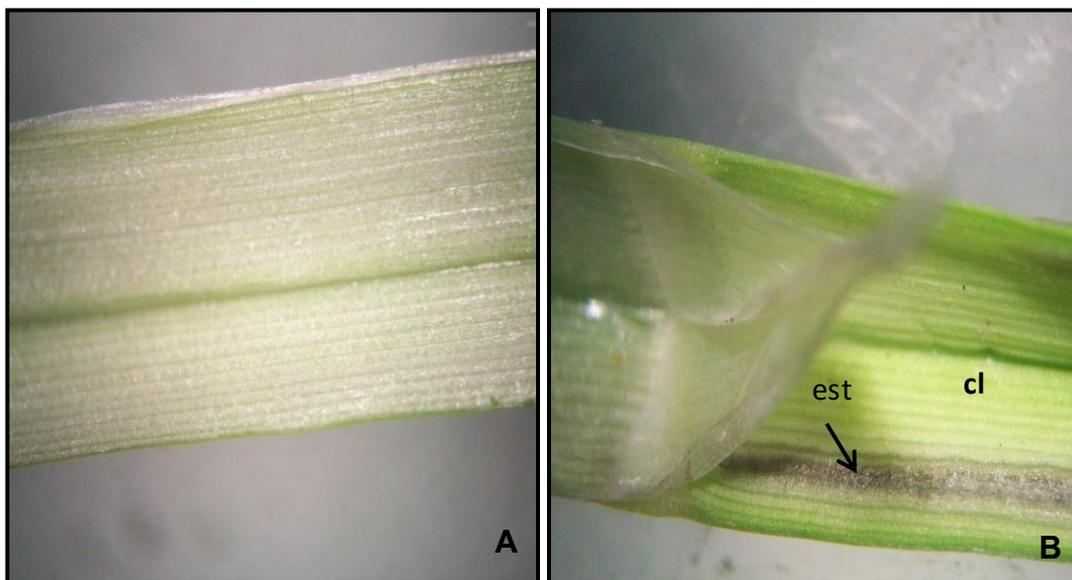


Figura 8. Observación macroscópica de hoja de *Glyceria* en plantas cosechadas a campo procedente de inoculaciones artificiales. **A.** Hoja sana de *Glyceria*: vista superficial con lupa estereoscópica; **B.** Hoja enferma: Vista superficial: Detalle de clorosis (cl) y síntoma en forma de estría (est) producido por *U. filiformis*.

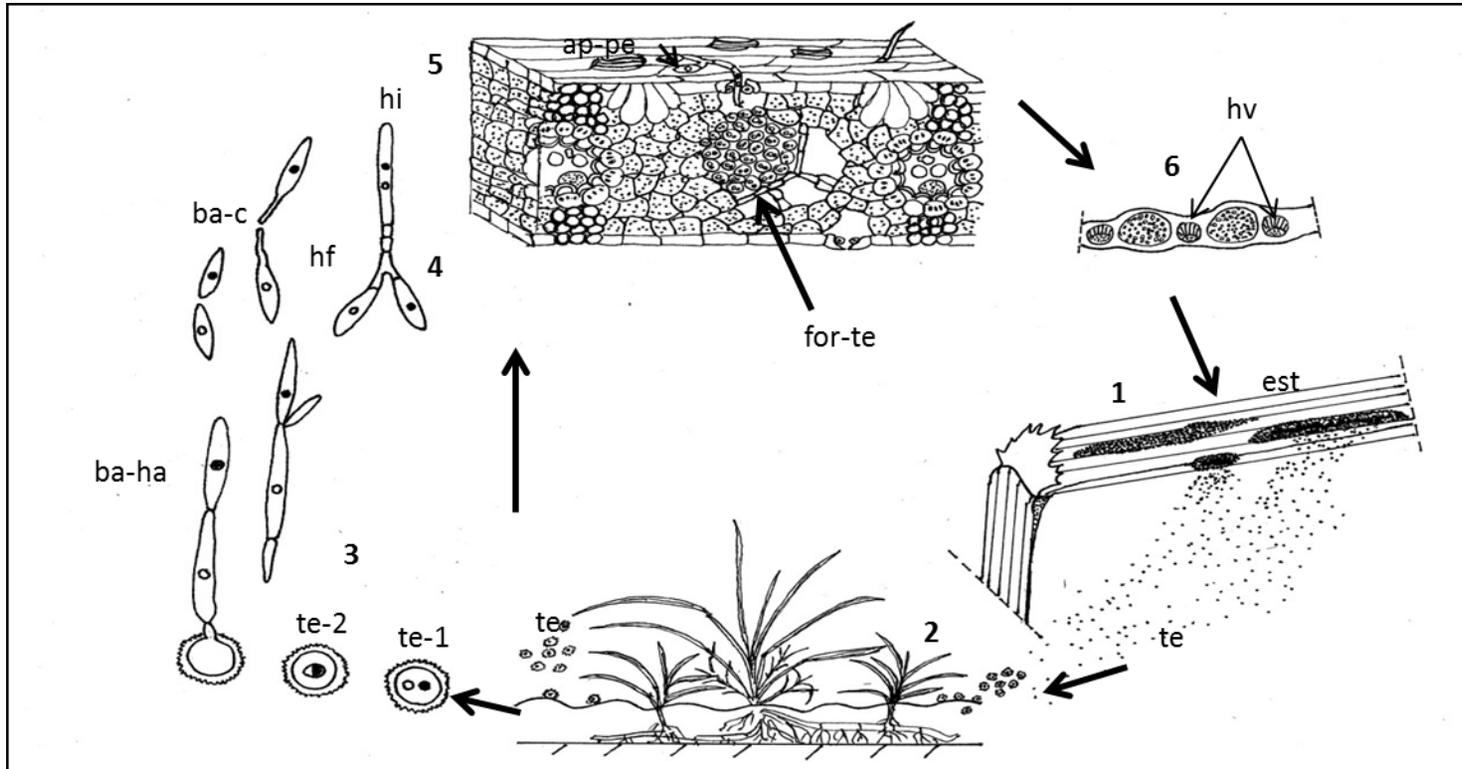


Figura 9: Ciclo biológico de *Ustilago filiformis*: **1.** Hoja infectada por el carbón de la estría con teliosporas (te) diseminadas por el viento; **2.** Plantas de *Glyceria* en el humedal con teliosporas que llegan a la superficie del agua y se aproximan a las hojas; **3.** Teliosporas en reposo $n+n$ (te-1) y teliosporas maduras $2n$ (te-2); **4.** Formación de basidiosporas haploides (ba-ha) y conjugación de basidiosporas (ba-c). Formación de la hifa infectiva (hi) por fusión de las células; **5.** Sección transversal de la hoja de *Glyceria* con la infección del patógeno. Formación del apresorio y penetración (ap-pe) de la hifa infectiva en el tejido por ablandamiento de las paredes y/o por los estomas con formación de teliosporas en el aerénquima del mesófilo; **6.** Aspecto general del corte de hoja con la infección del hongo entre los haces vasculares (hv); **1.** Estrías errupentes (est) producidas por el hongo sobre la superficie de la hoja con liberación de teliosporas que son diseminadas por el viento y el agua.

CONCLUSIONES

Las investigaciones realizadas durante la ejecución de esta investigación de *U. filiformis* en *Glyceria* sp., nos permitió arribar a las siguientes conclusiones:

- 1.- Los métodos utilizados en esta investigación son eficientes para la determinación de la histopatología del carbón de la estría sobre su hospedante.
2. Se pudo determinar el proceso de penetración, infección y colonización del patógeno sobre las plantas de *Glyceria*.
3. Se determinó que la característica de la infección es de tipo local y no sistémica.
4. Se presume una disminución de la disponibilidad del forraje para el ganado debido al ataque directo de *U. filiformis* sobre las hojas. También habría que determinar su posible toxicidad en los animales al ser consumido.
5. Se estableció y esquematizó el ciclo biológico de *U. filiformis* sobre *Glyceria* spp. por primera vez en nuestro país y en el mundo, constituyendo un aporte de valor para entender la epidemiología de la enfermedad.

BIBLIOGRÁFIA

Alonso S.I., Guma I.R., Nuciari M.C., van Olphen A. 2009. Flora de un área de la Sierra Borrosa (Balcarce) y fenología de especies con potencial ornamental. Rev. FCA UNCuyo 41 (2):23-44.

Astiz Gassó M.M., Molina M. del C. 2010. Physiological specialization of Ustilaginales (smut) of genera *Bromus*, *Zea* and *Triticum* in Argentina. Cap. 11. Management of fungal plant pathogens. Págs. 138-146. CAB International 2010 SBN: 81-7233-468-0.

Astiz Gassó M.M., Lovisolo M., De Magistris A., Leis R. 2006. Reporte del carbón *Ustilago longissima* (Sch) Meyen sobre *Glyceria multiflora* Stued. (Poaceae) en la provincia de Buenos Aires. Actas XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas Pág. 278.

Astiz Gassó M.M., Lovisolo M., Mollá Kralj A. 2010. Histopatología del carbón *Thecaphora frezii* en *Arachis hypogaea*. Boletín Editado en la Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. ISSN On line 1851-4987 Págs. 1-3.

Astiz Gassó M.M., Lovisolo M., Perelló A. 2012. Biología e histopatología del carbón *Ustilago longissima* sobre *Glyceria multiflora*. Actas XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Pág. 49.

Beniwal M.S. 1992. Effect of flag smut on yield and yield components of wheat varieties. Crop Research (Hisar) 5:348-351.

Bhatnagar G.C., Gupta R.B.L., Mishra V.L.1978. Effect of flag smut, caused by *Urocystis agropyri*, on yield components of wheat cultivars in Rajasthan, India. Plant disease Reporter 62:348-350.

- Brook S. D. 1957.** Additions to the smut fungi of New Zealand, II Transactions of the Royal Society of New Zealand 84 (4): 643-648.
- Burkart A 1969.** Flora ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Parte II. Gramíneas. La familia botánica de los pastos. Colección Científica del INTA, Tomo VI, II. Buenos Aires, Argentina.
- Butler G., Boughey H., Cauwood H. 1978.** The mating system of *Ustilago longissima* *in vitro*. Transactions Britain Mycology. Society 71(2) 203-208.
- Hirschhorn E. 1986.** Las Ustilaginales de la flora Argentina. C.I.C. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires 530 pp.
- Kosiada T. 2011.** In vitro influence of selected fungicides on *Sphacelotheca reiliana* and *Ustilago maydis*. Journal of Plant Protection Research 51(4): 342-348.
- Maurya S., Singh U.P., Singh R., Singh A., Singh H.B. 2010.** Role of air and light in sclerotial development and basidiospore formation in *Sclerotium rolfsii*. Journal of Plant Protection Research 50(2): 206-209.
- Mordue J.E.M. 1991.** *Ustilago longissima*, (Descripciones de hongos y bacterias).IMI Description of Phytopathogenic Fung and Bacteria 110:1099.
- Mordue J.E.M., Walker J.M.1981.** *Urocystis agropyri*. CMI Description of Phytopathogenic Fung and Bacteria 716:1-2.
- Rossi C.A., Ferrari L., Postulka E. 2006.** Germination conditions for cebadilla de agua (*Glyceria multiflora* Steudel), a native grass of the flooding Pampa Rangeland (Argentina). International Journal of Botany 2 (3) 300-306.
- Rossi C.A., González G., De Magistris A.A., Torrá E. 2009.** Composición botánica del pastizal natural en un sistema silvopastoril del Delta del Paraná: clasificación forrajera. Actas del 1º Congreso Nacional de Sistema Silvopastoriles. Págs. 321-326.

Ványkó K., Shivas R.G. 2008. Fungi of Australia: The smut fungi. ABRS/Canberra. Melbourne, Victoria, Australia: CSIRO Publishing, 266 pp.

Vidal A., Piergentili D. 1973. Valor forrajero de algunas especies de ambientes hidromórficos de la provincia de Buenos Aires. De la Revista de la Facultad de Agronomía (3a época). XLIX. La Plata, República Argentina.

Wilson J.M., Frederiksen K. 1970. Histopathology of resistance in the *Sorghum bicolor*-*Sphacelotheca reiliana* interaction. Phytopathology 60:828-932.

CAPITULO III

Ustilago bullata (CARBÓN DE LA CEBADILLA CRIOLLA) EN EL GENERO *Bromus*

RESUMEN

B. catharticus es una especie forrajera nativa de América del Sur. La producción de semilla es frecuentemente limitada por el ataque del carbón de la panoja *U. bullata*. Los objetivos de esta investigación fueron: 1. Estudiar la biología del patógeno *U. bullata* y su evolución sobre el hospedante, *Bromus catharticus*; 2. Determinar su comportamiento y variabilidad patógena de *U. bullata* en el género *Bromus*; 3. Búsqueda de alternativas para el manejo integrado del carbón de la cebadilla *U. bullata*; 4. Establecer los niveles de infestación del carbón de la cebadilla en semilla de *B. catharticus* para lograr la mayor efectividad y eficacia en el uso de terapicos para el control químico de la enfermedad; 5. Seleccionar biocontroladores para el manejo integrado del carbón de la cebadilla. Se realizaron ensayos de laboratorio *in vitro* e histológicos y de campo con inoculaciones artificiales del patógeno (*U. bullata*) sobre diferentes especies del género *Bromus*. Se clarificó el ciclo biológico de la enfermedad, se determinó la presencia en el país de 4 formas fisiológicas y resistencia genética en dos especies de *Bromus* del carbón de la cebadilla. Se estableció que el umbral de infestación de la semilla ≤ 50 esporas/semilla sería un parámetro a tener en cuenta en la selección de lotes de semillas para un manejo eficaz y eficiente de la enfermedad a campo. Se estableció que las dosis de terapicos y principios activos deberían ser evaluadas previamente a

campo para evitar escapes de la enfermedad que podrían perjudicar la resiembra natural de la cebadilla. La interacción de terapicos-biocontroladores podría ser considerado como una alternativa para el manejo integrado de la enfermedad en el género *Bromus*.

Palabras claves: Histopatología, manejo integrado, *Ustilago bullata*

INTRODUCCIÓN

Bromus cantharticus Berk (= *B. unioloides*, *B. willdenowii*), nombre vulgar: “cebadilla”, “cebadilla criolla”, “cebadilla australiana”, “Rescue grass”, “Brome grass”.

Es una especie nativa de las planicies templadas, cuyo ciclo de vegetación es otoño-invierno-primavera. Los ecotipos bianuales se hacen perennes en pasturas por su facilidad de semillar. Esta pastura se encuentra frecuentemente limitada su resiembra por el ataque de *U. bullata* que deforma las espiguillas de las panojas y reemplaza a las semillas por una masa carbonosa constituida por teliosporas del patógeno. Las esporas caen al suelo y/o son transportadas por las semillas cuando se contaminan en el momento de la cosecha durante la trilla de las plantas. La viabilidad de las esporas es de varios años (Hirschhorn 1986, Fallon, 1976,1980, Fallon *et al.* 1988). También se han observado infecciones en rebrotes de cultivos implantados por esporas pre-existentes en el suelo (Falloon 1979 a, b, Astiz Gassó datos sin publicar).

En investigaciones realizadas sobre micotoxicosis causadas por el carbón de la cebadilla se registraron patologías con cuadros clínicos graves en el ganado bovino, ovino y equino. Los estudios realizados por médicos

veterinarios en Chile sobre *U. bullata* registraron que puede causar gastroenteritis severa, tialismo, temblores, parálisis posterior y aún la muerte en animales y, en Argentina, se le ha considerado causal de aborto en yeguas; en vacas lecheras pérdida de peso, menor producción de leche y otros efectos de micotoxicosis se presentaban cuando el hongo infectaba a cebadilla australiana (Parada 1988, Sri Deva 2008).

El carbón de la cebadilla, también produce importantes mermas en la producción de semillas en la región pampeana, afectando la resiembra natural y la disponibilidad comercial de semillas.

HIPOTESIS

- *Ustilago bullata* produce distintas alteraciones histopatológicas en los tejidos vegetativos y reproductivos de plantas de *Bromus catharticus*.
- El conocimiento de las razas de *U. bullata* y la variabilidad genética de *Bromus* sp. permitirán en el futuro aplicarse estrategias en el manejo de *U. bullata* en el género *Bromus*.
- El establecimiento de un umbral de esporas en semillas de *B. catharticus* y la determinación de la dosis de terapicos de semillas logra una mayor eficacia y eficiencia en el control de la enfermedad en el cultivo.
- *Trichoderma* spp. disminuye la infección de *U. bullata* en plantas de *Bromus* spp.

- El uso combinado de *Trichoderma*-terápico sintético aporta un mayor control y mejora el manejo del patógeno *U. bullata* sobre *B. catharticus*.

OBJETIVOS

- Estudiar la biología del patógeno *U. bullata* y su evolución sobre el hospedante, *Bromus catharticus*.
- Determinar la existencia de formas fisiológicas en poblaciones *U. bullata* y el comportamiento en diferentes especies del género *Bromus*.
- Establecer los niveles de infestación del carbón de la cebadilla en semilla de *B. catharticus* para lograr la mayor efectividad y eficacia en el uso de terapicos para el control químico de la enfermedad.
- Determinar si aislamientos de *Trichoderma* spp. de la rizósfera de plantas de *B. catharticus* son efectivas para el biocontrol de *U. bullata*.
- Búsqueda de alternativas para el manejo integrado del carbón de la cebadilla *U. bullata*.
- Determinar si es posible la Interacción de terapico-biocontrolador para el manejo del carbón de la cebadilla.

3-1 BIOLOGÍA E HISTOPATOLOGÍA DEL PATÓGENO *Ustilago bullata* Y SU EVOLUCIÓN SOBRE EL HOSPEDANTE *Bromus catharticus*.

INTRODUCCIÓN

U. bullata es un patógeno biotrófico y su infección es sistémica. Las teliosporas persistente en el suelo por alrededor de 10 años. Fischer (1940) realizó las primeras investigaciones sobre el carbón de la cebadilla en las cuales observó el tipo de germinación y crecimiento en diferentes medios de cultivos. Fischer & Holton (1957) reportaron en ensayos *in vitro* la formación de teliosporas haploides (n) y una anomalía en la germinación en *U. bullata* no registradas en otros carbones. En Argentina, la Dra E. Hirschhorn recolectó más de 100 muestras de panojas con carbón de diferentes especies del género *Bromus* y *Hordeum* de distintas localidades. De las observaciones macro y microscópicas realizadas sobre teliosporas determinó variaciones morfológicas de *U. bullata* en muestras de *B. catharticus*, *Hordeum jubatum* y *H. compressum*. Además, estableció la distribución geográfica de *U. bullata* y determinó que en Argentina estaría representada por las especies *U. bullata* y *U. bullata* cv *macrospora* (Hirschhorn 1977). También inició los primeros estudios para dilucidar el proceso infectivo del patógeno sobre el tejido del hospedante que fueron continuados por Llama *et al* (2005).

OBJETIVO

Esclarecer la biología del patógeno *Ustilago bullata* y la evolución del proceso infectivo sobre el hospedante, *Bromus catharticus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y cultivo in vitro para el estudio de la biología de *U. bullata*.

Se tomaron muestras de panojas de plantas infectadas naturalmente del campo experimental del Instituto Fitotécnico de Santa Catalina F.C.A.F, U.N.L.P (Figura 1 A). Las teliosporas fueron extraídas de las panojas y se examinaron para determinar la especie del carbón: 1.- Se montaron en lactofenol para su visualización con microscopio óptico (MO) 2.- Se montaron en una platina y se metalizaron con una capa de oro paladio para su observación bajo microscopio electrónico de barrido (MEB) (D'Ambrogio Argüeso 1986).

Las panojas infectadas fueron trituradas con mortero para obtener una abundante masa carbonosa y homogenizar la muestra, luego se tomó una submuestra de 0,5 g de teliosporas que se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio al 2%, en agitación constante con agitador vortex durante dos minutos. Se centrifugó a 2.000 rpm, luego se desechó el sobrenadante, y al pellets obtenido se le realizaron tres lavados en agua destilada estéril. La muestra tratada se utilizó para:

1. Observación de la germinación de teliosporas de *U. bullata*: Se sembraron en placas de Petri que contenían papa-dextrosa-agar (PDA, 2%). Luego fueron incubadas en estufa a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ y en oscuridad.
2. Obtención de los cultivos axénicos y caracterización morfológica de las colonias del hongo desarrolladas en el ítem 1, se sembró un disco de 6 mm en el centro de una placa de Petri con medio de PDA 2% para la

caracterización morfo-cultural (crecimiento, forma, color) y se la incubó en estufa de cultivo a $18^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días.

Histopatología de *U. bullata* sobre plantas de *B. catharticus*

Para este ensayo se utilizó semillas del cultivar Copetona susceptible al carbón. Las semillas fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, luego se dejaron secar al aire a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) 24 h antes de ser tratadas con el inóculo. La inoculación se realizó colocando las semillas en bolsitas de papel y agregando las teliosporas del patógeno, luego se agitó vigorosamente hasta lograr una concentración de 60-90 esporas/semillas. Esto se comprobó realizando recuentos de esporas con hematocitómetro (Astiz Gassó 1983,1985, Astiz Gassó *et al* 2010).

Las semillas tratadas y el testigo sin tratar se sembraron en macetas de 2 l con una mezcla de 50% de tierra+ 50% de arena estéril. Posteriormente, las macetas fueron llevadas a cámara de cría con fotoperíodo 12h/12h-luz/oscuridad y se mantuvieron a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para favorecer el desarrollo de las plántulas y la penetración del patógeno (Astiz Gassó 1985, Fernández Pérez 1994).

Observación con microscopio óptico (MO)

Para este ensayo se utilizaron plántulas que desarrollaron en macetas y se extrajeron las muestras de tejidos en forma escalonada a partir de los 21 días hasta la emergencia de las panojas. 1.- muestras de tejidos del coleptilo hasta formación del meristema vegetativo. Se realizaron cortes de segmentos

de plántulas con bisturí a un centímetro hacia arriba a partir del cuello de la raíz; 2. Muestras de meristemas reproductivos y formación de panojas. Para la visualización de la evolución *U. bullata* en los tejidos en plantas de *B. catharticus* se usaron dos técnicas de tinción para la observación con MO (Figura 2).

1. Tinción con azul de algodón: Los segmentos de tejidos infectados y los controles fueron teñidos con azul de algodón-lactofenol 0,05% durante 45-60 minutos que se colocaron en estufa a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, luego las muestras se clarificaron con lactofenol para observarlo con MO (D'Ambrogio Argüeso, 1986).
2. Tinción coloración doble de safranina-fast-green: Los segmentos de tejidos infectados y los controles se fijaron en formalina-acético-alcohol (FAA). Posteriormente, se pre-trataron con ácido fluorhídrico al 10% durante 24h, para ablandar el tejido y eliminar el sílice presente en la epidermis. La inclusión se realizó en parafina para los cortes transversales y longitudinales de aproximadamente 10-12 μm de espesor usando un micrótopo tipo Minot (Senior Rotary micrótopo Marca Arcano, Modelo-RTM-30). La observación se realizó con microscopio óptico marca Olympus CX21, siguiendo la metodología indicada por D'Ambrogio Argüeso (1986). Para la tinción se utilizó la doble coloración safranina-fast-green y se montaron definitivamente con bálsamo de Canadá.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y cultivo in vitro para el estudio de la biología de *U. bullata*.

Las observaciones macroscópicas confirmaron que los soros corresponden a los típicos de la especie *U. bullata*, (Figura. 1 A,B). Las teliosporas presentan forma redondeada a sub-globosa; tamaño de 6-8 μ m de diámetro y color marrón oscuro; episporio equinulado tal como se comprobó en los preparados de microscopio electrónico de barrido (MET) y al microscopio óptico (Figura 2 A,B). A partir de las 6 h las teliosporas germinaron in vitro y emitieron metabasidios (= promicelios) y formación de basidiosporas (= esporidias) laterales. La multiplicación es por brotación, lo que genera una cantidad abundante de nuevas esporidias (Figura 2 C.). Éstas últimas rápidamente formaron colonias del tipo levaduroide de color marrón claro al ocre en PDA y presentaron crecimiento del tipo irregular de superficie verrugosa y sectores lisos (Figura.2 D). Las observaciones de este ensayo fueron comparadas con los trabajos realizados por Fischer & Holton (1957) y Hirschhorn (1986) confirmando que las características del hongo corresponden al patógeno en estudio.

Histopatología de *U. bullata* sobre plantas de *B. catharticus*

En el ensayo se registró un 100% de plantas infectadas a partir de las semillas inoculadas comparadas con el testigo sin tratar (Figura 3 A,B) Los resultados de las observaciones con MO con las dos técnicas de tinción fueron las siguientes:

1. Tinción con Azul de algodón:

En la Figura 4 A, se observa el procedimiento de extracción de muestras y montaje para la visualización con MO del patógeno sobre la epidermis del hospedante: En primer lugar se observó la germinación de la teliospora de *U. bullata* con la formación del metabasidio sobre la epidermis del hospedante (Figura 4 B). Posteriormente, la penetración del micelio intracelular (Figura 4 C) y por último, se observó la colonización de los tejidos (Figura 4 D).

2. Tinción coloración doble de safranina-fast-green:

En la Figura 5, se observó que el meristema apical es colonizado en su base por el patógeno, en donde las hifas proliferan de forma intercelular (Figura 5 A, B). De este modo el hongo permanece latente hasta el desarrollo reproductivo del hospedante infectando las espiguillas de la panoja de forma total o parcial. En donde el ataque produce hipertrofia en los tejidos de las flores que finalmente se desintegran porque el hongo se nutre de los hidratos de carbono que poseen las estructuras reproductivas, formando las teliosporas (Figura 5 C,D).

En la Figura 6, se grafica el ciclo completo de *U. bullata* sobre su hospedante *Bromus* sp.: Figura 6 1. Las teliosporas ($n+n$) se hallan sobre las glumas, entre las glumas y el cariopse y/o en el suelo; Figura 6 2. Las esporas comienzan a emitir el metabasidio y en pocas horas (5-6 h) generan las basidiosporas (n) que se aparearan entre si con las diferentes signos ($-n+n$). Figura 6.3 Posteriormente, la hifa secundaria infectiva formada ($n+n$) se acerca a la superficie de las plántulas (este período puede durar aproximadamente 20

días). Figura 6 4,5: en esta etapa la hifa del carbón penetra en el tejido de las plántulas y avanza inter/intracelularmente para colonizar el meristema apical de la planta de cebadilla permaneciendo latente hasta la diferenciación o formación del meristema reproductivo que originara la panoja (Figura 6 6); Figura 6 7 las espiguillas son colonizadas, se fragmentan y forman una masa carbonosa de teliosporas (**n+n**) que reemplazan a las semillas; los soros se rompen y las esporas son dispersadas o contaminan las semillas (Figura 6 8).



Fig .1. A. Plantas de *Bromus catharticus* sin carbón (*U. bullata*), **B.** Plantas con carbón de la panoja sobre *B. catharticus*.

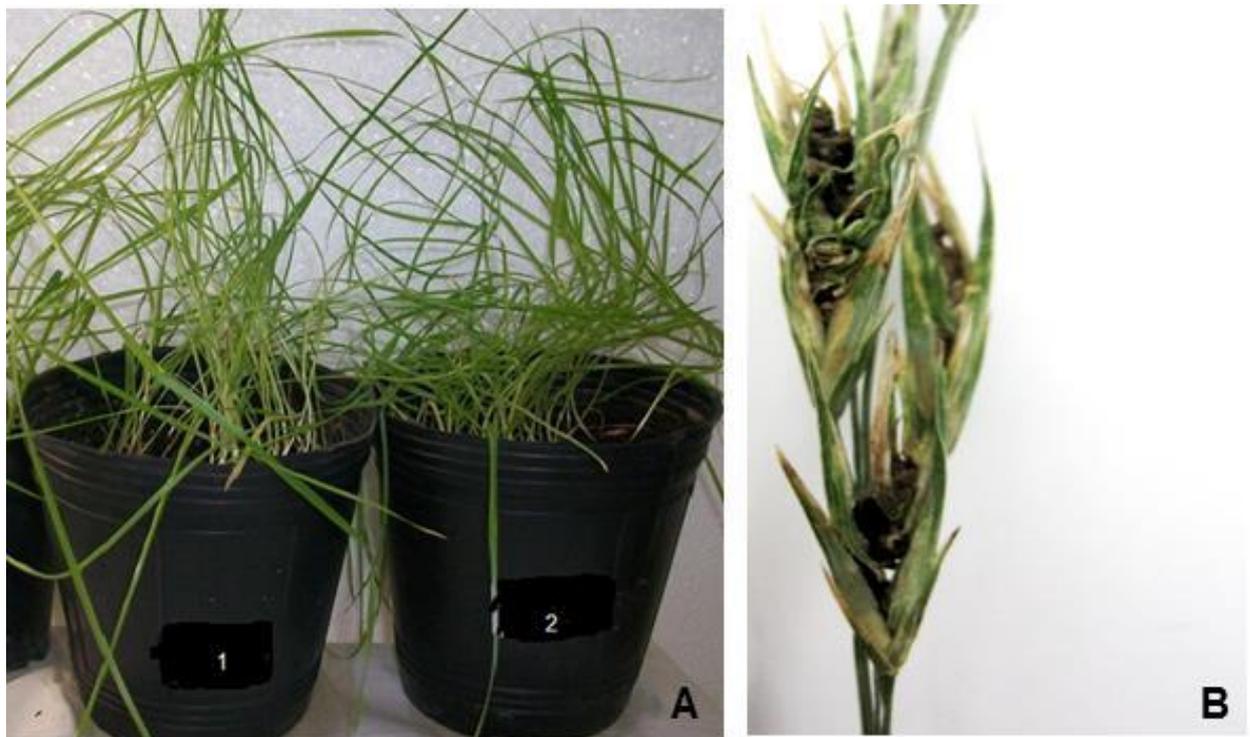


Fig 2. A1. Maceta1 testigo semillas sin inocular con *U. bullata*, **A2.** Maceta2 semillas inoculadas con *U. bullata*, **B.** Panoja con carbón procedente de semillas inoculadas.

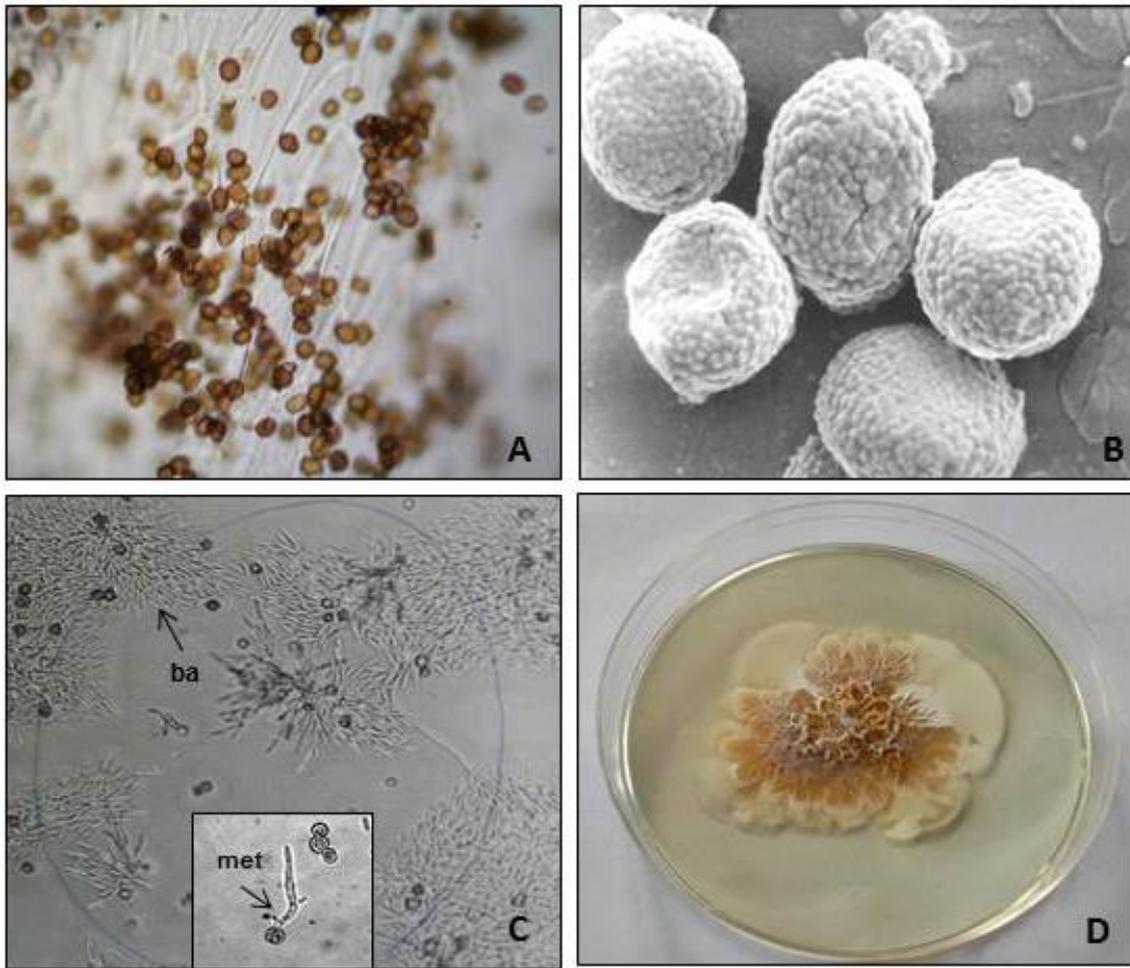


Fig 3. **A.** Teliosporas de *U. bullata* sobre el tejido del hospedante (microscópico óptico), **B.** Detalle de equinulencias sobre la superficie de la teliosporas (microscopia electronica de barrido), **C.** Teliosporas emitiendo el metabasidio (met) y formación de basidiosporas (ba), **D.** Colonia desarrollada en PDA de *U. bullata*.

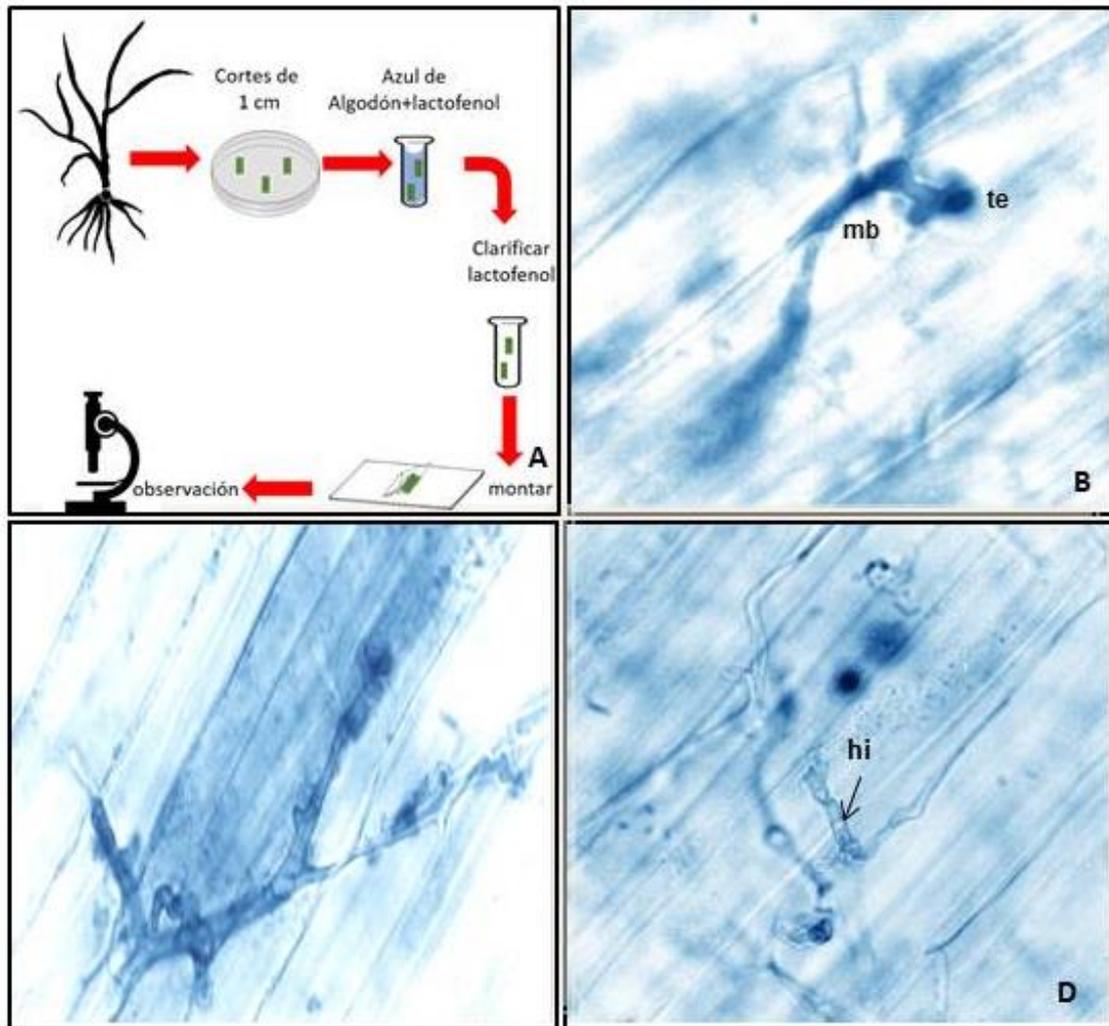


Fig. 4. A. Metodología de clarificación y tinción del material infectado. B Vista superficial en microscopía óptica del patógeno sobre la epidermis del hospedante. Germinación de la teliospora (te) de *U. bullata* y formación del metabasidio (mb) sobre la epidermis del hospedante. C- D. Penetración del micelio intracelular y colonización de los tejidos (hi).

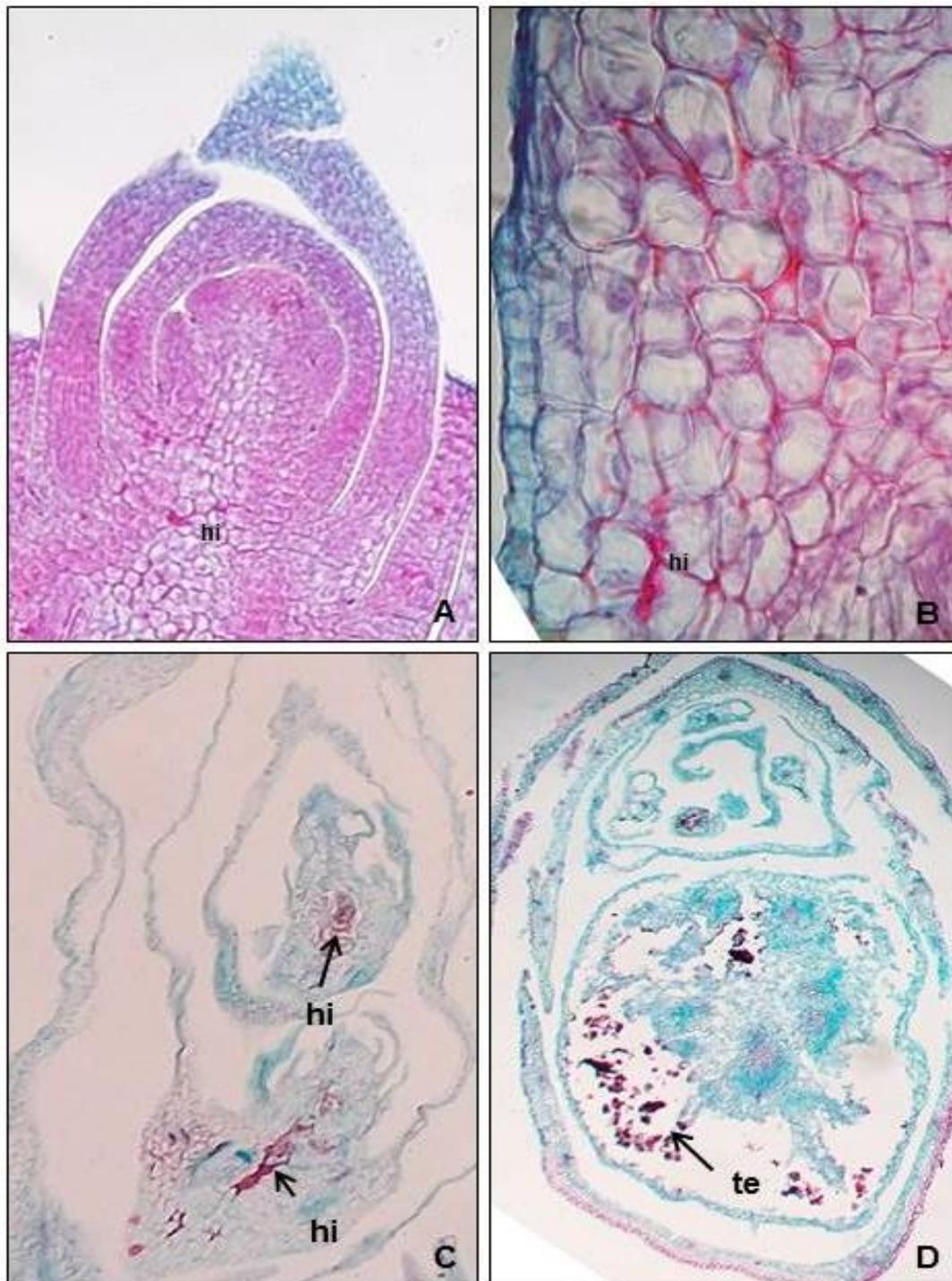


Fig. 5. Cortes histológicos de l meristema apical y espigilla de *B. catharticus* colonizado por *U. bullata*. **A.** Meristema vegetativo con hifas del hongo (hi). **B.** Detalle de las hifas intercelulares. **C–D.** Espiguilla infectada. **C.** Corte longitudinal con hifas del hongo en las estructuras reproductivas (hi). **D.** Corte transversal con formación de teliosporas (te) en la espiguilla .

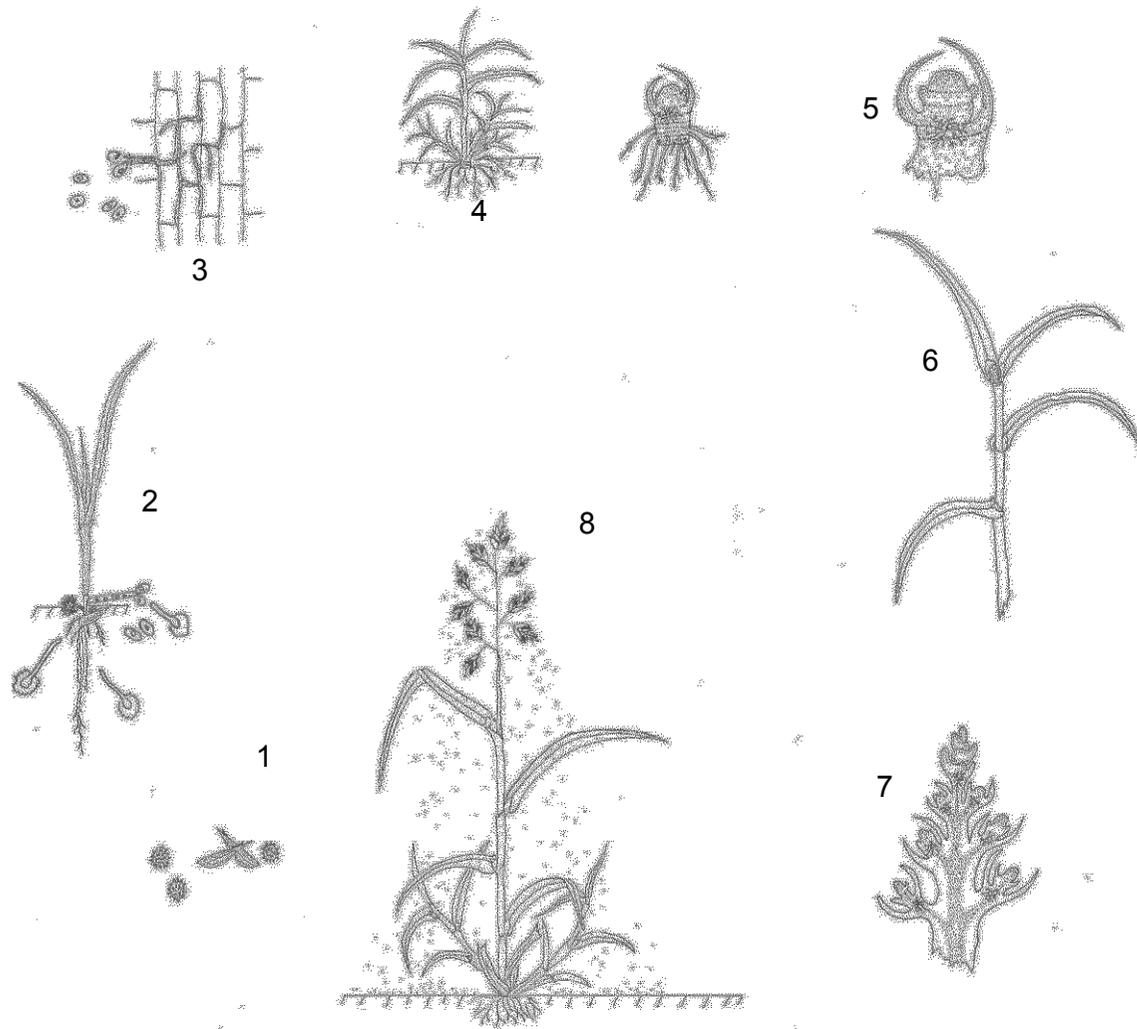


Fig 6. Ciclo de *Ustilago bullata*. **1.** Teliosporas en el suelo y semilla, **2.** Teliosporas generando el metabasidio, **3.** Hifa infectiva (n+n) colonizando el meristema vegetativo de la planta de cebadilla, **4.** Micelio del hongo localizado en el meristema apical, **5.** Diferenciación de meristema apical a reproductivo, **6-7** Meristema reproductivo colonizado por el hongo (espiquillas), la hifa se fragmenta y se formarán las teliosporas que serán liberadas en la emergencia de la panoja, **8.** Liberación de esporas.

CONCLUSIÓN

Las investigaciones realizadas sobre la biología y histopatología de *U. bullata* indican que este patógeno se localiza en el tejido apical e infecta a las panojas de cebadilla en forma parcial o total.

3-2 DETERMINACIÓN DE COMPORTAMIENTO Y VARIABILIDAD PATÓGENA DE *U. bullata* EN EL GENERO *Bromus*

INTRODUCCIÓN

En los EE.UU., Fischer (1940) verificó experimentalmente la existencia de genes para la resistencia, las formas fisiológicas y la capacidad de *cross-breeding* de *U. bullata* y *U. striiformis*. Kreizinger *et al.* (1947), establecieron diferentes reacciones de *U. bullata* en las especies del género *Bromus* que se encuentran en la montaña y las que crecen en la llanura; estas experiencias indicaron que las variedades y líneas resistentes de *Bromus* se podrían obtener por la infección artificial bajo condiciones controladas y en el campo. Además, 13 formas fisiológicas del patógeno fueron determinadas (Meiners *et al.* 1953). En Nueva Zelanda, Falloon (1976, 1979a,1979b) llevó a cabo estudios sobre la infección y el efecto de la *U. bullata* en *B. catharticus*. Además, Falloon *et al.* (1988), registraron los efectos del patógeno en la productividad de semilla de *B. willdenowii*.

En Argentina en investigaciones realizadas por Astiz Gassó (1983,1985) en la provincia de Buenos Aires se reportaron diferencias en el comportamiento de las especies del genero *Bromus* al patógeno bajo infecciones artificiales a campo. Durante el período 1996-1998 se realizaron experimentos a campo cuyo objetivo fue establecer la resistencia o tolerancia al carbón de la cebadilla. Se utilizaron para el ensayo líneas y 105 poblaciones de *B. catharticus* que fueron recolectadas en diferentes localidades de la provincia de Buenos Aires.

Los resultados de estas experiencias demostraron que *B. catharticus* era altamente susceptibles con valores entre 40-100% de ataque del patógeno (Astiz Gassó & Aulicino 1999). También en trabajos realizados en la provincia de La Pampa por Fernandez Pérez *et al.* (1994), registraron la existencia de variabilidad en el comportamiento del carbón de la cebadilla en especies del género *Bromus*.

Uno de los principales problemas de la cebadilla criolla es que los cultivares disponibles comercialmente derivan de *B. catharticus* por su aptitud agronómica (Maddaloni & Ferrari 2001), una de las forrajeras más utilizada en mezcla para pasturas artificiales. Entre las estrategias más accesibles para el control de este patógeno es el tratamiento de semillas con fungicidas.

OBJETIVOS

- Determinar la existencia de formas fisiológicas en poblaciones *U. bullata* en las especies del género *Bromus* y conocer la variabilidad genética del patógeno nos ayudarán a implementar nuevas herramientas para el manejo integrado de la enfermedad.
- Determinar la existencia variabilidad genética en el *Bromus* sp. para su incorporación en los planes de mejora genética de la especie frente al ataque del carbón *U. bullata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para esta experiencia se utilizaron semillas de diferentes especies del género de *Bromus*: *B. catharticus*, *B. parodii*, *B. brevis*, *B. auleticus* y *B. inermis*

cv *pombaszpuzta* que fueron suministrados por Instituto Fitotécnico de Sta. Catalina y Departamento de Genética de la Estación Experimental de Pergamino (INTA).

Las semillas fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, luego se dejaron secar al aire y a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) 24h antes de ser tratadas con el inóculo.

El origen del carbón de la cebadilla utilizado como inóculo para los ensayos: **1.** 5 poblaciones del carbón fueron recolectada en diferentes localidades (Tabla 1), **2.** Se confeccionó una mezcla de las 5 poblaciones del carbón.

Tabla 1: Fuentes de inóculo para ensayo a campo para la determinación de formas fisiológicas y de comportamiento de las especies *Bromus*.

LOCALIDADES	PROVINCIA
Pergamino (PE)	Buenos Aires
Tres Arroyo (TA)	Buenos Aires
Gowland (GO)	Buenos Aires
Llavalloí (LI)	Buenos Aires
General Roca (GR)	Rio Negro
Mezcla (PE,TA,GO,LI,GR)	5 poblaciones

La inoculación se realizó colocando las semillas en bolsitas de papel conteniendo las teliosporas del patógeno y agitando vigorosamente hasta lograr una concentración de 60-90 esporas/semillas. Esto se comprobó realizando recuentos de esporas con hematócmetro previos a la siembra,

mediante la técnica establecida por ISTA 1982 ficha de trabajo N° 53 para carbones en trigo. El procedimiento se realizó para cada población y mezcla.

Las muestras inoculadas se sembraron en parcelas experimentales de 1,5 m x 0,40 m en tres filas con una distancia de 0.20 m entre ellas. El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar. Las evaluaciones en el campo fueron realizados por conteos de panojas, registrando el porcentaje de infección basado en el número de panojas infectadas x 100 sobre el total de panojas observadas. Luego, se calculó el promedio de infección para los cuatro años. Para la determinación del nivel de resistencia / susceptibilidad se usó una escala arbitraria para carbones (Tabla 2).

Tabla 2: Escala arbitraria de grados resistencia/susceptibilidad para carbones.

ESCALA	GRADOS
Resistente (R)	0-5 %
Medianamente Resistente (MR)	6-10 %
Medianamente Suceptible (MS)	11-20 %
Susceptible (S)	20-100 %

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En trabajos previos realizados por Hirschhorn 1986 y Astiz Gassó 1994 se señaló la existencia de variabilidad genética del patógeno en la especie *B. catharticus* y se estableció la existencia de formas fisiológicas en las poblaciones *U. bullata*. En estudios que se realizaron durante el período 2006-2009 en ensayos a campo, permitieron determinar la existencia de 4 formas fisiológicas del carbón tal como se observa en la Figura 7. Los resultados fueron: **1.** Tres Arroyos; **2.** Pergamino y Llavallol; **3** Gowland; **4.** Gral. Roca.

Para proseguir sobre la temática de la mejora genética del género *Bromus* se emprendieron nuevos trabajos entre 2006-2009. En estos trabajos se incluyeron 5 especies de *Bromus* que fueron inoculadas artificialmente con diferentes poblaciones de *U. bullata*. Los resultados de nuestra investigación se encuentran registrados en la Tabla 3: **1.** *B. catharticus* y *B. parodi* fueron susceptible a todas las poblaciones; **2.** *B. brevis*, demostró una reacción resistente a población de Gowland, una reacción moderadamente resistente a Pergamino, Llavallol y la mezcla de poblaciones, una reacción moderadamente susceptible con la población de Tres Arroyos, y susceptible a la población de General Roca; **3.** *Bromus auleticus* y *B. inermis* cv *gombaszpuzta* fueron resistentes a todas las poblaciones y a la mezcla de *U. bullata*.

En experiencias realizadas sobre la especie *B. auleticus* por Vignale *et al.* (2009, 2010, 2013), se reportó la existencia de endófitos (**E+**) (*Neotyphodium pampeanum* y *N. tembladerae*) en las plantas que no se infectaban con *U. bullata* debido a la interacción antagónica entre los dos hongos. Para comprobar esta interacción negativa de la infección del carbón se aisló el endófito y se realizaron pruebas de laboratorio in vitro *endofito-U. bullata*. Como resultado de estos estudios se observó que el hongo inhibía la germinación de las teliosporas y/o producía alteraciones en la formación de las metabasidios no permitiendo desarrollo normal al *U. bullata*. En el caso particular de *B. catharticus* el endófito no se encuentra presente en la especie (**E-**) sobre una base de más 3000 observaciones efectuadas en plántulas de diferentes cultivares comerciales y poblaciones de la especie (Astiz Gassó datos sin publicar).

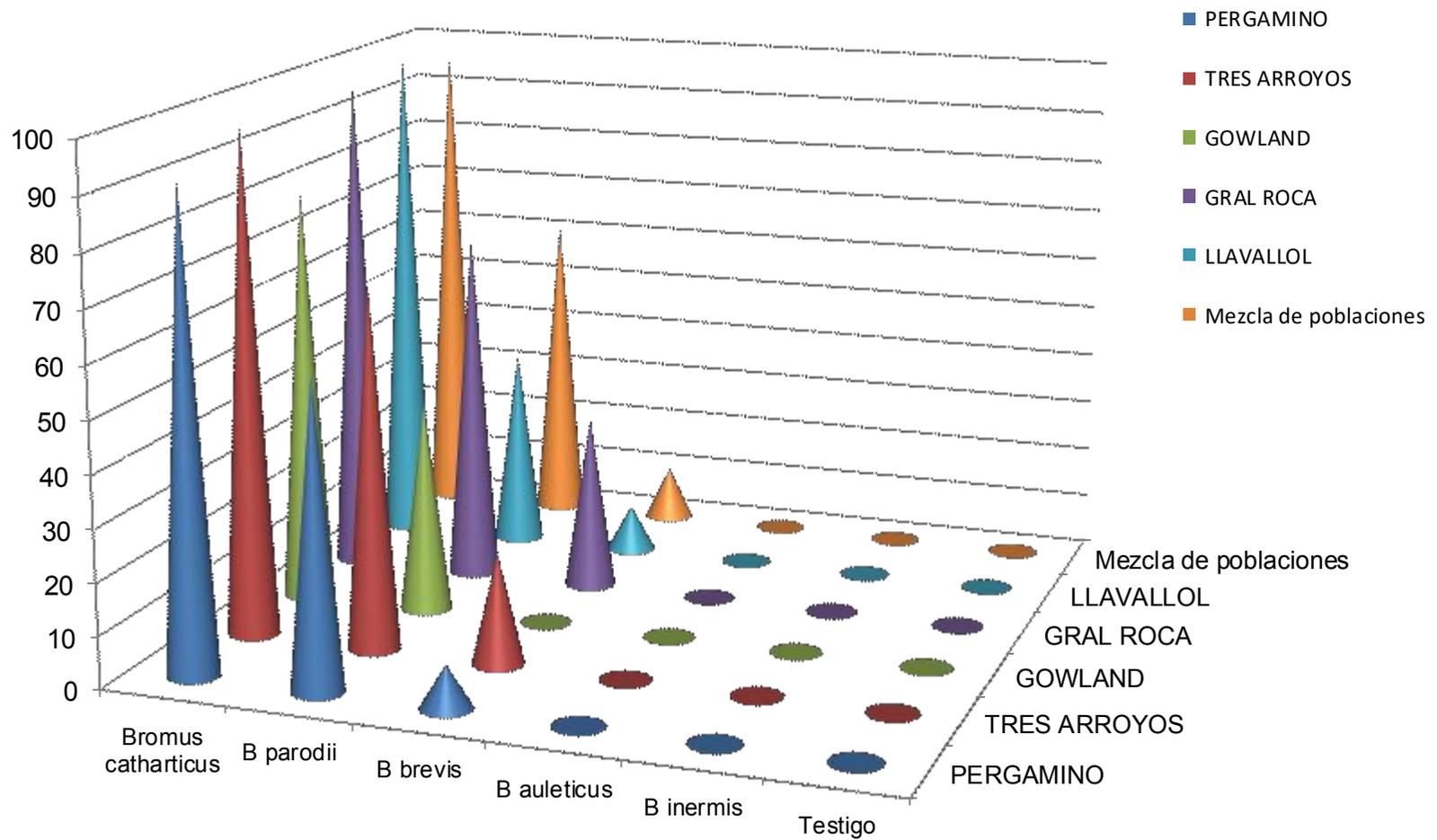


Fig 7. Ensayos de evaluación a campo de formas fisiológicas de *U. bullata* sobre especies del genero *Bromus*.

Tabla 3: Reacción del género *Bromus* a diferentes poblaciones de *U. bullata*

HOSPEDANTES	Aislamiento <i>Ustilago bullata</i>					
	Pergamino	Tres Arroyo	Gowland	Llavallol	Gral. Roca	Mezcla
Bromus catharticus	S	S	S	S	S	S
Bromus parodii	S	S	S	S	S	S
Bromus brevis	MR	MS	R	MR	S	MR
Bromus auleticus	R	R	R	R	R	R
B.inermis cv gombaszpuzta	R	R	R	R	R	R
Noninoculated check	0	0	0	0	0	0

Referencia: Resistente= 0.5 % R; 6-10% Moderadamente Resistente= MR; 10-20 % Moderadamente Susceptible= MS; 21-100% Susceptible= S

CONCLUSIONES

1. Se determinó la existencia en Argentina de cuatro formas fisiológicas de *U. bullata*.
2. Se estableció que las especies *B. catharticus* y *B. parodii* son hospedantes altamente susceptibles a *Ustilago bullata*.
3. No se halló resistencia genética en *B. cartharticus* al carbón de la cebadilla.
4. Se comprobó que la especie *B. brevis* es un hospedante diferencial del género *Bromus* para realizar investigaciones sobre la variabilidad patógena de *U. bullata*.
5. *B. auleticus* y *B. inermis* cv *gombaszpuzta* fueron las especies más resistentes a las poblaciones *U. bullata*.
6. *Bromus auleticus* posee un endófito (**E+**) que interactúa en forma antagónica para evitar la infección de *U. bullata*.
7. Las investigaciones efectuadas, nos permitirán establecer nuevas estrategias de manejo del carbón de la cebadilla.
8. Establecer un manejo integrado para el control del carbón de la panoja de la cebadilla nos permitió proseguir con nuevos ensayos.

3-3 MANEJO INTEGRADO PARA EL CONTROL DEL CARBÓN DE LA PANOJA

INTRODUCCIÓN

Como se mencionó anteriormente *Ustilago bullata* es un patógeno que infecta a las plantas de especies del género *Bromus* en el estadio de plántula y causa una enfermedad sistémica. En la revisión bibliográfica realizada sobre tratamientos en semillas de cereales para el control de carbones los principios activos más usados son: 1. **Preventivos**: Thiram, Captan; 2. **Curativos o sistémicos**: Carboxin, Carbendaxin, Ipconazole, Tebuconazole entre otros; 3.- combinación de 2 (preventivo y curativo) y en algunos casos son citados para ser aplicados en forrajeras entre ella la cebadilla (Arregui & Puricelli 2013, Guía de Productos Fitosanitarios 2007, Tomas 2011).

3-3-1 DIFERENTES NIVELES DE INFESTACION Y DOSIS DE TERÁPICOS PARA EL CONTROL DEL CARBÓN DE LA CEBADILLA

INTRODUCCIÓN

Los terapicos que se encuentran registrados en la Guía de Productos Fitosanitarios 2007 fueron diseñados para los tratamientos en semilla en cereales (trigo y cebada) para el control de carbones (*Tilletia* sp. y *Ustilago* sp.). Pero las semillas de cebadilla poseen características de textura y estructuras que las diferencian de los cereales como por ejemplo, se encuentran cubiertas total o parcialmente por las glumas. Otro inconveniente es la preparación de los

caldos, por falta de conocimiento por no realizar ensayos específicos sobre esta especie forrajera.

Por este motivo, y como consecuencia de un Servicio a Terceros para la Empresa Gentos S.A. dedicada a la producción de semillas forrajeras, se efectuaron experimentos de laboratorio y a campo en los cuales se probaron 20 combinaciones de terapicos y diferentes dosis para el control del carbón de la cebadilla. Los resultados registrados de estos ensayos nos proporcionaron información valiosa para establecer los objetivos del presente esquema del manejo del integrado del carbón de la cebadilla en el género *Bromus* (Astiz Gassó 2005-2008 Informes Técnicos de la Empresa Gentos S.A.).

Dada la escasa información sobre los niveles de infestación de la semilla de cebadilla por el carbón, para nuestros experimentos a campo se utilizó el parámetro establecido por ISTA (1982) para el carbón cubierto (*Tilletia* sp.). En un lote de semillas de trigo con 30-100 teliosporas/semilla se recomienda el tratamiento con terapicos, valores mayores de carga de esporas “se desecha el lote”. Pero es necesario estimar el umbral del patógeno en la semilla de *Bromus* en el cual será efectivo y eficiente el uso de fungicidas para su control.

OBJETIVOS

- Establecer los niveles de infestación del carbón de la cebadilla en semilla de *B. catharticus* para lograr la mayor efectividad y eficacia en el uso de terapicos para el control químico de la enfermedad.
- Establecer la dosis de terapicos eficaz y eficiente para el control del carbón de la cebadilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas del cultivar Copetona fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, luego se dejaron secar al aire y a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) 24 h antes de ser tratadas con el inóculo y terápicas.

La inoculación se realizó colocando las semillas en bolsitas de papel conteniendo las teliosporas del patógeno y agitando vigorosamente hasta lograr una concentración para tres niveles de infestación (Tabla 4). Esto se comprobó realizando recuentos de esporas con hematocimetro utilizando la técnica establecida por ISTA (1982) ficha de trabajo N° 53 para carbones en trigo.

Tabla 4: Niveles de infestación artificial en la semilla de cebadilla

NIVELES DE INFESTACIÓN	ESPORAS /SEMILLAS
Nivel 1 (N1)	650 esporas/semilla
Nivel 2 (N2)	300 esporas/semilla
Nivel 3 (N3)	50 esporas/semilla

En el caso de los terápicas recomendados para carbón de la cebadilla, se consideraron algunos productos empleados en semillas de cereales de invierno para el control de carbones, productos preventivos y/o sistémicos (Guía de Productos Fitosanitarios 2007). Las dosis no son eficaces ni eficientes porque existen problemas de escape con ataque severo del carbón que generan reclamos a las Empresas de Agroquímicos. Para resolver este inconveniente se realizaron ensayos a campo con dos dosis (Tabla 5). La dosis **D1** es la recomendada para cereales (trigo, cebada) y la dosis **D2** para posible

control del carbón de la cebadilla teniendo en cuenta que la semilla tiene problemas de calidad y sanidad (Astiz Gassó *et al* 2009b).

Tabla 5: Dosis de terapicos para el ensayo a campo

NUMERO	G. DE PRINCIPIO ACTIVO	DOSIS	DOSIS COMERCIAL
TV-D1	Thiram 18,75g / Carbendazim 18,75 csp	1*	400 cm ³ /100 Kg
TV-D2	Thiram 18,75g / Carbendazim 18,75 csp	2**	800 cm ³ /100 Kg
TC-D1	Thiram 20 % / Carboxin 20% csp	1	500 cm ³ /100 Kg
TC-D2	Thiram 20 % / Carboxin 20% csp	2	750 cm ³ /100 Kg
TCR-D1	Ipconazole 2%	1	75 cm ³ /100 Kg
TCR-D2	Ipconazole 2%	2	150 cm ³ /100 Kg

Referencias: * dosis para el control de carbonos (*Tilletia* sp. *Ustilago tritici*, *Ustilago nuda*, en Trigo;

** dosis de prueba carbón de la cebadilla (*Ustilago bullata*)

Para los ensayos a campo que se realizaron durante el período 2006-2009, las muestras de semillas inoculadas y tratadas con los diferentes terapicos se sembraron en parcelas de 1,5 mx 0,40 m en tres filas con una distancia de 0.20 m entre ellas. El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar. Las evaluaciones en el campo fueron realizados por conteos de panojas, registrando la incidencia dada por el porcentaje de infección basado en el número de panojas infectadas x 100 sobre el total de panojas observadas. Luego, se calculó el promedio de infección para los cuatro años. Para la determinación del nivel de resistencia/susceptibilidad se usó una escala arbitraria para carbonos (Tabla 2). Los resultados de porcentajes de espigas enfermas fueron transformados para realizar los análisis estadísticos. El programa que se usó para el análisis ANOVA fue Statistix 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 8, se registran los resultados con diferencias altamente significativas en la interacción entre los niveles de infestación del carbón-dosis de terapicos. Los terapicos fueron eficaces y eficientes con el nivel de infestación **N3** (≤ 50 teliosporas/semilla). La dosis **D1** y **D2** fueron altamente significativas para el control del carbón, pero la **D1** y **D2** registran escapes al ataque del carbón **TV-D1**, y **TCR-D1** para los niveles **N1** y **N2** de infestación; **TV-D2** y **TCR-D1** con infestación **N1** y **N2** que en el campo podrían tener inconvenientes para la resiembra natural de la cebadilla. Además, se observaron efectos negativos de fitotoxicidad producidas por agroquímicos con triple dosis algunos principios activos en plántulas de cebadilla de 21 días de desarrollo tales como enanismo, clorosis y atrofia de raíces (Figura 9).

En resumen: Las semillas de cebadilla caen al suelo y cuando germinan se encuentran con las teliosporas del patógeno cuya fuente de inóculo puede ser: **a.** preexistente de infecciones anteriores **b.** Infecciones de la misma temporada procedentes de plantas enfermas. Las semillas sin protección se infestan y aumenta el inóculo cada año en el suelo, con el inconveniente de pérdida de plantas y producción de semilla en el campo (Astiz Gassó datos sin publicar). Además de aumentar la posibilidad de ingestas del ganado de planta enfermas con riesgos de producir toxicidad en los animales (Parada 1988, Sri Deva F. 2008).

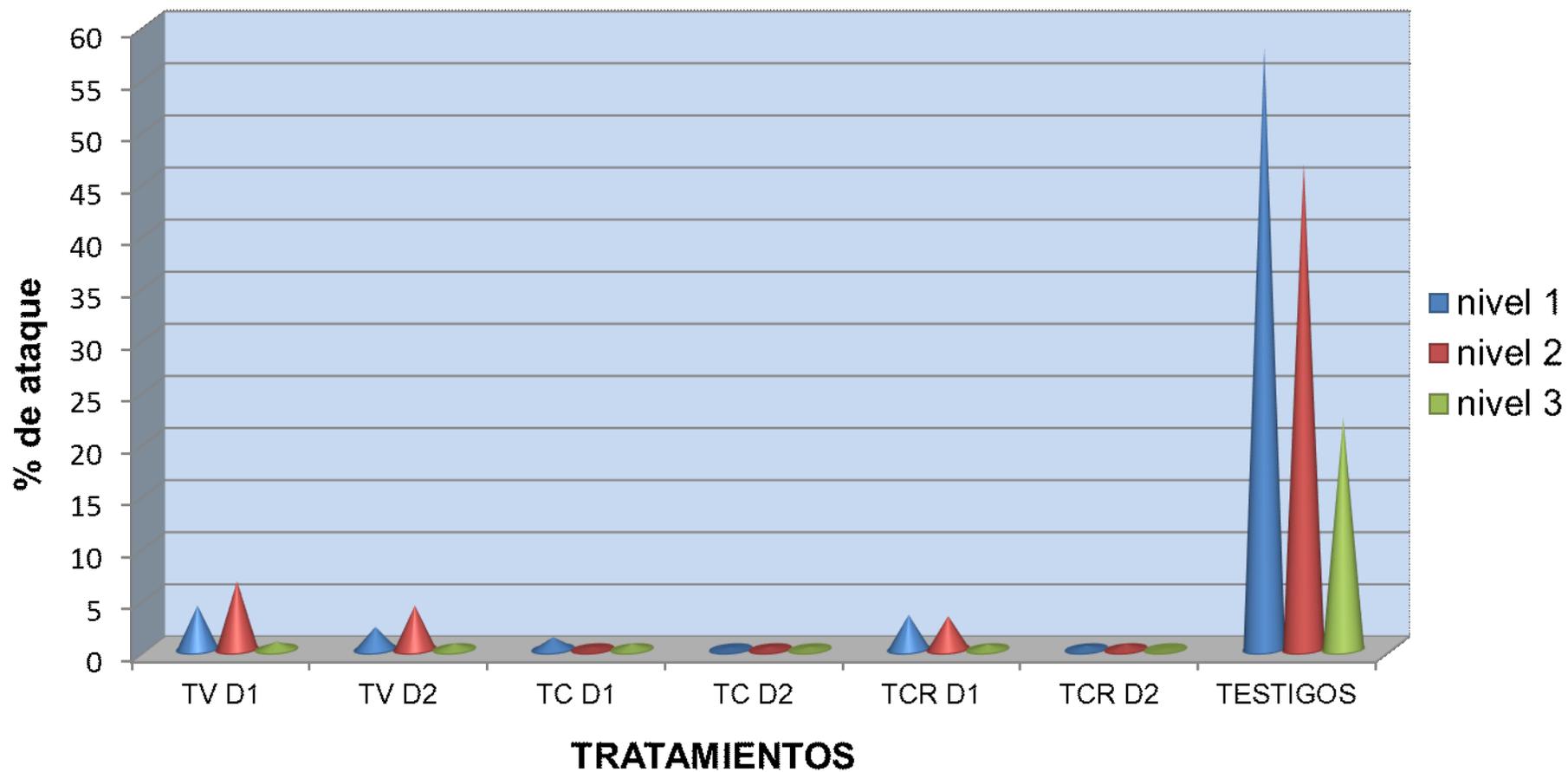


Figura 8. Evaluación a campo de fungicidas para el control del carbón de la panoja de cebadilla con diferentes dosis del terapico y niveles de infestación del carbón.

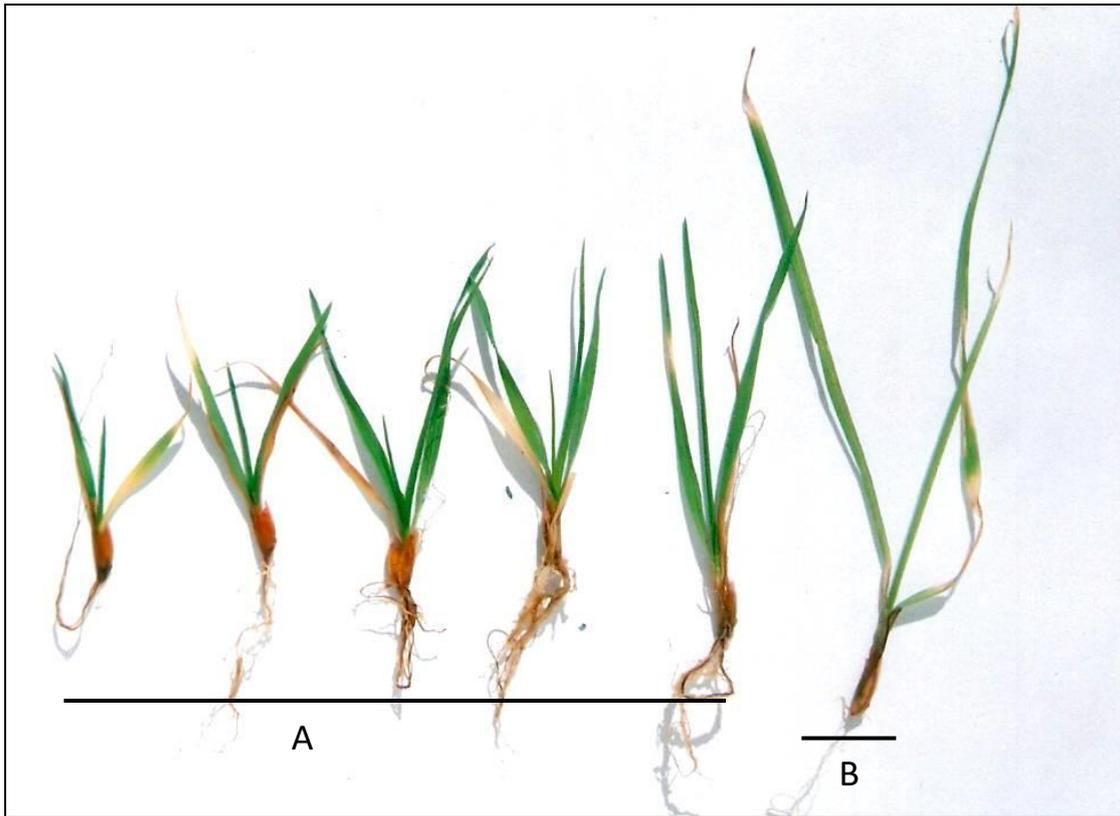


Figura 9. Fitotoxicidad producidas por agroquímicos con triple dosis del terapicos en plántulas de cebadilla de 21 días de desarrollo: **A.** enanismo, atrofia de raíces, clorosis, **B.** clorosis y atrofia de raíces.

CONCLUSIONES

- Niveles de infestación de ≤ 50 teliosporas/semilla es el **Umbral** a considerar en el momento de seleccionar lotes de semilla de cebadilla y recomendar el tratamiento con terapicos para siembra. En este trabajo se obtuvieron resultados preliminares que permitirán continuar con la evaluación de nuevas alternativas de grupos químicos.
- Los controles químicos sobre *U. bullata* dependen de los principios activos que contienen los formulados de los fungicidas y deben ser evaluados con ensayos a campo para lograr la mayor eficiencia y eficacia para el manejo de la enfermedad.

3-3-2 ACCIÓN ANTAGÓNICA DE *Trichoderma* spp. SOBRE *Ustilago bullata*.

INTRODUCCION

Los agentes de control biológico constituyen una alternativa interesante que permite disminuir la contaminación resultante del uso indiscriminado de agroquímicos (Handelsman & Stabb 1996). Entre los antagonistas más estudiados se encuentran varias especies del género *Trichoderma* sp. que son utilizadas con éxito para el biocontrol de enfermedades de plantas cultivadas. En el caso de los carbones se ha demostrado que *T. harzianum* produce inhibición de la germinación de las teliosporas de *Tilletia leavis* similares resultados de registraron cuando se ensayaron *in vitro* con *Pseudomona fluorrencens* (McManus *et al.* 1993). También se comprobó que usando filtrados de cepas de las especies de *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp., estos fueron efectivos produciendo inhibición de la germinación de teliosporas, lisis, deformación y supresión del desarrollo micelial en las especies *U. segetum tritici* y *Neovossia indica*. En el carbón de la caña de azúcar (*U. scitaminea*) se realizaron pruebas con filtrados de biocontroladores sobre las teliosporas del patógeno y se produjo la inhibición de la germinación (Martinez *et al.* 1998).

OBJETIVOS

- Deteminar si aislamientos de *Trichoderma* spp. de la rizósfera de plantas de *B. catharticus* son efectivas para el biocontrol de *U.bullata*.
- Seleccionar cepas nativas de *Trichoderma* sp.como una alternativa para el manejo integrado de *U. bullata* en *Bromus* sp..

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Ustilago bullata*

Las esporas del carbón de la cebadilla se cosecharon a partir de plantas que se hallaron infectadas naturalmente en el campo experimental del Instituto Fitotécnico Santa Catalina, (F.C.A.yF, UNLP). Para la obtención de cultivos axénicos las teliosporas fueron extraídas de las panojas de la cebadilla y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 3 minutos, luego se enjuagaron tres veces con agua estéril. Las teliosporas descontaminadas fueron sembradas en cajas de Petri sobre papa-dextrosa-agar al 2% (PDA) y se incubaron en estufa de cultivos a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días en oscuridad. Los cultivos obtenidos se conservaron en refrigerador a 10°C para ser utilizados en ensayos in vitro de antagonismos con *Trichoderma* sp.-

Aislamiento de cepas de *Trichoderma*

En este ensayo se utilizó un lote de semillas de cebadilla criolla del cv Tango que fueron inoculadas con esporas *U. bullata* mediante la técnica de espolvoreo sobre las mismas que posteriormente fueron sembradas en el campo. Cuando las plantas cumplieron su ciclo fisiológico de formación de panoja se comenzó a evaluar la presencia o no de panojas enfermas con el patógeno. Las plantas que no fueron atacadas o no presentaron signos de la enfermedad se descalzaron con las raíces y con suelo adherido a las mismas. Las muestras se dejaron secar al aire, y posteriormente fue desprendido el suelo procediéndose a triturarlo con mortero y tamizado varias veces con tamices de diferentes diámetros de manera que las partículas de suelo se

redujo a un polvo muy fino. Se tomó 1 g de la muestra y se le adiciona 100 ml de agua destilada estéril y para homogenizar se agitó durante 20 minutos en agitador magnético. Se procedió a realizar diluciones progresivas tomando una alícuota de 1 ml de suspensión para mezclar con 9 ml de agua destilada estéril hasta obtener 10^{-4} - 10^{-6} . Estas diluciones fueron agitadas con Vortex e inmediatamente se sembraron en placas de Petri con medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* sp. (Dhingra and Sinclair 1994) a razón de 1 ml/muestra y por dilución con 5 repeticiones. Se incubaron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días. Los aislamientos se realizaron sobre el medio de cultivo de Agar Extracto de Malta al 2% y PGA para su identificación taxonómica (Rifai 1969) y la confirmación de las especies fue realizada por BIAGRO S.A.

Ensayo in vitro de los antagonistas

Para realizar los cultivos duales se utilizó las cepas de *U. bullata* obtenidos en el ítems anterior las que fueron sembradas en caja de Petri con medio de cultivo de PDA e incubadas a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en estufa de cultivo en oscuridad. Al cabo de 15 días se sembraron las cepas de *Trichoderma* colocando un cilindro de agar de 5 mm de diámetro a 30 mm del margen de la colonia desarrollada de *U. bullata*. Después de 10 días se evaluó en base a los parámetros de clasificación que se establecieron según escala de la Tabla 6.

Tabla 6: Parámetros de evaluación de antagonismo con *Trichoderma* sp. con *U. bullata*.

ESCALA	Baja	Media	Alta	Muy Alta
Densidad de micelio	1	2	3	-
Cobertura de la caja	1	2	3	4
Formación de conidios	1	2	3	-

REFERENCIAS DE LA TABLA 6

Densidad del micelio (DM):

- Baja (1): Cuando el micelio es laxo o poco abundante.
- Media (2): Cuando el micelio tiene un desarrollo intermedio.
- Alta (3): Cuando el micelio es abundante y apretado.

Cobertura del micelio en la caja (CC):

- Baja (1): El micelio cubre menos del 50% de la superficie de la caja.
- Media (2): El micelio cubre entre 50-75 % de la superficie de la caja.
- Alta (3): El micelio cubre entre 75-90 % de la superficie de la caja.
- Muy Alta (4): El micelio cubre entre 90-100 % de la superficie de la caja.

Formación de conidios de *Trichoderma* (FC):

- Baja (1): El micelio no forma conidios o su formación es reducida a un sector.
- Media (2): El micelio presenta un desarrollo intermedio con una distribución en anillos.
- Alta (3): Cuando la formación de conidios es abundante y visible en toda la colonia.

Tabla 7: Dosis de terapico y formulado biológico Biagro TL®

G. DE PRINCIPIO ACTIVO	PRODUCTOS
Ipconazole 2% + <i>U. bullata</i>	150 cc/q semilla
Thiram 20% + Carboxin 20% + <i>U. bullata</i>	750 cc/q semilla
Thiram 20% + Carbendazin 20% + <i>U. bullata</i>	800 cc/q semilla
Biagro TL + <i>U. bullata</i>	200 ml/Kg semilla
Control (<i>U. bullata</i>)	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los aislamientos de cepas de *Trichoderma* que se obtuvieron de plantas sanas de cebadilla que no presentaron signos del patógeno (*U. bullata*) 28 fueron de la especie *T. harzianum* y una cepa de *T. polysporium*. De las 29 cepas de *Trichoderma* que se ensayaron aproximadamente el 35 % fueron eficientes al comportamiento antagónico frente a *U. bullata*. En la Figura 10, se observa como las cepas de *Trichoderma* inhiben el crecimiento a la cepa de *U. bullata*. En la Tabla 6, se encuentran los resultados de la interacción *Trichoderma-U. bullata* y para pruebas del formulado biológico las cepas

seleccionadas fueron: **SC26, SC29, SC39, SC154, SC160, SC161, SC165, SC178, SC180**. Resultados similares fueron registrados sobre cepas del carbón cubierto del trigo (*Tilletia laevis*) por Astiz Gassó *et al.* 2000.

Para producir el formulado biológico (2006-2009) se realizó un convenio de vinculación Tecnológica entre Instituto Fitotécnico Santa Catalina, F.C.A.yF UNLP y Empresa BIAGRO S.A.

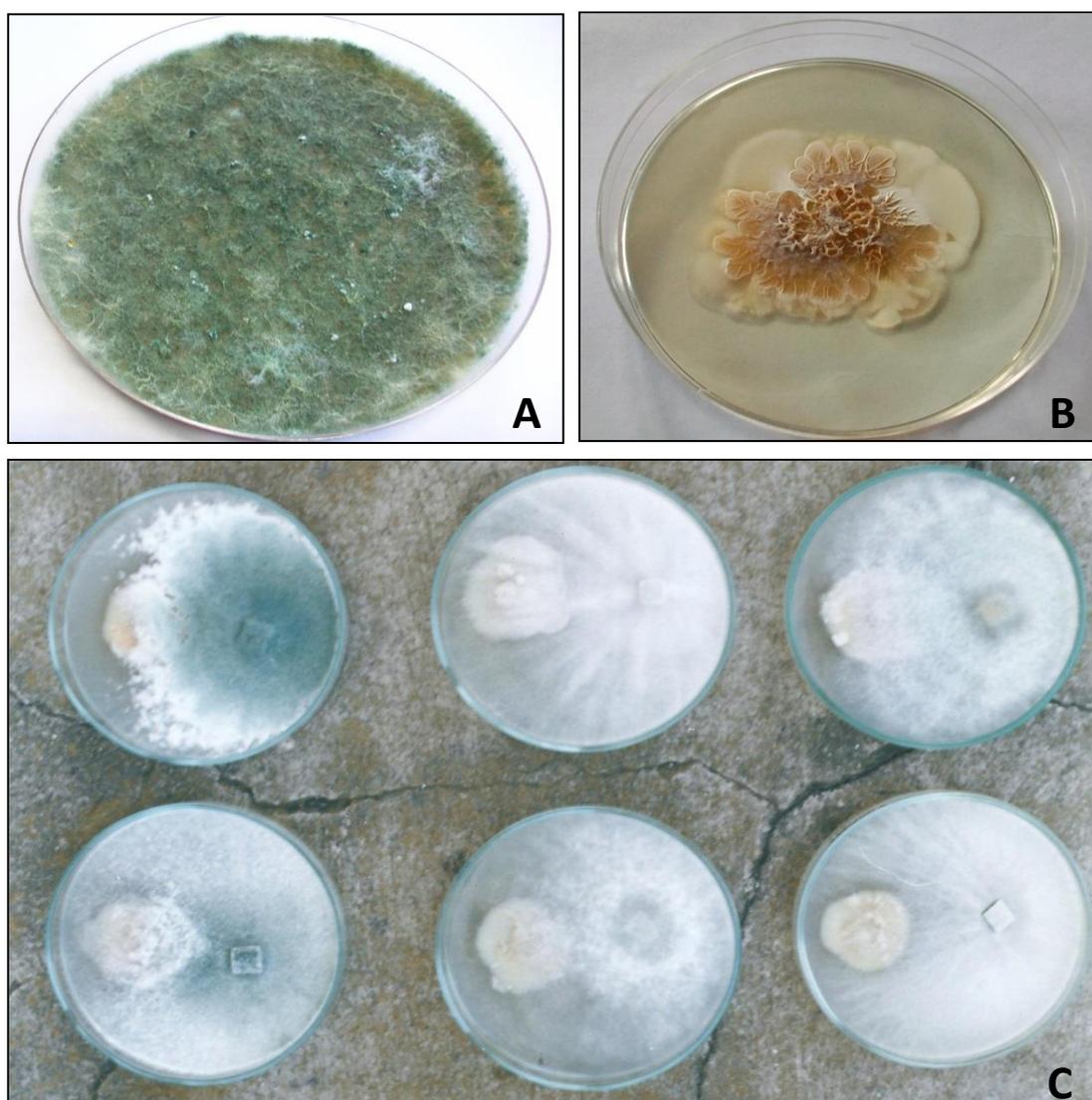


Figura 10. A. Cepa de *Trichoderma* B. Cepa de *U. bullata*, C. Interacción entre cepa *U. bullata* (Ub) -*Trichoderma* sp. (tri),

Tabla 8: Resultados de las interacciones *U.bullata*-*Trichoderma* sp

CEPA	ASLAMIENTO	ESPECIE	DM*	CC**	FC***
1	SC20	<i>T. harzianum</i>	1	4	1
2	SC26	<i>T. harzianum</i>	3	4	2
3	SC148	<i>T. harzianum</i>	3	3	2
4	SC157	<i>T. harzianum</i>	2	4	2
5	SC158	<i>T. polysporium</i>	2	3	1
6	SC166	<i>T. harzianum</i>	2	2	2
7	SC170	<i>T. harzianum</i>	1	3	1
	SC178	<i>T. harzianum</i>	2	4	3
9	SC169	<i>T. harzianum</i>	3	3	2
10	SC159	<i>T. sp</i>	2	3	2
11	SC167	<i>T. sp</i>	2	3	3
12	SC168	<i>T. sp</i>	3	2	2
13	SC155	<i>T. sp</i>	2	3	2
14	SC24	<i>T. sp</i>	2	2	2
15	SC152	<i>T. sp</i>	2	3	2
16	SC88	<i>T. sp</i>	1	3	2
17	SC156	<i>T. sp</i>	2	2	2
18	SC29	<i>T. sp</i>	3	4	3
19	SC39	<i>T. sp</i>	2	4	4
20	SC64	<i>T. sp</i>	2	1	3

21	SC98	<i>T. sp</i>	3	4	2
22	SC153	<i>T. sp</i>	2	3	1
23	SC154	<i>T. sp</i>	3	3	3
24	SC160	<i>T. sp</i>	3	4	2
25	SC161	<i>T. sp</i>	4	3	3
26	SC163	<i>T. sp</i>	2	2	2
27	SC165	<i>T. sp</i>	3	3	3
28	SC179	<i>T. sp</i>	1	3	2
29	SC180	<i>T. sp</i>	4	3	3

Referencias:

* DM: densidad del micelio

** CC: cobertura del micelio en la caja

*** FC: formación de conidios

CONCLUSIONES

1. Las cepas aisladas de *Trichoderma harzianun* fueron eficientes en la inhibición in vitro de *Ustilago bullata*.
2. Los resultados obtenidos nos permitieron proseguir con experimentos de terapicos y diseño de un formulado biológico para el manejo integrado de *U. bullata*.

3-3-3 EXPERIMENTOS CON TERÁPICOS Y FORMULADO BIOLÓGICO PARA EL MANEJO INTEGRADO DE *U. bullata*.

INTRODUCCIÓN

Por falta de información sobre la búsqueda de controles y manejo eficaz al carbón de la cebadilla se han ensayado a campo con tres fungicidas químicos que se utilizan en carbonos de los cereales y un formulado biológico en base a *Trichoderma* spp.

OBJETIVOS

- Determinar si es posible la aplicación conjunta o cotratamientos de terapico-biocontrolador para el manejo del carbón de la cebadilla.
- Comprobar la efectividad y eficiencia de fungicidas químicos y un formulado biológico en el control del carbón *Ustilago bullata* en cebadilla criolla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo a campo con Terápicos y formulado registrado como Biológico Biagro TL®

La implantación del ensayo se realizó en el campo del Instituto Fitotécnico Santa Catalina en la provincia de Buenos Aires. Se utilizó cebadilla criolla cv.Copetona infestadas naturalmente con 40 teliosporas/semilla, cuyo recuento se realizó con hematocímetro.

El ensayo fue conducido en microparcelas de 3m x 0.8m, de cuatro líneas de siembra a 0.2m con superficie útil de 0.4m². Se sembró a razón de 10kg/ha con 66 semillas viables por m².

Las dosis de los terapicos se encuentran registradas en la Tabla 9 y para el producto biológico su uso fue especificado por el fabricante de p.a Biagro TL® a razón de 200ml/100Kg de semilla con un recuento de 1x10⁶ ufc/semilla de acuerdo a ensayos de germinación previos y testigo sin tratar (Astiz Gasso *et al.* 2009a).

Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones. Los resultados de porcentajes de espigas enfermas fueron transformados para realizar los análisis estadísticos. El programa que se usó para el análisis ANOVA fue Statistix 8.

Tabla 9: Combinación de terapicos y formulado biológico Biagro TL®

Tratamientos	g. de principio activo	Dosis	Productos
Trat-1	Carboxin 20% + Thiram20% + Biagro TL®	1	500 cc/q semilla
Trat-2	Carboxin 20% + Thiram20% + Biagro TL®	2	750 cc/q semilla
Trat-3	Ipconazole 2% + Biagro TL®	1	75 cc/q semilla
Trat-4	Ipconazole 2% + Biagro TL®	2	150 cc/q semilla
Trat-5- control	Biagro TL®	--	200ml/kg semilla

Ensayo de laboratorio in vitro con Terápico-Biagro TL®

Se utilizó para este ensayo semillas de cebadilla cv Copetona las que trataron a razón de 100 g de semilla /terapicos con las dosis descriptas en la Tabla 8. Las semillas se dejaron secar por un periodo de 24 h, luego se aplicó sobre la semilla Biagro TL® con adherente y la dosificación fue especificada

por el fabricante (Tabla 8); posterior al tratamiento con el formulado biológico se dejó secar por un período 12 h.

Se realizaron 4 tratamientos y un testigo sin aplicación del terapico. La evaluación se realizó cada 7 días durante 21 días: **T0, T7, T14, T21**- Se consideró **T0** a las 12 h posteriores al tratamiento con Biagro TL tanto para las semillas tratadas como testigo. La siembra se ejecutó in vitro en cajas de Petri con medio semiselectivo para *Trichoderma* (Papavizas 1982). La evaluación se hizo en base al recuento de unidades formadoras de colonia (**UFC**). De cada lote de semillas tratadas y testigo se extrajeron 100 semillas/tratamiento. La siembra in vitro se realizó según protocolo de la Empresa BIAGRO S.A las etapas del ensayo se observan el esquema de la Figura 11 que responde a un protocolo general de determinación de viabilidad/supervivencia.

PROTOCOLO BIAGRO S.A.

1. Se coloca la muestra de 100 semillas en Erlenmeyers de 250 ml + 100 ml (agua destilada estéril+ 0,1% de Tween 80).
2. El Erlenmeyer se coloca en agitador magnético y se agita durante 5 minutos a 450 rpm.
3. Transferir 1ml de la solución 10^{-1} a un tubo conteniendo 9 ml de solución (agua destilada estéril+ 0,1% de Tween 80).
4. Repetir el ítems 3 hasta 6 diluciones seriadas y sembrar las diluciones 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} .
5. Transferir de cada dilución una alícuota de 0,1 ml con ayuda de una micropipeta a tres cajas (tripicado) por tratamiento y testigo con medio semiselectivo.

6. Distribuir uniformemente en cada caja con ayuda de una espátula de Drigalsky esterilizada.
7. Incubar a 25 ± 2 °C en oscuridad por 7 días.
8. Hacer recuento de número de UFC a los 7 días utilizando aquellas placas que contengan entre 10 y 100 colonias.
9. Aplicar la formula: número de colonias x factor de dilución x 10^* =
UFC/ml

EVALUACION DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS CONIDIOS IN VITRO EN UN MEDIO SEMI-SELECTIVO EN TIEMPOS (T0,T7,T14,T21/DÍAS)

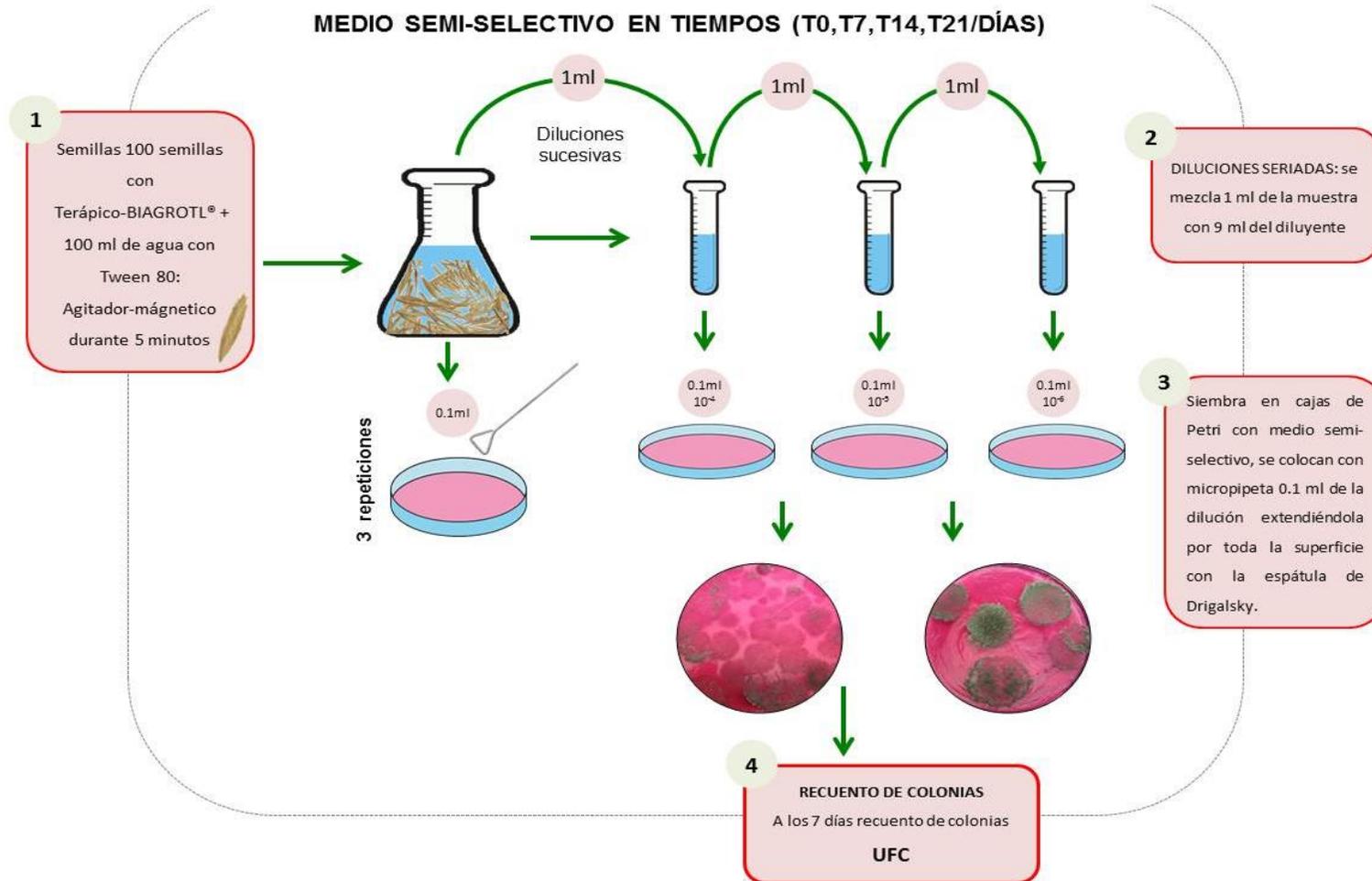


Figura 11. Evaluación de la supervivencia de los conidios *in vitro* en un medio semi-selectivo en tiempos (t0,t7,t14,t21/días).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 12, se observa una reducción altamente significativa del 40% del patógeno *U. bullata* comparado con el testigo. Resultados similares fueron registrados en *U. segetum var tritici* del trigo cuando utilizaron un biocontrolador de la enfermedad en condiciones de campo (Anuja Gupta 2000, Singh *et al.* 1996)

En la Figura 13, se evidenció que después de 12 horas en **T0** no hubo diferencias significativas de **UFC** en semillas con los fungicidas, con respecto al testigo y se observó un decrecimiento de UFC a partir **T7** hasta **T21**. Esto evidencia que las semillas tratadas con BIAGRO TL® con o sin terapico deben ser sembradas dentro de ese límite de tiempo (**T0** y **T7**). Otras investigaciones confirman que en ensayos realizados con Terápicos-*Trichoderma* para el control y manejo *U. segetum var tritici*, *Tilletia leavis* y *U. tritici* del trigo no se registraron inconvenientes ni efectos negativos entre el fungicida y el biocontrolador y que además fueron eficaces y eficientes en el control de los carbones del trigo (Anuja & Maaheshwari 2000, Mina 2015). Pero existen trabajos que citan efectos negativos (inhibición de esporulación, germinación de conidios, disminución de actividad enzimática, etc) de los agroquímicos sobre diferentes cepas de *Trichoderma* spp. (Martínez *et al.* 2013). Estas investigaciones nos evidencian la necesidad de realizar ensayos de compatibilidad de los agentes de control biológico con productos agroquímicos, para realizar un eficiente y eficaz manejo integrado de las enfermedades.

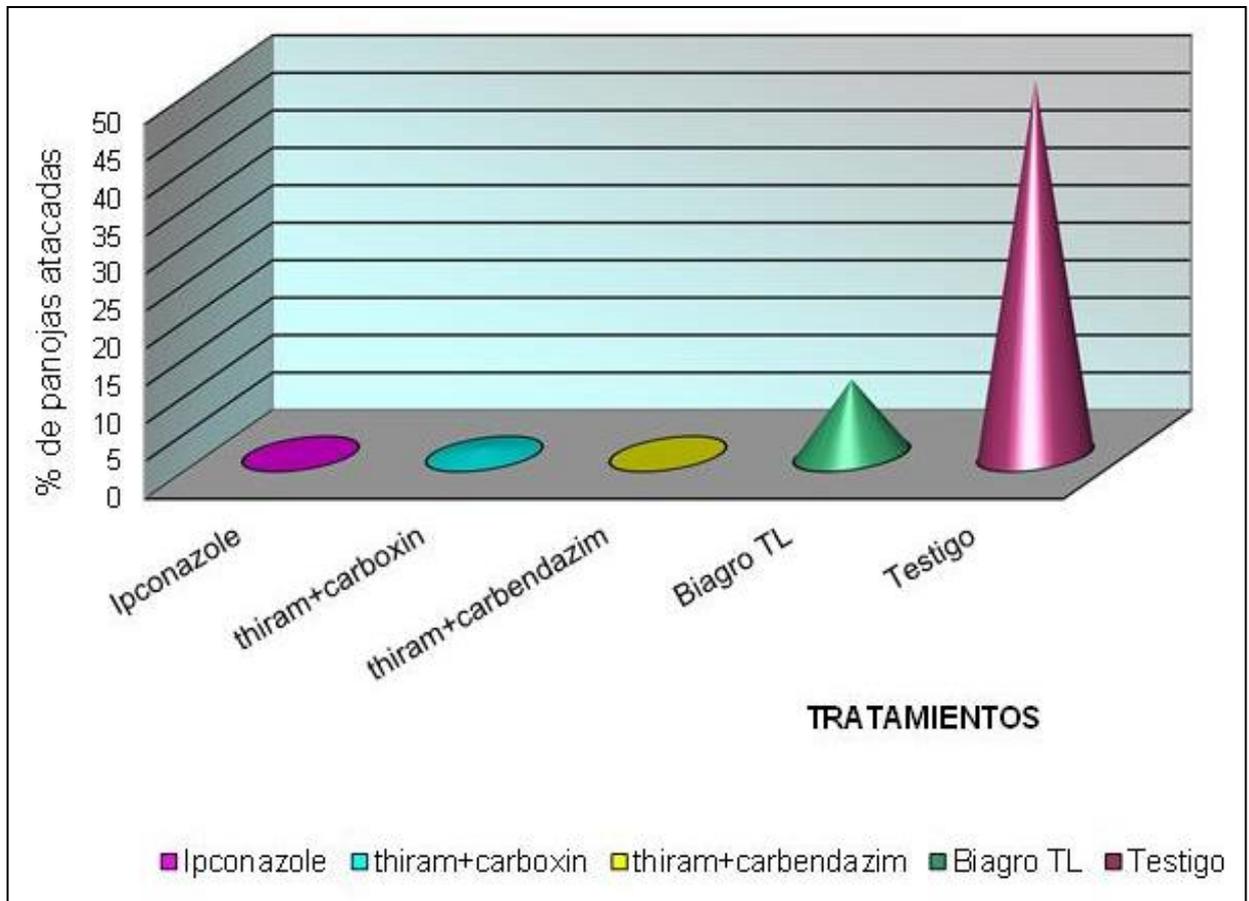


Fig 12. Evaluación a campo en cebadilla tratada con terápicos y biocontrolador (*Trichoderma*).

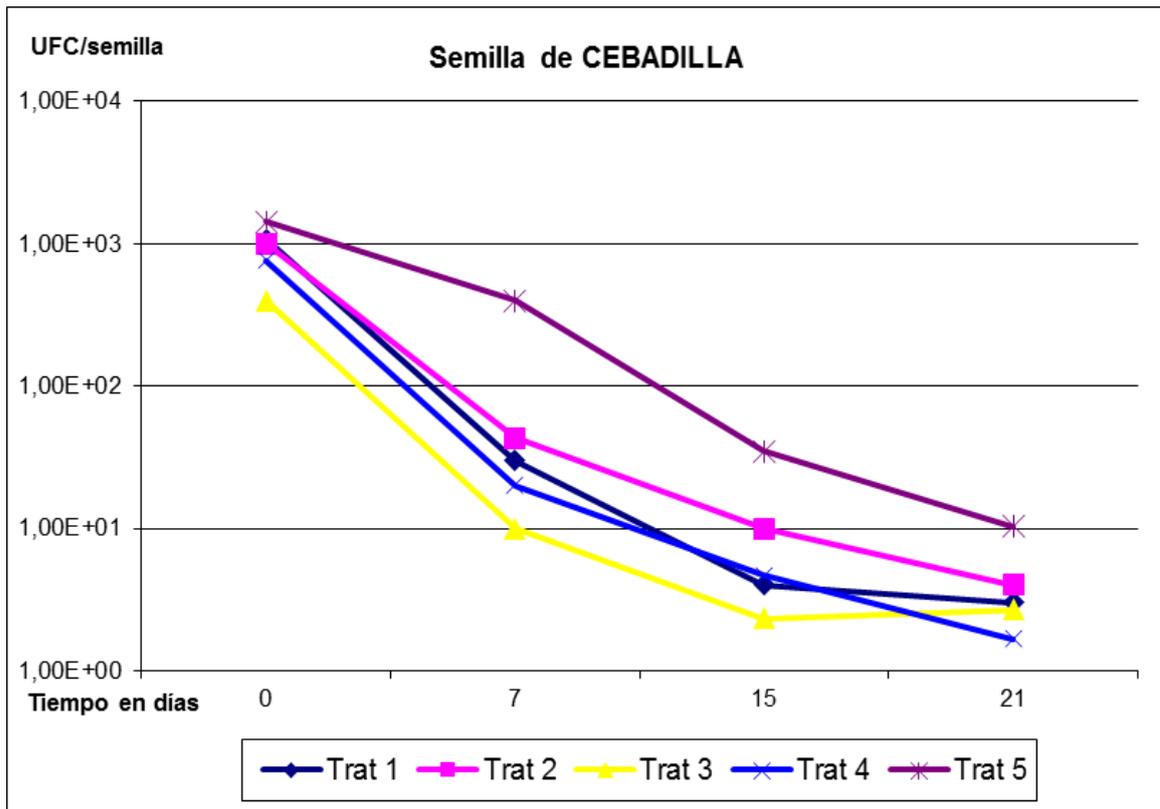
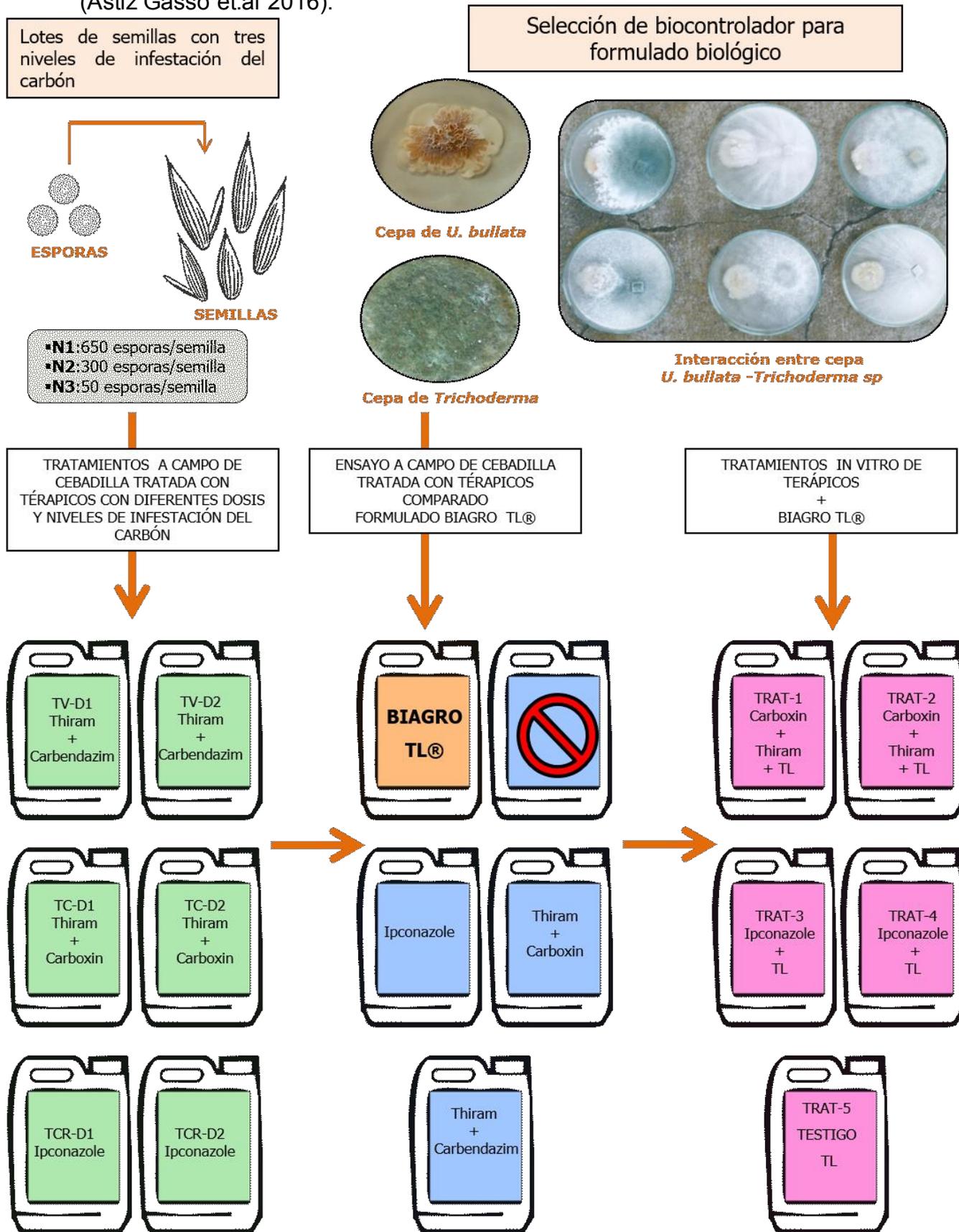


Fig 13. Evaluación de supervivencia de conidios de *Trichoderma* sp. en interacción con terápicos en semilla de cebadilla para el manejo integrado de la enfermedad.

Figura 14. Esquema del manejo integrado de *Ustilago bullata* en *Bromus sp.* (Astiz Gassó et.al 2016).



CONCLUSIONES

1. Se observó una reducción altamente significativa de la enfermedad *U. bullata* (carbón de la cebadilla) con el Biagro TL® con respecto al testigo.
2. No se evidenció un efecto negativo en la interacción terapico-formulado biológico hasta 7 días posteriores a la aplicación sobre la semilla.

BIBLIOGRAFÍA

Alfonso F., Alfonso I., Rodriguez J., Guardia E. 2002. Efectividad del biopreparado de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. sobre *Ustilago scitaminea* Sydow. Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria. International Seminar for Animal and Plant Health. 17:3.

Anuja Gupta, Maheshwari V.K. 2000. Integrated management of loose smut disease of wheat caused by *Ustilago segetum*. Eds Arya A-Mónaco. Book Seedborne diseases: eco-friendly management. 163-170. ISBN 81-7233-468-0.

Arregui M.C., Puricelli E.C. 2013. Mecanismos de Acción de Plaguicidas. Ed. UNR 261 pp.

Astiz Gassó M.M. 1983. Búsqueda de fuentes de resistencia en *Bromus* spp. a *Ustilago bullata* Berk. V Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Resúmenes pp 21.

Astiz Gassó M.M. 1985. Formación de clamidosporas "in vitro" de *Ustilago bullata* Berk. XII Jornadas Argentinas de Micología. Resumen Pág. 40.

Astiz Gassó M.M. 1992. Estudios sobre especialización fisiológica de las caries del trigo. VIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Paraná provincia de Entre Ríos, Argentina. Resumen Pág. 8.

Astiz Gassó M.M. 1997. Comportamiento de cultivares y líneas de trigo a las caries (*Tilletia foetida*). Revista de Fitopatología. Latinoamericana ALF, 33: 16-17.

Astiz Gassó M.M. 1997. Variabilidad patógena de poblaciones de *Tilletia foetida* en *Triticum* spp. en Argentina. Revista de Fitopatología Latinoamericana ALF. 33 (3) 18.

Astiz Gassó M.M., Aulicino M.B. 1999. Selección para resistencia al carbón de la panoja (*Ustilago bullata* Berk) líneas y poblaciones de *Bromus catharticus* Vhal de la provincia de Buenos Aires. Actas 29º Congreso Argentino de Genética. III Jornadas Chileno-Argentino de Genética. Resumen Pág. 362.

Astiz Gassó M.M., Galián L.R., Aulicino M.B. 2009a. Evaluación de fungicidas para el control del carbón de la cebadilla (*Ustilago bullata*) con diferentes niveles de infestación en *Bromus catharticus*. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resumen PV04 .

Astiz Gassó M.M., Pagliocca R., Varaschin M.C. 2009b. Comportamiento del formulado biológico TL en el manejo integrado de *Ustilago bullata* (Ustilaginales) en *Bromus catharticus*. Actas VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina y II Congreso Internacional-REDBIO-Argentina. Resumen Pág. 151.

Astiz Gassó M.M., Molina M. del C. 2010. Physiological specialization of Ustilaginales (smut) of genera *Bromus*, *Zea* and *Triticum* in Argentina. Cap. 11. Management of Fungal Plant Pathogens. Págs. 138-146. CAB International 2010 SBN: 81-7233-468-0.

Astiz Gassó M.M., Sanchez S.E., Perelló A. 2016. Manejo integrado de *Ustilago bullata* en *Bromus catharticus* en Argentina/ Integrated management of *Ustilago bullata* in *Bromus catharticus* in Argentina. Actas 49th Congreso Brasileiro Fitopatología.

Astiz Gassó M.M., Varaschin C.I., Sannazzaro A., Alberto E. 2000. Acción Antagónica de *Trichoderma* sp. sobre *Tilletia laevis* y *Ustilago bullata* en Argentina. Actas del XII Biennial Workshop on the Smut Fungi. Págs 17-22.

- CASAFE. 2007.** Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. 13° Edición. Pág. 1056
- D'Ambrogio Argüeso A. 1986.** Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Editorial Hemisferio Sur Pág. 83.
- Dhingra O.D., Sinclair J.B.1995.** Basic plant pathology methods, 2nd Ed. CRC. Press Lewis Publishes, Florida USA.
- du Toit L.J., Pataky, J.K. 1999.** Variation associated with channel inoculation for common smut of sweet corn. Plant Dis. 83: 727-732.
- Elad Y., Chet I. and Henis Y. 1981.** A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. From soil. Phytoparasitica 9(1):59-67.
- Falloon R.E.1976.** Effect of infection by *Ustilago bullata* on vegetative growth of *Bromus catharticus*. New Zealand Journal of Agricultural Research 19:249-254.
- Falloon R.E.1979a.** Description and illustration of *Ustilago bullata* growing in culture. Trans. Br. Mycol.Soc. 73:223-227.
- Falloon R. E.1979b.** Further studies on the effects of infection by *Ustilago bullata* on vegetative growth of *Bromus catharticus*. New Zealand Journal of Agricultural Research 22:621-626.
- Falloon R.E., D.E. Hume. 1988.** Productivity and persistence of prairie grass (*Bromus willdenowii* Kunth). 1. Effects of the head smut fungus *Ustilago bullata* Berk. Grass and Forage Science 43: 179-184.
- Falloon R.E., Rolston M.P. 1990.** Productivity of prairie grass (*Bromus willdenowii* Kunth) affected by sowing date and the head smut fungus (*Ustilago bullata* Berk). Grass and Forage Science 45:357-364.

Falloon R.E., Rolston M.P., Hume D.E. 1988. Head smut of prairie grass and mountain brome: a review. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 31:459-466.

Fernández Pérez J., Covas G. F., Ruiz M.A. 1994. Carbón de la panoja de la cebadilla en tres especies del género *Bromus*. *Publicación Técnica N° 44*. ISSN 0325-2132.

Fischer G.W. 1940. Two cases of haplo-lethal deficiency in *Ustilago bullata* operative against saprophytism. *Mycología* 32(3): 275-289.

Fischer G.W., Holton C.S. 1957. *Biology and control of the smut fungi*. The Ronald Company New York 622 pp.

García-Guzmán G., Burdon J.J., Nicholls A.O. 1996. Effects of the systemic flower infecting-smut *Ustilago bullata* on the growth and competitive ability of the grass *Bromus cartharticus*. *Journal of Ecology* 84:657-665.

Guía de Productos Fitosanitarios 2007. Ed. 13 Tomo I y Tomo II. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes- Republica Argentina Pág. 2252.

Handelsman Jo., Stabb E.V.1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell* 8:1855-1869.

Hirschhorn E. 1977. Novedades sobre el carbón que ataca *Bromus* spp. en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 18:56-64.

Hirschhorn E. 1986. *Las Ustilaginales de la Flora Argentina*. *Publicación Especial Editor CIC* 530 pp.

ISTA 1982. *Handbook on Seed Health Testing*. Working Sheet N° 53. Zurich, Switzerland.

Llama A.M., Astiz Gassó M.M., Lovisolo M., Galián L.R. 2005. Evaluación histológica de *Ustilago bullata* Berk sobre plántulas de cebadilla criolla (*Bromus catharticus*) (Histological evaluation of *Bromus catharticus* seedling infection with *Ustilago bullata* Berk). XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos Libro de Resúmenes. HET-51: 435.

Martínez B., Gonzales R.Y, Balance C. 1998. Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre algunas patógenos de caña de azúcar. Fitopatología 33(4):207-211.

Martinez B., Infante D., Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de protección Vegetal 8 (1): 1-11.

McManus P.S., Ravenscroft A.V., Fulbright D.W. 1993. Inhibition of *Tilletia laevis* teliospore germination and suppression of common bunt wheat by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Plant Dis 77:1012-1015.

Mina G 2015. Bienvenidos a la era del biocontrol. Rizobacter http://www.atodotrigo.com.ar/presentaciones/MINA%20%20A%20TODO%20T RIGO%202015_500486.pdf

Papavizas G.C., Lumsden R.D. 1982. Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp from soil. Plant Disease 66:1019-1015.

Parada N.R. 1988. Micotoxinas y micotoxicosis del Ganado. Monografías de Medicina Veterinaria vol. 10(1).Pág. 13

Rifai M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116:1-55.

Singh D.V., Brivastava K.D., Aggarwal R. 1996. Potentiality of agents against

loose smut and Karnal bunt of wheat. Proceedings of Xth Biennial Workshop on the smut fungi. University of Calgary, Alberta Canada (Abstracts) 53-54pp-

Sri Deva F. 2008. Sobre las Malezas Peligrosas. Verdades Verdes. Trabajo de Investigación. <https://es.scribd.com/doc/6130240/MalezasPeligrosos-19/08/2016>

Thomas P.L., Nielsen J. 1981. Infection of *Bromus uniloides* by *Ustilago kolleri* and *Ustilago avenae*. Australasian Plant pathology 10(2):25-27.

Tomasz K. 2011. In vitro influence of selected fungicides on *Sphacelotheca reiliana* and *Ustilago maydis*. Journal of Plant Prot. Res. 51:342-348.

Toupta Boguena P., Meyer S. E., Nelson D. 2007. Low temperature during infection limits *Ustilago bullata* (Ustilaginaceae, Ustilaginales) disease incidence on *Bromus tectorum* (Poaceae, Cyperales). Biocontrol Science and Technology 17: 33-52.

Vignale M.V., Astiz Gassó M.M. Novas M.V., Iannone L.J. 2013. Epichloid endophytes confer resistance to the smut *Ustilago bullata* in the wild grass *Bromus auleticus*. Biological Control 7:1-7.

Vignale, M.V., Novas M.V., Astiz Gassó M.M., Iannone L.J. 2009. Efecto de endófitos *Neotyphodium* sobre la germinación de teliosporas de *Ustilago bullata* y la infección en plántulas de *Bromus auleticus*. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica: Micología y Liqueología Pág. 225. Vol. 44 Suplemento.

Vignale M.V., Novas M.V., Pinget A. D., Astiz Gassó, M.M., De Batista J.P., Iannone L.J. 2010. The role of *Neotyphodium* on the interaction of *Bromus auleticus* with the smut fungi *Ustilago bullata* and mycorrhizal fungi. Abstracts from the Joint Meeting of the MSA and International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses (ISFEG). Inoculum 61 (4) 81-82.

CONCLUSIONES FINALES



Sporisorium cruentum sobre *Sorghum alepensis*

1. Se establecieron las condiciones ambientales óptimas y el momento de mayor eficacia del hongo, para producir infecciones en las plantas de sorgo de alepo. Por lo tanto, de este modo, sólo dentro de un marco integrado de alternativas, se podría establecer fehacientemente la factibilidad del control biológico empleando *S. cruentum*.
2. Sería importante establecer las posibles interacciones entre la implementación del control biológico con otras alternativas de manejo en el sorgo de alepo, tales como el uso de herbicidas en dosis reducidas y la habilidad competitiva de los cultivos que compitan con la maleza.



Ustilago filiformis sobre *Glyceria sp*

1. Los métodos utilizados en esta investigación son eficientes para la determinación de la histopatología del carbón de la estría sobre su hospedante.
2. Se logró determinar el proceso de penetración, infección y colonización del patógeno sobre las plantas de *Glyceria spp*.
3. Se determinó que la característica de la infección es de **tipo local y no sistémica**.

4. Se presume una disminución de la disponibilidad del forraje para el ganado debido al ataque directo de *U. filiformis* sobre las hojas. También habría que determinar su posible toxicidad en los animales al ser consumido.
5. Se estableció y esquematizó el ciclo biológico de *U. filiformis* sobre *Glyceria spp.* por primera vez en nuestro país y en el mundo, constituyendo un aporte de valor para entender la epidemiología de la enfermedad.



Ustilago bullata sobre *Bromus spp.*

1. Las investigaciones realizadas sobre la biología y histopatología de *U. bullata* indican que este patógeno se localiza en el tejido apical e infecta a las panojas de cebadilla en forma parcial o total.
2. Se determinó la existencia en Argentina de cuatro formas fisiológicas de *U. bullata*.
3. Se estableció que las especies *B. catharticus* y *B. parodii* son hospedantes altamente susceptibles a *Ustilago bullata*.
4. No hay resistencia genética en *B. cartharticus* al carbón de la cebadilla.
5. Se comprobó que la especie *B. brevis* es un hospedante diferencial del género *Bromus*.
6. *B. auleticus* y *B. inermis cv gombaszpuzta* son las especies más resistentes a las poblaciones *U. bullata*.
7. *Bromus auleticus* posee un endófito (**E+**) que interactúa en forma antagónica para evitar la infección de *U. bullata*.

8. Niveles de infestación de ≤ 50 teliosporas/semilla son el **Umbral** a considerar en el momento de seleccionar lotes de semilla y recomendar el tratamiento con terapicos para siembra.
9. Los controles químicos sobre *U. bullata* dependen de los principios activos de los formulados de los fungicidas y deberían ser evaluados con ensayos a campo para lograr la mayor eficiencia y eficacia para el manejo de la enfermedad.
10. Las cepas aisladas de *Trichoderma harzianun* fueron eficientes en la inhibición in vitro de *U. bullata*.
11. Los resultados obtenidos nos permitieron proseguir con experimentos de terapicos y diseño de un formulado biológico Biagro TL® para el manejo integrado de *U. bullata*.
12. Se observó una reducción altamente significativa de la enfermedad *U. bullata* con Biagro TL® con respecto al testigo.
13. No se evidenció un efecto negativo en la interacción terapico-formulado biológico hasta 7 días posteriores a la aplicación sobre la semilla.
14. Estos resultados nos permitirán planificar estrategias para futuros ensayos para manejar el carbón de la cebadilla.