PRESENCIA DE LA ENFERMEDAD DEL MAL DE AZÚCAR (*Sphacelia* spp.) EN TRES ESPECIES DEL PASTO BRACHIARIA (Panicoidea, Poaceae)

Sandra X. Garcia[1], Benjamín Pineda-L[2] y Sandra M .Salazar E.[2]

[1]Pontificia Universidad Javeriana, [2] Laboratorio de Sanidad de Germoplasma, Unidad de Recursos Genéticos, bpineda@cgiar.org, CIAT, AA 6713, Cali

104958

RESUMEN

El incremento y refrescamiento del germoplasma del *Brachiaria* se realiza, bajo condiciones de campo, en la estación Santa Rosa en las cercanías de Popayán por ser una localidad en donde la producción de semilla es buena. Sin embargo las condiciones de precipitación (más de 2000mm) y temperatura (16-24^0 C) de la localidad también favorecen el desarrollo de enfermedades de origen fungoso que afectan la producción de semilla. En un estudio de reconocimiento de dichas enfermedades, durante el segundo semestre de 1999 y el primero de 2000, al comienzo de la floración se observó sobre los racimos florales una enfermedad caracterizada por la presencia de un exudado de consistencia viscosa y posterior recubrimiento de las semillas por fructificaciones de hongos, en algunos casos de color blanco y en otros rosado, gris verdoso o negro. Las observaciones de campo en las parcelas de multiplicación de las especies *Brachiaria brizantha, Brachiaria decumbens* y *Brachiaria jubata* permitieron determinar que la enfermedad afectaba las inflorescencias con diferentes grados de severidad. Los estudios realizados en el Laboratorio de Sanidad de Germoplasma (LSG) de la Unidad de Recursos Genéticos URG), consistentes en estudio microscópico de los exudados, cultivo en PDA, aislamiento a partir de flores afectadas y pruebas de patogenicidad permitieron determinar que la enfermedad era el mal de azúcar ocasionado por una especie de *Sphacelia,* hongo que presenta varios tipos de conidias de diferentes tamaños y formas, que incluyen conidias ovaladas1(3,76x5,2µm, piriformes (14,04x5,51µm) o esféricas (4,64µm). Las fructificaciones fúngicas coloreadas, según los análisis de laboratorio, correspondían a fructificaciones de los hongos *Cerebella* sp. (*Epicoccum* sp.), *Cladosporium* sp., y *Fusarium* sp.. Por otra parte, para verificar la asociación de *Sphacelia* sp. con las semillas, se recolectaron muestras de 18 accesiones de *B. brizantha* , siete de *B. decumbens* y cinco de *B. jubata.* Las semillas se acondicionaron según los procedimientos establecidos en la URG para el germoplasma de gramíneas y se les realizó análisis de sanidad en el laboratorio utilizando el método de enjuague, el cual incluye la obtención de una suspensión de conidias, centrifugación y observación al microscopio, obteniéndose resultados positivos para la mayoría de las accesiones estudiadas.

Palabras Claves: *Brachiaria*, Germoplasma, mal de azúcar, enfermedades fungosas, Pasturas tropicales

SUMMARY

The increase and regeneration of *Brachiaria* germplasm are carried out, under field conditions at "Santa Rosa" Experimental station near Popayan where the seed production conditions are relatively good. Nevertheless under the conditions of precipitation (more than 2000mm) and temperature (16-24 ^{0}C) of this location the production of seeds can be affected by fungal diseases. In a fungal diseases survey, during the second semester of 1999 and the first of the 2000, a honeydew oozing was observed on flowers when flowering was starting. Later the apparition of fungal growths of white color, black, green or pink in individual or combined form was observed on the affected seeds. The field observations on *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* and *Brachiaria jubata* multiplication plots allowed to determine that the disease affected the inflorescences with several grades of severity. The studies carried out in the Germplasm Health Laboratory (GHL) of the Genetic Resources Unit (GRU), consistent in a microscopic study of the oozed, cultivation in PDA and isolation starting from affected flowers, and pathogenicity tests allowed to determine that affection was the "Honeydew" disease occasioned by a species of *Sphacelia.* This pathogen produced conidia of several size and form, some of them (macroconidia): oval (13.76 x 5.2 µm), pyriform (14,04 x 5,51µm) or spherical microconidia (4.64 mµ). The colored fungal fructifications according to the laboratory analysis were classified as *Cerebella* sp., (*Epicoccum* sp.), *Cladosporium* sp., y *Fusarium* sp. In order to verify the association of *Sphacelia* sp. with the seeds, seed samples of 18 accesions of *B. brizantha*, seven of *B. decumbens* and five of *B. jubata* were gathered. The seeds were conditioned according to the procedures established in the GRU for the graminae germplasm and carried out their analysis of seed health in the GHL using "washing test" in order to verify the presence of *Sphacelia* conidia on seeds. The obtained results showed that the studied seed accessions were contaminated by *Sphacelia* spp.

Key Words: Brachiaria, Germplasm, "Honeydew", fungal diseases, tropical pastures.

INTRODUCCIÓN

Las praderas son la base de la alimentación del ganado y este a su vez es la fuente de proteínas de origen animal más importante para la alimentación humana. En el trópico bajo colombiano existen grandes extensiones de praderas, en donde el *Brachiaria* (Panicoidea, Poaceae) es la pastura más difundida y de mejor aceptación por el ganado. La gramínea contiene muchas especies que se encuentran establecidas en el país y que son utilizadas por su alto valor nutricional en el pastoreo, bajo condiciones de suelos pobres y ácidos. En la región del Caquetá, una de las más importantes y representativa de la amazonía colombiana, para 1997 se estimaba en 17226 has el área cultivada con la pastura (Rivas y Holman, 1999),

Las plantas del género *Brachiaria* son afectadas por muchas enfermedades (Lenné, 1990; Lenné, 1994; Trutmann, 1994, Chagas, y Oliveira, 1983; Kelemu, 1993), cuya importancia y severidad varían según el ecosistema, la especie atacada y la clase de agente causal. Entre las enfermedades más conocidas se encuentran: el añublo foliar causado por *Rhizoctonia solani* (Miles et al, 1998), el añublo de la inflorescencia por *Fusarium* spp. (Lenné y Ordoñez, 1988), la roya causada por *Puccinia levis* var. *panici-sanguinalis* y *Uromyces setariae-italicae* (Lenné, 1984), el falso carbón (*Balansia* spp. y *Cerebella* spp.), las manchas foliares ocasionadas por *Curvularia* spp., *Pestalotiopsis* spp. y *Phoma sorghina,* los carbones causados por *Sorosporium brachiariae* y *Urocystis* spp. (Lenné y Ordóñez, 1988) y el manchado de las semillas provocado por *Cercospora* spp., *Cladosporium* spp., y *Fusarium* spp.

En Colombia, además de algunas de las enfermedades ya mencionadas se han regis-

trado manchas foliares ocasionadas por *Bipolaris* sp. (Buriticá, 1999), el añublo foliar causado por *Rhizoctonia solani* y el deterioro de semillas por *Drechslera* sp , *Curvularia*, y *Phoma* sp (Garcia y Pineda, 2000).

El ergotismo causado por *Claviceps* spp. (Forma teleomorfa) o *Sphacelia* spp. (forma anamórfica), es la enfermedad más importante para muchas especies de gramíneas pero poco conocida para las del género *Brachiaria* (Lenné, 1994) Se ha registrado en *B. brizantha, B. humidicola* y *B. serrata*, en donde el desarrollo del hongo sobre inflorescencias reduce la calidad de las semillas en el campo (Fernandes et al, 1995) y tiene considerable potencial de daño para la producción (Lenné, 1994). El patógeno ha sido registrado en Asia, África, Australia (Lenné, 1990) y Brasil (Fernandes et al, 1995)

Otros registros de ergotismo en especies de *Brachiaria* indican que se ha encontrado sobre *B. folioso* en Asia, África y Australia, y de igual manera sobre *B. humidicola, B. serrata* y *B. brizantha* en África (Lenné 1990). En Brasil existen registros sobre *B. brizantha, B. arrecta, B. decumbens, B. jubata* y *B. ruziziensis* (Fernandes et al, 1995). En Colombia, *B. mutica* se registra como hospedera sospechosa de albergar agente causal de la epidemia de mal de azúcar en sorgo, en el Valle del Cauca (Granada y Rengifo, 1997)

Los sistemas agro pastoriles requieren permanentemente el mejoramiento de las praderas mediante el aporte de materiales genéticos (germoplasma) de buena calidad, alto rendimiento y rusticidad para sostener la producción de las ganaderías. Para el suministro de germoplasma es indispensable poseer colecciones convenientemente conservadas, caracterizadas, fitosanitariamente aceptables y disponibles para su distribución a quienes lo requieran, bajo las condiciones de los acuerdos de transferencia respectivos

La colección de *Brachiaria* que se conserva en el CIAT comprende unas 700 accesiones de 27 especies ya identificadas. Casi el 50% de las accesiones son de *B. brizantha*, lo que refleja, en parte la importancia de esta especie como gramínea forrajera promisoria. Las accesiones de *B. decumbens* y la de *B. ruziziensis* representan sólo el 15% de la colección, lo que indica su estrecha distribución natural. Otras especies con buena representación son *B. humidicola* (11%), *B. jubata* (8%), y *B. nigropedata* (5%).

El incremento y refrescamiento del germoplasma del *Brachiaria* se realiza, bajo condiciones de campo, en la estación Santa Rosa (Municipio de Popayán, Departamento del Cauca) por ser una localidad en donde la producción de semilla es relativamente buena. No obstante bajo las condiciones de precipitación (más de 2000 mm) y temperatura (16-24^0 C) de dicha localidad la producción de semillas se ve afectada por enfermedades de origen fungoso que reducen la calidad del germoplasma producido. Para evitar esta reducción en la calidad ha sido necesario adelantar algunos estudios relacionados con la identificación de las enfermedades que se encuentran en los lotes de producción (Garcia y Pineda, 2000) y aplicar las medidas de control respectivas.

Durante el segundo semestre de 1999 y el primero del 2000 en las parcelas de multiplicación de las diferentes accesiones de *Brachiaria* spp. ubicadas en la estación Santa Rosa, se observó en los racimos florales una enfermedad caracterizada por la presencia de un exudado translucido de sabor dulce y consistencia viscosa, el cual se recubría posteriormente por fructificaciones de hongos, en unos casos de color blanco y en otros de color gris verdoso o negro. Como la enfermedad afectaba los racimos florales y por ende la producción de semilla se consideró muy importante iniciar los estudios acerca del disturbio. Dichos estudios comprendieron: identificación del agente o los agentes causales, determinación de la incidencia y severidad, y el posterior diseño y aplicación de los planes de control más adecuados.

En este documento se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la identificación del agente causal, su incidencia y severidad bajo las condiciones del estudio realizado durante el período comprendido entre Junio de 1999 y Mayo del 2000.

MATERIALES Y MÉTODOS

Época del estudio y localización

La investigación se realizó durante el periodo comprendido entre Junio de 1999 y Mayo de 2000, utilizando un grupo de 30 accesiones de *Brachiaria* spp., en proceso de multiplicación correspondiente a la colección del germoplasma mantenido en el CIAT (Tabla 1).

El trabajo de campo para la observación de síntomas de la enfermedad en las inflorescencias, se realizó en los lotes de incremento de germoplasma de *Brachiaria* sp. de la Estación Santa Rosa ubicados en vereda Santa Rosa (2° 25' N; 76° 40' W), en las cercanías de Popayán a una altura de 1700 m.s.n.m, con precipitación media anual de 2000 mm y una temperatura promedia de 17°C.

Los trabajos relacionados con el análisis de muestras de inflorescencias, acondicionamiento de semillas, análisis fitosanitario, identificación de hongos y pruebas de patogenicidad, se llevaron a cabo en las instalaciones de la Unidad de Recursos Genéticos (URG), en el Laboratorio de Sanidad de Germoplasma (LSG) y en los invernaderos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); localizado en el Municipio de Palmira, departamento del Valle del Cauca

Estudios de campo

Las observaciones de campo fueron realizadas en parcelas de 6m^2 distribuidas al azar dentro del lote de *Brachiaria* spp. en la Estación Santa Rosa. Cada 15 días, se anotaba, en cada caso, las etapas de desarrollo de la planta y la emergencia de las inflorescencias y el desarrollo de las semillas.

Tabla 1. Accesiones de *Brachiaria* spp mantenidas en la estación Experimental Santa Rosa

Especie	No CIAT	Lote
B. brizantha	16154	J-9
B. brizantha	16290	L1-11
B. brizantha	16348	K1-1
B. brizantha	6682	K1-19
B. brizantha	16125	L1-13
B. brizantha	16470	J-13
B. brizantha	16288	K1-1
B. brizantha	16828	J-10
B. brizantha	16335	L-1A
B. brizantha	16331	L-1A
B. brizantha	16156	J-7A
B. brizantha	26131	J-9
B. brizantha	26124	J-13
B. brizantha	16830	J-13
B. brizantha	26991	J-10
B. brizantha	26745	J-9
B. brizantha	26641	J-13
B. decumbens	16500	K1-1
B. decumbens	16502	L1-11
B. decumbens	16504	L1-11
B. decumbens	664	K1-19
B. decumbens	16133	K1-1
B. decumbens	16177	L1-11
B. jubata	16468	K1-1
B. brizantha	16462	L1-11
B. jubata	16176	L1-11
B. decumbens	26187	K1-1
B. jubata	16532	J-12A
B. jubata	26891	K1-19
B. jubata	16459	J-7

Descripción de síntomas. En condiciones de campo se hicieron observaciones acerca del progreso de la enfermedad y se procedió a describir los síntomas observados, desde sus comienzos hasta la aparición de crecimiento de hongos secundarios. Adicionalmente, con la ayuda del estereo-microscopio y el microscopio óptico, en el laboratorio de hicieron observaciones sobre muestras de exudados y espiguillas afectadas para completar la descripción.

Determinación de la incidencia y severidad. Para determinar en detalle el porcentaje de incidencia en cada parcela se realizaron lecturas periódicas cada dos semanas, desde el inicio de la floración hasta su cosecha. Se utilizó un cuadrado de madera de 50x50 cm, al no ser posible la evaluación de plantas individuales; toda vez que *Brachiaria* es una gramínea rastrera con estolones largos que arraigan en los nudos y forman un césped denso con abundantes macollas. El cuadrado se lanzó dentro de cada parcela al azar cuatro veces y se tomaron los datos relacionados con el número de inflorescencias afectadas y el grado de severidad, según la escala diseñada para el efecto (Tabla 2)

Los cálculos para determinar la incidencia en cada área incluida en el cuadrado se realizaron basados en el número de inflorescencias con síntomas, aplicando la fórmula siguiente:

Tabla 2. Escala de evaluación de la severidad de la infección del complejo de enfermedades fungosas observado en inflorescencia de *Brachiaria* spp.

Grado	Descripción
0	Inflorescencias sin síntomas visibles de afección fungosa.
1	Inflorescencias que en su mayoría presentan exudado consistente en gotas azucaradas de color café.
2	Inflorescencias que en su mayoría presentan exudado y escaso crecimiento fungoso blanco
3	Inflorescencias que en su mayoría presentan abundante crecimiento fungoso blanco.
4	Inflorescencias que en su mayoría presentan algunas espiguillas parcialmente cubiertas por hongos de color negro o gris verdoso.
5	Inflorescencias totalmente invadidas por colonias de hongos de color negro, gris verdoso.

I = No. inflorescencias con síntomas x 100/ Total de inflorescencias por parcela

Estudios de laboratorio

Toma de muestras y análisis. Para los estudios de laboratorio se recolectaron muestras de inflorescencias con distintos estados de desarrollo de la enfermedad y se empacaron convenientemente en bolsas plásticas (Whirl pak, Nasco) estériles; adicionalmente en viales con agua destilada esterilizada se colectó el exudado. El muestreo se realizo entre las 6 y las 8 AM, horas en las cuales aun se mantenía la humedad ambiental suficiente para hacer visibles las gotas del exudado.

En el LSG las muestras de los racimos florales afectados se observaron en detalle mediante un estereoscopio (Wild Heerbrugg) para identificar la presencia de fructificaciones del hongo en las estructuras de las espiguillas (glumas, tricomas, raquis).

Preparaciones para microscopio. Mediante una aguja de disección debidamente flameada se tomaron muestras del crecimiento fungoso presente en las espiguillas y se colocaron en una gota de agua destilada estéril localizada sobre un portaobjeto; una vez hecho esto la gota se cubrió con un cubre objetos y se procedió a su examen mediante el microscopio óptico (Nikon Eclipse E 400) a diferentes aumentos.

Adicionalmente se procesaron muestras para microscopía electrónica de barrido, las cuales fueron examinadas en el microscopio de barrido Jeol JSM-820 de la Unidad de Virología del CIAT.

Aislamientos y cultivos. El hongo se aisló de espiguillas obtenidas de inflorescencias de *B. brizantha* NCIAT 16154 que se encontraban ligeramente recubiertas de micelio blanco, utilizando PDA (Difco) + Bactrin. Las espiguillas se seccionaron dentro de la cámara de flujo laminar extrayendo la parte correspondiente al ovario, la cual se sembró directamente en el medio de cultivo y se procedió a su incubación en oscuridad a 28°C. Una vez obtenidas colonias del hongo se procedió a purificarlo mediante cultivo monospórico, el cual consistió en preparar una suspensión de cada uno de los aislamientos en tubos de Eppendorf de 1,5 ml con agua destilada estéril. Posteriormente se realizaron diluciones 10^{-1}, 10^{-2} y 10^{-3}. De la suspensión que contenía la dilución de 10^{-3} se extendió una gota con la ayuda de un triángulo de vidrio sobre la superficie del medio Agar agua (20 gr agar/L de agua destilada) esterilizado contenido en un plato Petri. Los platos se incubaron a 28°C durante 24 horas y luego se observaron al microscopio al día siguiente; para ubicar y señalar las esporas en proceso de germinación. Posteriormente se cortó el medio de cultivo en donde se había localizado las esporas y se transfirió a PDA, para ser incubado bajo las misma condiciones y obtener colonias de origen monospórico. A partir de las colonias obtenidas se incrementó el hongo en cajas de Petri conteniendo PDA, e incubándolas en oscuridad a 28°C durante 30-45 días.

Otro procedimiento consistió en preparar en agua destilada estéril una suspensión de conidias y realizar diluciones sucesivas. Para el efecto se tomó con una aguja de disección una muestra de la costra (crecimiento fungoso seco) presente en las espiguillas y se colocó en un tubo de ensayo que contenía agua destilada estéril, se agitó por un minuto con un mezclador (Vortex-Genie), en seguida con una pipeta tomó una alícuota de la suspensión más diluida y se esparció en platos de Petrí con medio de cultivo agar-agua estéril. Se incubaron los platos y en su momento se procedió a repetir el procedimiento de obtención de cultivos monospóricos.

Para el mantenimiento de los cultivos obtenidos y con el propósito de preservarlos por más tiempo, para posterior identificación y pruebas de patogenicidad se siguió el procedimiento recomendado por Aricapa y Correa, (1994). También, para facilitar la identificación y observar en mayor detalle las estructuras reproductivas del hongo purificados se hicieron micro cultivos. Estos consistieron en colocar sobre un porta objeto una porción de 0,5 x 0,5 cm de PDA inoculado con fructificaciones del hongo y cubierto con una laminilla de vidrio. Para mantener la humedad el montaje se colocó dentro de una caja de Petri con papel de filtro humedecido. Una vez establecido el microcultivo se le retiró la laminilla quedando en la lámina el crecimiento del hongo. A éste, se le aplicó una gota de solución fijadora (glicerol 30 ml, ácido láctico 30 ml, agua destilada estéril 20 ml) y se le colocó un cubreobjetos. Finalmente, se selló con esmalte transparente y se procedió a realizar las observaciones en el microscopio.

Pruebas de patogenicidad. Para las pruebas de patogenicidad se multiplicó en medio de cultivo PDA el hongo obtenido de aislamientos monopóricos y cuando se determinó la presencia de esporas (cultivos de 30-45 días) se procedió a preparar la suspensión necesarias para las inoculaciones; en la cámara de flujo laminar se procedió a frotar la superficie del medio con una pinza estéril y recolectar el producto para su homogenización en un mortero con 5mL de agua destilada estéril y 0,4 gr/100mL de gelatina sin sabor. Finalmente la muestra se colocó dentro de un frasco tapa rosca previamente esterilizado y luego se agitó mediante el uso de un agitador "vortex" durante 10 minutos. La suspensión del inóculo se ajustó a una concentración de 1 x 10^6 conidias/ml mediante lectura de alícuotas de esporas en un hemacitómetro o cámara de Neubauer.

Una vez obtenida la concentración ideal del hongo se procedió a inocular las inflorescencias de plantas *B. brizantha* N CIAT 16154 recién abiertas, mantenidas en invernadero. Se utilizó el método de aspersión utilizando una jeringa de 5 ml. Cada panícula se cubrió con una bolsa plástica de cremallera (25cm x 20cm). Dentro de cada bolsa, en la parte inferior, se colocó una mota de algodón humedecido con agua destilada estéril con el fin de mantener la humedad.

Por cada panícula se agregaron 5ml de inóculo con la jeringa dirigidos directamente hacia las espiguillas. Para los testigos respectivos se cumplió el mismo procedimiento que con la suspensión conidial, pero, se inocularon únicamente con agua destilada estéril y 0,4 gr/100mL de gelatina sin sabor.

Transcurridas 48 horas se retiraron cuidadosamente las bolsas para dejar expuestas las panículas a condiciones ambientales del invernadero (15-40°C). Se colocó un higrotermógrafo para registrar las condiciones de temperatura y humedad relativa.

A los 7, 15 y 30 días después de la inoculación se evaluó la totalidad de las panículas para detectar síntomas tales como: presencia de exudado, crecimiento micelial y otros.

Otro experimento consistió en realizar la misma prueba en un cuarto de crecimiento con temperatura de 20-25°C, baja iluminación y foto período de 12 horas

Análisis de semillas. Se utilizó el método de análisis de enjuague de semillas (Agarwal, K. y Sinclair, B. 1987; Neergaard, P. 1977), utilizando muestras de semillas de cada una de las accesiones disponibles, después del proceso de selección efectuado en la URG. Se incluyeron 100 semillas escarificadas y 100 sin escarificar, las cuales se depositaron en tubos de ensayo con 5 ml de agua destilada esterilizada, se agitaron Vortex por 5 minutos y se dejaron en reposo durante la noche. Al día siguiente se extrajo la semilla del tubo y el agua de enjuague se centrifugó a 2500 RPM por 5 minutos, luego se recogió el precipitado y se resuspendió en 100µL de

agua para preparar los correspondientes montajes y observarlos en el microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de la enfermedad

Sintomatología. Al comienzo de la floración en la mayoría de las accesiones se observó una exudación de consistencia viscosa transparente y un crecimiento fungoso blanquecino leve de aspecto polvoso (Figuras 1a, 1b, 1c, 1d). El exudado viscoso, generalmente localizado en el ápice de las espiguillas, goteaba contaminando otras inflorescencias, los tallos y la base la hojas En la medida en que la infección progresaba el hongo blanco, dependiendo de la accesión afectada, invadía la totalidad de las inflorescencias (Figura 1a) y en algunos casos la base de la lámina foliar (Figura 1b), en donde probablemente había caído el fluido azucarado, proveniente de las primeras inflorescencias afectadas.

En el campo el exudado era muy notorio en las primeras horas de la mañana y las espiguillas afectadas eran frecuentemente visitadas por insectos himenópteros, dípteros y coleópteros que se alimentaban de la secreción azucarada. Las gotas del fluido, inicialmente transparentes, a medida que la temperatura aumentaba durante el día se tornaban más viscosas y adquirían un color dorado claro a marrón oscuro. Posteriormente, sobre la superficie de las espiguillas el crecimiento fungoso se tornaba de aspecto costroso, recubriéndolas total o parcialmente (Figura 1d, 1j). Cuando la infección era severa, los racimos afectados podían reconocerse a simple vista, particularmente en las plantas de los bordes de la parcela. Durante las siguientes fases de desarrollo de las semillas, y una vez el micelio blanco invadía las inflorescencias se observaba la aparición de crecimientos fungosos de color negro (Figuras 1d, 1e), verde o rosado en forma individual o combinado, creciendo generalmente sobre el exudado (Figuras 1d, 1e). Estas observaciones concuerdan con lo descrito por Langdon en 1950 (Lenné, 1994), pues según él aparece primero la secreción azucara concentrada y pegajosa o "honeydew" en inflorescencias jóvenes, pocas semanas antes de la emergencia y luego proliferan otros hongos que crecen sobre la gota azucarada.

En las observaciones realizadas en el laboratorio con el estereoscopio se pudo visualizar que el crecimiento fungoso blanco presente sobre las espiguillas estaba constituido por conidióforos y conidias localizados sobre las glumas, y los tricomas (Figuras 1g, 1h, 1i, 1j, 1k, 1l).

La disección de las florecillas que presentaban exudado en su parte apical (Figura 1n) permitió determinar que las brácteas estaban intactas pero el pistilo se encontraba dañado, el estigma deteriorado y en el ovario reemplazado por una masa fungosa de color marrón claro, recubierta de exudado (Figuras 1n, 1ñ) similar al observado en el extremo apical de las espiguillas. En esas condiciones el daño en el ovario era tan severo que no se formaron las semillas. Evento de gran impacto negativo, no sólo cuando se trata de refrescar e incrementar germoplasma para su conservación y distribución, si no también cuando se trata de producir semilla en cantidad y calidad.

El análisis del exudado en montajes microscópicos permitió observar la presencia de varios tipos de conidias de diferente tamaño y forma, (Tabla 3) que iban desde microconidias ovaladas y/o esféricas, hasta macroconidias, ovaladas, de forma redonda, y/o piriformes (Figuras 1m, 2c), en muchos casos similares a las descritas para *Sphacelia* sp. en otras gramíneas (Tabla 4) y a lo descrito por Langdon en 1950 para *Brachiaria* spp. (Lenné, 1994) pues según dicho investigador la gota azucarada contiene numerosas conidias hialinas alantoides de 10-20 x 3-6 µm.

situación que se ha observado con *Sphacelia* spp., pero afectando *Sorghum vulgare*, especie en la cual los estudios han sido más detallados (Bandyopadhyay, *et al.*, 1996; Bandyopadhyay, *et al.*, 1990; Bandyopadhyay et al, 1996; Bandyopadhyay et al., 1998).

Otra causa probable de la respuesta obtenida pudo haber sido la inoculación inoportuna de las inflorescencias, por desconocimiento de la fisiología reproductiva de cada una de las accesiones inoculadas, es decir, no se tenía información sobre el momento en que el estigma floral era receptivo para el polen. En especies como el sorgo para la infección por *Sphacelia* existen periodos críticos que incluyen la apertura floral, la producción del polen y la fertilización (Bandyopadhyay, *et al.*, 1996); por tanto, es posible que esto ocurra en *Brachiaria*, sin embargo es necesario adelantar más estudios al respecto

En las pruebas de patogenicidad realizadas en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 20-25 °C, iluminación 3000-5000 lux, alternando periodos de luz/oscuridad de 12 horas y mantenimiento de humedad alta mediante una bolsa plástica dentro de la cual se mantuvieron las espiguillas; se obtuvieron resultados positivos en la accesión 16154 observándose el exudado en unas pocas inflorescencias después de 15 días de inoculadas Quizás en esta ocasión las condiciones del experimento fueron mejores, en especial la temperatura. Sin embargo es muy importante adelantar estudios acerca características de las diferentes accesiones en cuanto se refiere a la fecundación de las inflorescencias, y su

Tabla 3. Medidas en Micras (µ) de conidias de *Sphacelia* sp. obtenidas de inflorescencias de *Brachiaria brizantha*

Fuentes	Tipo de conidias				
	Conidias ovaladas		Conidias piriformes		Microconidias esféricas
	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Diámetro
Aislamiento 100 a (19-08-99) *B. brizantha*, NCIAT 16154	15,3 ± 3,009 (9,76-24,4)	5,73 ± 1,527 (4,88-9,76)	14,76 ± 2,310 (9,76-19,52)	5,71 ± 1,261 (4.88-9.76)	4,81 ± 1,490 (2,44-7,32)
Racimos *Brachiaria* spp (18-08-00, campo J. Miles, Santa Rosa)	16,86 ± 2,798 (12,2-21,96)	6,53 ± 1,143 (4,88-7,32)	17,34 ± 2,297 (14,64-21,96)	6,85 ± 0,962 (4,88-7,32)	6,34 ± 1,201 (4,88-7,32)
Racimos *B. brizantha*, N CIAT 16154 (19-08-99, Santa Rosa)	12,93 ± 2,560 (7,32-19,52)	4,90 ± 0,244 4,88-7.32)	12,81 ± 1,712 (9,76-17,08)	5,09± 0,701 (4,88-7,32)	4,31 ± 0,088 (2,44-7,32)
Racimos *B. brizantha* NCIAT 16156 (19-08-99, Santa Rosa)	12,74 ± 1,719 (9,76-17,08)	5,08 ± 0,665 (4,88-7,32)	12,96 ± 1,890 (9,76-19,52)	5,15 ± 0,767 (4,88-7,32)	4,59 ± 0,797 (2,44- 4,88)
Aislamiento 100 PDA ((19-08-99) *B. brizantha* NCIAT 16154)	14,10 ± 1,788 (12,2-19,52)	5,12 ± 0,735 (4,88-7,32)	15,64 ± 2,883 (9,76-21,96)	6,1 ± 1,321 (4,88-9,76)	4,88 ± 1,387 (2,44-7,32)

Tabla.4 Dimensiones de las conidias de *Sphacelia* spp en algunas gramíneas

Hospedero	Tipo de conidias			Referencia
	Macroconidias ovaladas	Macroconidias piriformes	Microconidias esféricas	
Sorgo	13,2 x 7,3	12,1 x 7,2	3 - 4	Bandyopadhyay et al, 1990
Sorgo	13,74 (± 0,25) x 6,64 (± 0,15)	13,6 (±0,25) x 6,25 (±0,15)	6,23 (± 0,23)	Varón et al, 1996
Digitaria sanguinalis	13,33 x 7,33	12,25 x 6,11	4,17	Varón y Huertas, 1997
Brachiaria spp	15,00x 4,5			Fernandes et al, 1995
Brachiaria spp	10-20 x 3-6			Lenné, 1994
Brachiaria spp	12,74 - 14,10 x 4,90 - 6,53	12,81 – 17,34 x 5,09 - 6,85	4,81 – 4,88	Presente estudio

Pruebas de patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad del hongo aislado en racimos inoculados bajo condiciones de invernadero resultaron negativas. Posiblemente las condiciones ambientales no fueron las adecuadas para favorecer la interacción patógeno-hospedante, particularmente la temperatura, ya que en más de una ocasión ésta estuvo alrededor de los 40^{0}C y en la madrugada la alcanzo los 15 °C; bajo estas condiciones es muy probable que se haya afectado el desarrollo normal del hongo y por ende su capacidad de colonización de los tejidos del ovario,

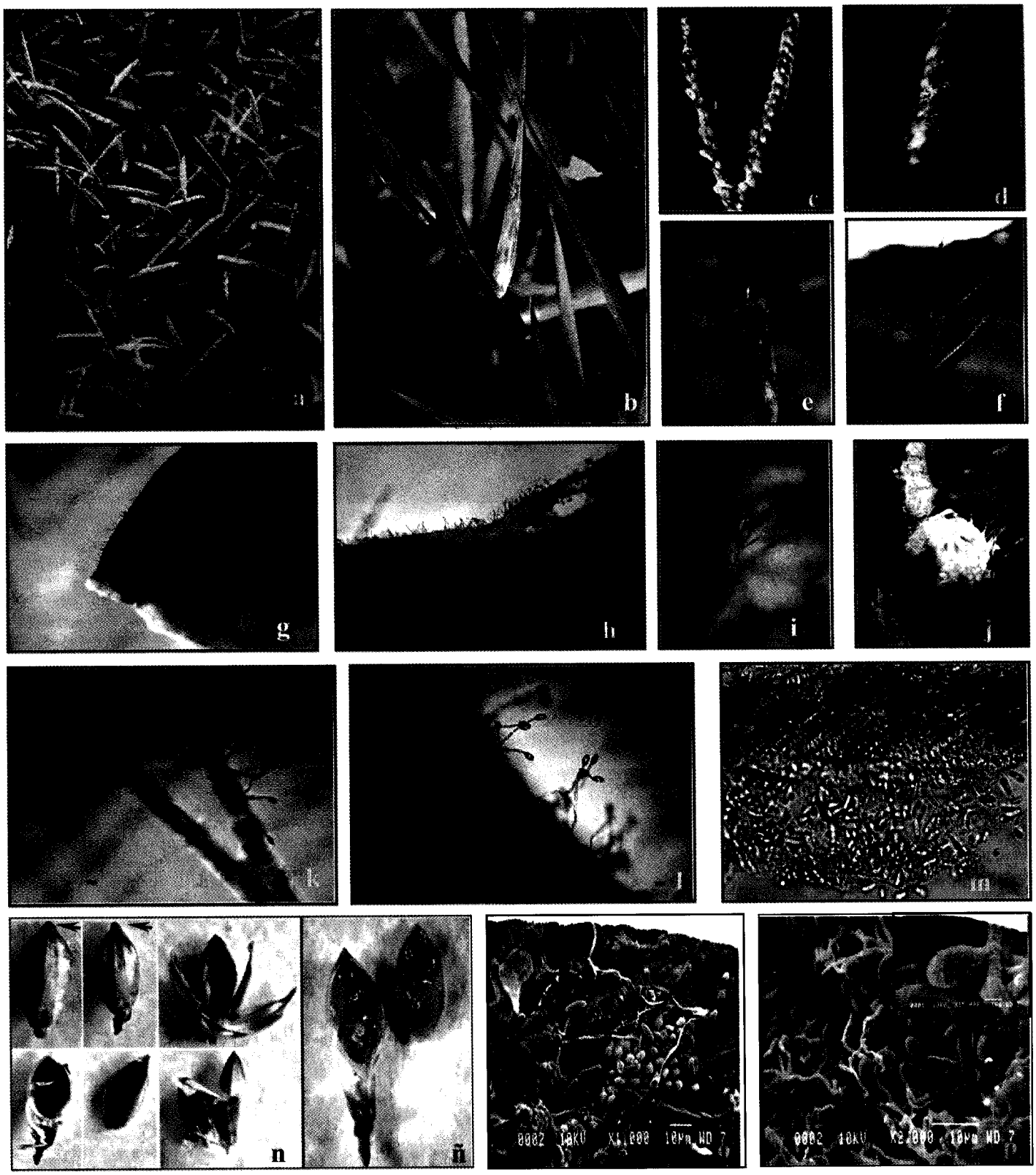

Figura 1. Sintomatología del mal de azúcar en *Brachiaria* spp. **a.** Plantas severamente afectadas, nótese el crecimiento fungoso blanco recubriendo las inflorescencias, **b.** Crecimiento de *Sphacelia* sp en la base de la lámina foliar, **c**. Racimos florales mostrando crecimiento fungoso blanco y exudado de color amarillo oro en algunas espiguillas, **d**. Racimo floral con espiguillas mostrando crecimiento fungoso blanco e inicio de la colonización del exudado por otros hongos de color negro (*Cerebella* spp); **e.** Espiguilla mostrando colonización avanzada del exudado por *Cerebella* sp. ; **f.** Inflorescencia sin infección; **g**. Ataque inicial de Sphacelia en una espiguilla, nótese el crecimiento de aspecto velloso tenue hacia la periferia de la espiguilla ; **h.** Gluma mostrando crecimiento de aspecto velloso en la superficie; **i**. Tricoma de una espiguilla mostrando ataque inicial de *Sphacelia* spp., **j.** Espiguilla y tricomas con ataque avanzado de *Sphacelia* sp.; **k.** Fotomicrografia de un tricoma mostrando conidias secundarias en el ápice de conidióforos simples; **l.** Detalle de la superficie de un tricoma mostrando conidias y conidioforos; **m.** Corte de la costra superficial de una gluma, nótese la gran cantidad de conidias (Longitud de la barra 10 m en **k, l, m**); **n.** Aspectos generales del ataque de *Sphacelia* sp en espiguillas, parte superior izquierda intactas: nótese la presencia de exudado en el ápice, parte superior derecha espiguilla a la cual se le seccionó una de las brácteas y se muestra la carencia de cariópside en el interior, en el ángulo inferior izquierdo se muestran las brácteas de una espiguilla en cuyo interior se observa una masa oscura y a la derecha porción de una gluma mostrando exudado; **ñ**. Detalle de las brácteas de una espiguilla mostrando el exudado viscoso en su interior en reemplazo de la cariópside ; **o, p.** Fotomicrografías al microscopio electrónico de barrido de la costra observada en las espiguillas, obsérvese la presencia de conidias de diferentes formas y tamaños, (Fotografías **a** hasta **ñ**, B. Pineda L, LSG; **o, p**: J.A. Arroyave , Unidad de Virología CIAT)

influencia en la infección por *Sphacelia* spp. Hasta ahora se sabe que *B. brizantha* y otras especies del género poseen apomixis facultativa (Hopkinson et al, 1998), y que la polinización es necesaria, ya sea que las semillas se desarrollen sexualmente o por apomixis (Do Valle y Savidan, 1998), pero se desconoce su efecto sobre el periodo crítico de la infección por el patógeno.

Las observaciones realizadas durante el estudio, especialmente la disección de las espiguillas, los signos analizados y la sintomatología expresada en las inflorescencias permitieron concluir que la afección observada correspondía a la descrita como mal se azúcar o ergotismo en gramíneas (Lenné, 1990; Lenné 1994, Fernández et al, 1995 Bandyopadhyay et al.,1990; Bandyopadhyay, et al,1996; Bandyopadhyay et al,1998), ocasionada por patógenos selectivos que infectan únicamente una determinada clase de tejidos, en este caso los del pistilo (Bandyopadhyay et al, 1996). Su efecto se traduce en el reemplazo del óvulo y el ovario por las estructuras del hongo, una vez establecida la infección, sin que se logre el desarrollo de la semilla.

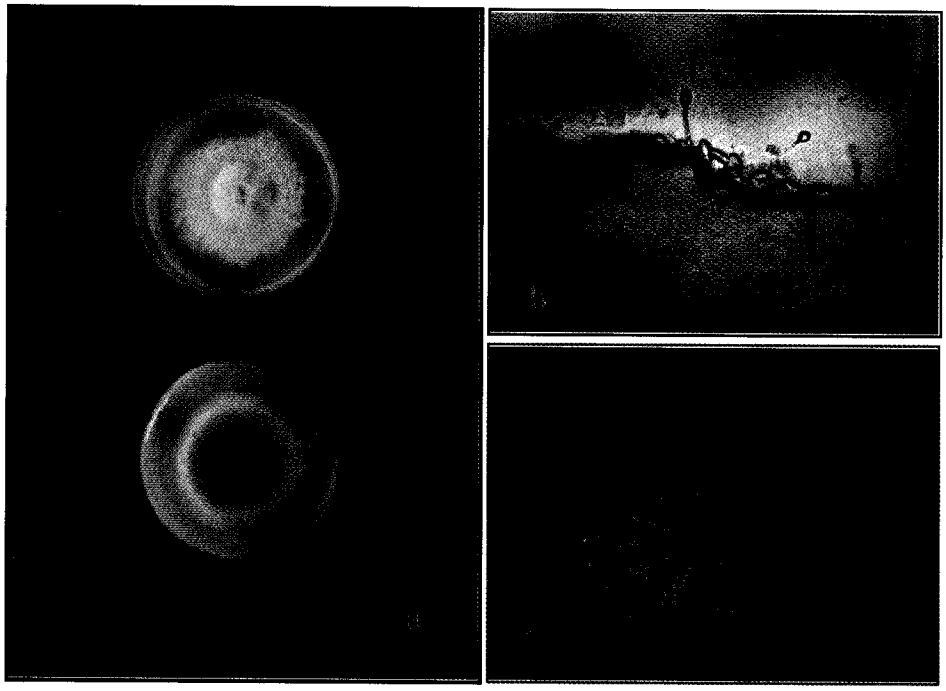

Figura 2. **a** Colonias de *Sphacelia* sp. creciendo en medio de cultivo PDA vistas por el reverso (Arriba) y por el anverso (Abajo), **b**. Fotomicrografía (40 x) mostrando la formación de conidias secundarias sobre conidioforos simples, a partir de macroconidias en un microcultivo; **c**. Fotomicrografía (40x) de macro y microconidias (Barra en **b** y **c** 10 µm). Fotografías **a** Sandra X.Garcia, **b, c** B. Pineda L , LSG

Identificación del agente causal. Los aislamientos a partir del exudado e inflorescencias realizados en medio de cultivo PDA, mantenidos a 28°C, mostraron la presencia de un hongo de crecimiento muy lento (11,5 cm/ mes) en colonias densas de color blanco a rosado claro, sobre las cuales se observaba, alrededor de la las dos semanas de iniciada la formación de la colonia, la presencia de exudado de color dorado a café claro formando anillos concéntricos. Al reverso de la caja se observó que la colonia era de color naranja a rosada muy clara (Figura 2). El examen microcópico del exudado de las colonias mostró conidias semejantes a las observadas en las preparaciones del exudado originalmente tomado de las espiguillas.

La identificación del hongo, con relación al género se realizó mediante comparación de las características de las colonias, además de forma y tamaño de las conidias con las descripciones y gráficas de la literatura especializada, (Barnnet y Hunter, 1998; Fernandes et al,1995; ICRISAT, 1993) resultando similar a *Sphacelia* sp., agente causal del mal de azúcar o "Honey dew" en *Brachiaria* spp. (Fernandes et al, 1995) y en sorgo (Bandyopadhyay et al,1990; Bandyopadhyay, et al, 1996; Bandyopadhyay et al, 1998) Por otra parte los síntomas observados y su desarrollo, son similares a los descritos para la misma enfermedad en otras Gramíneas, especialmente sorgo (Bandyopadhyay et al, 1996; Bandyopadhyay et al, 1998; Bandyopadhyay et al; 1990, Fernandes et al, 1995; Futrell y Webster 1966).

No se observó la presencia de esclerocios típicos del hongo *Claviceps* spp (teleomorfo de *Sphacelia* spp.) posiblemente por efecto de condiciones ambientales, como la precipitación, puesto que la zona del estudio durante las evaluaciones se presentaron lluvias abundantes Adicionalmente, en estas condiciones la presencia de hongos como *Cerebella* sp. (*Epicoccum* sp.), *Fusarium* sp. y *Cladosporium* sp. probablemente pudieron inhibir la formación de esclerocios, situación que estaría de acuerdo con lo expresado de Futrell y Webster, (1966), para la enfermedad Mal de azúcar en sorgo.

La identificación de la especie aún esta en progreso y se requiere acopiar más información y observaciones de campo, especialmente la búsqueda del esclerocio característico y del estado telemórfico, elemento fundamental para la clasificación. Eventualmente podría tratarse del anamorfo de la especie *Claviceps sulcata* Langdon registrada en África (Lenné, 1990; Lenné et al 1994) y en Brasil (Fernandes et al, 1995) o de la fase anamórfica de alguna de las tres especies de *Claviceps* registradas (Bandyopadhyay et al, 1996) que afectan el sorgo (*C. sorghi*, *C. africana* y *Claviceps* spp, posiblemente *C. panicoidea*), si se tiene en cuenta el rango de hospedantes de estos patógenos, que incluyen entre otras especies a *Brachiaria mutica*, y *Brachiaria brizantha* (Bandyopadhyay et al,1996; Futrell, Webster, O. J. 1966).

Evaluación de incidencia y severidad. En cumplimiento para lo establecido en materiales y métodos las lecturas de la incidencia en el campo empezaron cuando las parcelas se encontraron cerca del 100% de floración; sin embargo se presentaron algunas dificultades por la alta variabilidad en la época de la floración de las accesiones. De otra parte la infección no comenzó al mismo tiempo en todas las accesiones (Tabla 5), probablemente por su ubicación dispersa dentro del terreno o por diferencias en la susceptibilidad de las accesiones.

Analizando en detalle la incidencia la accesión 16462, de la especie *B. brizantha*, presentó el valor más alto durante las evaluaciones realizadas, comenzando con 90,8% hasta alcanzar hasta el 100% de incidencia (Tabla 5); situación que indica que la enfermedad progresó muy rápidamente invadiendo las inflorescencias, prácticamente desde el momento mismo de la apertura floral. Otras accesiones con porcentajes de incidencia relativamente alta fueron: la 664 y la 16502 de la especie *B. decumbens*, la 16462, de la especie *B. brizantha*, y la 16468 de *B. jubata*, (Tabla 5).

Las accesiones que presentaron un bajo porcentaje de incidencia de enfermedad a través de todas las evaluaciones fueron la 16459, la 26891, la 16532, y la 16176, todas pertenecientes a la especie *B. jubata* 12 horas y humedad alta mantenida con bolsa El hecho de presentar un porcentaje de baja incidencia podría ser un indicativo de algún grado de resistencia a la infección, que de comprobarse sería de gran utilidad para el manejo de la enfermedad y para la producción de semilla.

Las diferencia en los porcentajes para las accesiones 16462, 16156, 16177, 16468, y 26641, entre las lecturas realizadas, se explicarían por la distribución no uniforme de la enfermedad dentro de la parcela, reflejada al momento de la evaluación en la lectura con el marco de madera lanzado al azar. También pudo ocurrir que en las últimas etapas de la

Tabla 5. Incidencia y severidad del mal de azúcar en accesiones de *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens* y *B. jubata* durante cuatro evaluaciones

Especie	No CIAT	Lecturas							
		23-09-99		07-10-99		21-10-99		02-12-99	
		Incid.[1]	Sever.[2]	Incid.	Sever.	Incid.	Sever.	Incid.	Sever.
B. brizantha	16290	0,0	2	12,1	3	14,7	4		
B. brizantha	16348	0,0	0	0,5	2	4,6	4		
B. brizantha	6682	0,9	3	3,6	3	6,1	4		
B. brizantha	16125	1,9	2	22,1	3	89,7	4		
B. brizantha	16470	14,9	3	53,4	4	94,9	5		
B. brizantha	16335	2,6	2	89,1	3	89,3	5		
B. brizantha	26124	0,6	2	15,1	3	94,1	4		
B. brizantha	26991	2,5	3	15,2	3	91,0	4		
B. brizantha	16156	5,2	2	15,2	2	67,2	3	5,4	4
B. brizantha	16462	90,8	4	100,0	4	97,9	4	100,0	4
B. brizantha	26745	NF		0,5	2	8,1	3	22,6	4
B. brizantha	16288	0,9	2	0,5	2	0,5	3	13,4	4
B. brizantha	26131	0,0	0	0,5	2	0,5	2	0,5	2
B. brizantha	16830	0,0	0	0,5	2	0,5	2	0,5	2
B. brizantha	26641	0,5	2	16,4	3	5,6	3	6,6	4
B. brizantha	16828	12,7	3	28,2	3	46,5	4		
B. brizantha	16331	2,9	2	0,9	2				
B. brizantha	16154	5,2	2	13,0	3	75,6	3		
B. decumbens	26187	0,9	2	1,5	3	4,1	3		
B. decumbens	16177	0,0	0	8,3	2	6,2	3	15,6	4
B. decumbens	16500	0,5	2	0,9	4	94,4	4		
B. decumbens	16502	0,0	0	31,2	3	96,6	3		
B. decumbens	16504	0,0	0	0,5	3	1,3	3		
B. decumbens	664	1,1	2	97,8	3	99,2	3		
B. decumbens	16133	1,9	2	0,9	3	4,7	4	5,0	4
B. jubata	16468	0,0	0	84,9	2	69,5	2		
B. jubata	16176	0,0	0	0,5	2	0,0	2	0,5	2
B. jubata	16532	0,9	2	0,5	2	0,0	3	0,5	4
B. jubata	26891	0,0	0	0,5	2	0,39	2	0,5	3
B. jubata	16459	0,0	0	0,5	2				

[1]Incidencia (Incid.) : % promedio de racimos florales afectados en cuatro lecturas con el marco de madera de 0,50 x 0,50 m [2]Severidad (Sever.) : **0** = Inflorescencias sin síntomas visibles ; **1** = Inflorescencias con exudado; **2** = Inflorescencias con exudado y crecimiento fungoso blanco escaso; **3** = Inflorescencias con crecimiento fungoso blanco abundante ; **4** = Inflorescencias parcialmente cubiertas por fructificaciones de hongos color negro, gris o verdoso; **5** = Inflorescencias totalmente cubiertas con fructificaciones de hongos color negro (Ver tabla 2). NF = No florecido

evaluación las semillas de la parcela madurarón y cayeron hasta el punto de no tener espiguillas para el conteo.

Los resultados del análisis de severidad (Tabla 5) para las diferentes accesiones mostraron que para algunas no hubo mayor variación manteniéndose entre el grado dos y el tres, mientras que para otras fue muy alta desde el comienzo hasta la última evaluación, como en el caso de la 16462 de la especie *B. brizantha*. Para otras accesiones el incremento de la severidad fue gradual desde el grado dos hasta el cuatro o cinco. En otras palabras la evolución de la enfermedad tanto en incidencia como en severidad fue muy variable, como era de esperarse, por la diversidad de los materiales evaluados.

De manera general fue posible establecer que el proceso de la enfermedad se inicia con el ataque temprano de las inflorescencias por *Sphacelia* sp. y que es posible visualizar el ataque de este patógeno desde los inicios de la floración hasta 1 o 2 meses después, antes de que las espiguillas sean cubiertas por hongos saprófitos.

Análisis de semillas. Los resultados obtenidos con las muestras de semillas no escarificadas indicaron que, al observar los precipitados al microscopio, estaban presentes las conidias de *Sphacelia* sp. en mayor o menor proporción, según la accesión. Cuando se examinaron las muestras de semillas escarificadas con ácido sulfúrico, la presencia de conidias fue notablemente menor, notándose que en las accesiones 16828, 16154 y 16125 de la especie *B. brizantha* aún después del tratamiento estaban contaminadas por el hongo (Tabla 6).

La presencia de esporas en los enjuagues de semillas no escarificadas indican que hubo contaminación de las partes externas de la semilla por las gotas azucaradas que escurren y el hongo que creció superficialmente; se desconoce si el hongo coloniza internamente el tejido de las estructuras seminales.

En el caso de las semillas escarificadas se podría explicar: o por que el tratamiento con ácido sulfúrico fue ineficiente o por cuanto en los residuos de las glumas que quedan en la base de las brácteas permanecen albergadas algunas esporas que se liberan en el proceso de obtención de los enjuagues.

No se realizó análisis de las semillas mediante siembra en medios de cultivo por cuanto el crecimiento excesivamente lento del hongo (1,5 cm /30 días) no permitía competir con otros patógenos (*Drechslera spp.*, *Phoma* spp, *Curvularia* spp, y saprofitos (*Cladosporium* spp., *Epiccocum*, spp. *Cerebella* spp., *Fusarium* spp) presentes usualmente en las semillas (Garcia y Pineda 2000) y que poseen mayor velocidad de crecimiento.

Tabla 6. Número de esporas de *Sphacelia* spp observadas en enjuagues de semillas no escarificadas y escarificadas de *Brachiaria* spp.

Especie	No CIAT	Esporas x 10 campos	
		Semilla no escarificada	Semilla escarificada
B. brizantha	16290	22	0
B. brizantha	16348	27	0
B. brizantha	6682	7	1
B. brizantha	16125	37	13
B. brizantha	16470	389	0
B. brizantha	26124	120	0
B. brizantha	26991	80	0
B. brizantha	16156	52	0
B. brizantha	16462	236	0
B. brizantha	26745	44	0
B. brizantha	16288	4	1
B. brizantha	26131	368	0
B. brizantha	16830	206	1
B. brizantha	26641	598	1
B. brizantha	16828	55	39
B. brizantha	16331	93	0
B. brizantha	16154	87	21
B. decumbens	16177	20	0
B. decumbens	16500	23	2
B. decumbens	16504	0	0
B. decumbens	664	78	0
B. decumbens	16133	22	0
B. jubata	16468	91	0
B. jubata	16176	96	0
B. jubata	26891	122	0

CONCLUSIONES

Las resultados del estudio permitieron concluir que el disturbio observado en los lotes de incremento de germoplasma de *Brachiaria* sp. de la Estación Santa Rosa correspondía a la descrita como mal se azúcar o ergotismo en gramíneas ocasionada por *Sphacelia* spp., patógeno selectivos que infectan únicamente el pistilo (Bandyopadhyay et al, 1996) sin permitir la formación de semillas. También fue posible determinar como el hongo infesta las glumas.

El registro de esta enfermedad en Colombia es de gran importancia, no sólo desde el punto de vista de su efecto en la producción de semilla (calidad y cantidad) en las etapas de multiplicación y refrescamiento de germoplasma, sino también por el hecho de ser una enfermedad ocasionada por un hongo productor de alcaloides como la ergotamina, que al ser ingerida por ovinos, bovinos y equinos, provoca alteración del sistema nervioso central, fiebre, problemas reproductivos (falta de concepción, aborto), o la muerte (Fernandes et al, 1995), situación que amerita un estudio detallado en las zonas del país donde se utili-

za el *Brachiaria* para alimentación del ganado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CIAT y al MADR por el apoyo financiero, a Daniel Debouck por animarnos a emprender el estudio y facilitar los recursos necesarios para el mismo, así como por sus valiosos comentarios para la elaboración de este documento. También hacen extensivos sus agradecimientos a José Luis Ramírez, Luz Edith Tavarez, María del S. Balcazar, Arsenio Ciprian, Edwin Rivera, por su colaboración y ayuda.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, K. y Sinclair, B. 1987. Principles of seed pathology (Vol II). CRC Press. Boca Raton , Florida. p34

Aricapa, G y Correa, F. 1994. Almacenamiento de hongos sobre papel de filtro. Ascolfi Informa 20(3): 29-30

Bandyopadhyay, R., Frederickson, D. E., McLaren, N. W.; Odvody, G. N. y Ryley, M.J. 1998. Ergot: a new disease threat to Sorghum in the Americas and Australia. Plant Disease 82 (4): 356-367.

Bandyopadhyay, R., Frederickson, D. E., McLaren, N. W. y Odvody, G. N. 1996. Ergot a Global Threat to sorghum. International sorghum & Millets Newsletter 37:1-27.

Bandyopadhyay, R., Mughogho, L. K. , Manohar, S. K. y Satyanaryana, M. V. 1990. Stroma development, honeydew formation, and conidial production in *Claviceps sorghi.* Phytopathology 80: 812-818

Barnett, H. y Hunter, B. 1998. Illustrated genera of imperfect Fuhgi. 4th Ed. APS Press. St Paul, Minnesota, USA. 218 p

Buriticá Pablo. 1999. Directorio de patógenos y enfermedades de importancia económica en Colombia. Produmedios, Bogotá. p 64

Chagas, D y Oliveira, 1983. Fungos Associados a sementes de Gramineas e Leguminosas forrageiras. Fitopatología Brasileira 8: 131-135.

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

Do Valle, C. B. y Savidaan, Y. H. 1998. Genética, Citogenética y Biología Reproductiva de *Brachiaria.* In: Miles, J. W.; Maass, B. L. y Kumble,V (Eds). 1998. Brachiaria: Biolgía, agronomía y mejoramiento. CIAT, Cali Colombia y EMBRAPA/CNPGC, Campo Grande , Brasil. p163-180.

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

Futrell, M. C. y Webster, O. J. 1966. Host range and Epidemiology of the sorghum ergot organism. Plant Disease Reporter 50:828-831.

García D. , S. X. y Pineda L., B. Reconocimiento de enfermedades fungosas transmitidas por semilla en germoplasma de *Bachiaria* spp. Fitopatología Colombiana 24(2): 39-46

Granada, G. A. y Rengifo, P. 1997 Determinación de rango de hospederos de *Sphacelia sorghi,* In: ICA. I997. Informe Final de resultados en cumplimiento del plan operativo para atender la emergencia sanitaria en sorgo causada por el hongo *Sphacelia sorghi.* Laboratorio de Diagnostico Sanidad Vegetal ICA, Palmira. p 40-43

Hopkinson J. M.; de Souza F.H.D.; Diulgheroff, S. ; Ortiz, A y Sánchez, M. 1998., Fisiología reproductiva, Producción de semilla y calidad de la semilla en el género *Brachiaria.* In: Miles, J. W.; Maass, B. L. y Kumble,V (Eds). 1998. Brachiaria: Biolgía, agronomía y mejoramiento. CIAT, Cali Colombia y EMBRAPA/ CNPGC, Campo Grande , Brasil. p139.

ICRISAT. 1993. A pictorial Guide to the Identification of seedborne fungi of Sorghum, Pearl Millet, Finger Millet, Chickpea, Pigeonpea, and Groundnut. Information Bulletin No. 34 p 193.

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

Lenné, J. M. 1984. Patógenos en semillas de plantas forrajeras tropicales significancia, detección y manejo. In Primercurso internacional sobre colección, evaluación de germoplasma y producción de semillas forrajeras tropicales, Panamá, 1984. Memoria Instituto e Investigación Agropecuaria de Panamá. p 143 – 175.

-------- y Ordóñez, 1988. Establecimiento y Renovación de Pasturas: Conceptos, experiencias y enfoque de la investigación. Lascano, C. y Spain, J. VI Reunión del Comité Asesor de la Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales (RIEPT)., Memoria. Veracruz, México, Nov. de 1988. CIAT Cali Colombia. p. 53-73

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

Lenné, J. M. 1994. Diseases of other Pasture Grasses . In: Lenné, J. M. y Trutman, P. (Eds) 1994. Diseases of tropical Pasture Plants. CAB International, UK at the University Press, Cambridge. p.172-173

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

Neergaard, P. 1977. Seed pathology. Halted Press, a division of John Wiley and Sons, Inc. New York . p 731

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

Rivas, L y Holmann. F. 1999. Adopción temprana de *Arachis pintoi* en el trópico húmedo: El caso de los sistemas ganaderos de doble propósito en el Caquetá, Colombia. Pasturas Tropicales 21 (1):6

Trutmann, P. 1994. Diseases of tropical Pastures in Central and South America. In : Lenné, J. M. y Trutman, P. (Eds) 1994. Diseases of tropical Pasture Plants. CAB International, UK at the University Press, Cambridge. p. 307-311.

Varón de A, F. , Huertas, C. A. y Granada G. A. 1996. Mal de azúcar del sorgo en Colombia. Ascolfi Informa.22(6): 78-83

Varón de A., F y Huertas, Carlos A. 1997. Estudios biológicos y epidemiológicos de *Sphacelia sorghi* (Primera parte). In: ICA. I997. Informe Final de resultados en cumplimiento del plan operativo para atender la emergencia sanitaria en sorgo causada por el hongo *Sphacelia sorghi.* Lab. de Diagnostico Sanidad Vegetal ICA, Palmira. p 84-91.

Reprinted with permission from ASCOLFI. Originally published in Fitopatología Colombiana 25(2):55-62, Copyright 2001