

Conidios Secundarios de *Septoria apiicola* Speg. I. Comparación con las Picnidiosporas. Medios de Cultivo que Estimulan la Producción de los Dos Tipos de Esporas¹

S Wolcan*

ABSTRACT

The aim of this paper is: 1) the study of several characteristics of *S. apiicola* secondary conidia (free conidia), under different conditions; and 2) the selection of the artificial media that stimulate the abundant production of those conidia and picnidiospores. After test results, the smear technique was adopted using as inoculum any of the two kinds of spores, as opposed to the point inoculation method. For the secondary conidia production, PDA, Fries modified agar and V₈ juice agar were the best media. They were incubated for seven days. For picnidiospore production, malt extract agar with peptone, yeast and Czapek Dox V₈ juice agar were the best. They were incubated for 15 days. When the selected media were used, the secondary conidia production was more stimulated in controlled alternate light and darkness treatments, both with cool white light and near-ultraviolet light. It was significantly greater than in continuous darkness. The picnidiospore production was only significantly increased in alternate near ultraviolet light-darkness treatment in relation to constant darkness. Morphobiometric data of the two kinds of spores are included.

INTRODUCCION

Especies de *Septoria*, tales como *S. tritici* (7) y *S. lycopersici* (8), en medios de cultivo sintéticos o semisintéticos producen, además de las picnidiosporas propias del género, conidios secundarios. Estos conidios son esporas producidas en forma libre por germinación de picnidiosporas, brotación de micelio joven o por división binaria o germinación de otros conidios secundarios (7).

¹ Recibido para publicación el 23 de abril de 1986.
Trabajo realizado en la Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, UNLP.
La autora agradece al Ing. R. Boggio por su participación en la resolución de los análisis estadísticos y al Ing. H. Alippi por la lectura crítica del manuscrito.

* Becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas bajo la dirección de los Ings. Agrs. H. Alippi y L. Ronco. Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, 60 y 119, C.P.: 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina.

COMPENDIO

Los objetivos de este trabajo consistieron en: 1) estudiar diversas características de los conidios secundarios (conidios libres), producidos por *Septoria apiicola* Speg. sobre sustrato artificial, bajo distintas condiciones y 2) seleccionar los medios de cultivo capaces de estimular la producción abundante de dichos conidios y de las picnidiosporas. A partir de los resultados de los ensayos se adoptó la técnica de siembra en extendido usando como inóculo cualquiera de los 2 tipos de esporas, en oposición a la siembra puntual. Para la producción de conidios secundarios se destacaron los medios APG, agar Fries modificado y agar V₈, incubados durante siete días, y para la producción de picnidiosporas los medios agar extracto de malta con peptona y levadura y agar Czapek Dox V₈, incubados durante 15 días. Sobre los medios seleccionados la producción de conidios secundarios se estimuló igualmente en regímenes con alternancia controlada de luz y oscuridad (con presencia o ausencia de irradiación ultravioleta), superando significativamente al régimen de oscuridad continua. La producción de picnidiosporas sólo se incrementó significativamente en el régimen con luz ultravioleta, con relación al de oscuridad. Se incluyen datos morfobiométricos de los 2 tipos de esporas.

En el caso de *S. apiicola*, agente causal de la viruela del apio, hay pocas referencias al respecto. Campanille (4) menciona la formación de esporas secundarias no septadas o fragmentables en varias esporas, originadas por la germinación de picnidiosporas; Gabrielson y Grogan (6) informan del crecimiento inicial de tipo levaduriforme que muestran las colonias de esta especie, al igual que el aspecto del borde de las mismas, refiriéndose seguramente a la formación de estos conidios, pero sin particularizarlos.

El objetivo de este trabajo consistió en estudiar el comportamiento de los conidios secundarios de *S. apiicola* al desarrollar sobre sustrato natural, comparándolo con el de las picnidiosporas. Con estos datos preliminares, posteriormente, se indagará sobre el papel que desempeñarían en el ciclo natural del patógeno.

MATERIALES Y METODOS

Se repicaron picnidiosporas de *S. apiicola* a tubos inclinados con APG mediante la técnica de extendido

de esporas. Después de cuatro o cinco días, se desarrolló una masa de abundantes conidios secundarios, los cuales se emplearon como inóculo para realizar los siguientes ensayos:

Efecto de dos tipos de siembra

Con un gancho se tomaron volúmenes homogéneos de conidios secundarios y se sembraron en un solo punto en ocho tubos inclinados con APG y mediante extendido en otros ocho tubos. Del mismo modo, se trabajó usando picnidiosporas como inóculo. La mitad de las repeticiones se observó a los siete días para evaluar la producción de conidios secundarios y la otra mitad se mantuvo en observación hasta los 20 días para observar la evolución del desarrollo de las colonias en los distintos tratamientos.

Efecto de distintos medios de cultivo

Se probaron 13 medios de cultivo dispuestos en tubos inclinados y sembrados en extendido. Se hicieron ocho repeticiones de cada uno, al efecto de observar la mitad a los siete días para evaluar la producción de conidios secundarios y la otra mitad a los 20 días para evaluar la producción de picnidiosporas.

Los medios de cultivo ensayados fueron: agar de papa glucosado = APG (1); agar V_8 = AV_8 (10); agar harina de avena = AHA (1); agar ciruela = ACi (1); agar extracto de malta = AEM (1); agar Czapek Dox = AC (1); agar Martin = AM (2); agar Leonian = AL (9); agar Fries modificado = AFM (3); agar nitrato de calcio = AN (8); agar Czapek Dox V_8 (5) modificado = ACDV (800 ml de solución de Czapek Dox, 200 ml de jugo V_8 y 17 g de agar); agar apio = AA (300 g de hojas de apio licuadas y filtradas, 17 g de agar y 1000 ml de agua destilada); agar extracto de malta con peptona y levadura = AMPL (30 g extracto de malta, 5 g de peptona de carne, 2 g de extracto de levadura, 17 g de agar y 1000 ml de agua destilada).

En los ensayos a y b se incubó a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, con alternancia de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, incluyendo el periodo luminoso 12 h de irradiación ultravioleta.

Efecto de distintos regímenes luminosos

Se incubaron colonias sobre APG para la obtención de conidios secundarios y sobre ACDV para la de picnidiosporas, en 4 regímenes luminosos: 1) alternancia de 12 h de luz y 12 de oscuridad (L/O); 2) alternancia de 12 h de luz y 12 de oscuridad incluyendo un periodo luminoso de 12 h de irra-

diación ultravioleta (LV/O); 3) oscuridad continua, lograda al envolver los tubos con papel de aluminio (O) [en 1), 2) y 3) la temperatura fue de $20 \pm 1^\circ\text{C}$]; y 4) en mesa del laboratorio (L) (aproximadamente 12 h de luz pero de poca intensidad y temperatura de $15-20^\circ\text{C}$). La evaluación de los conidios secundarios se realizó a los siete días y la de picnidiosporas a los 14 días. Se hicieron 4 repeticiones de cada tratamiento.

En los ensayos a y c las suspensiones de conidios secundarios se prepararon agregando 5 ml de agua destilada a cada tubo, raspando la superficie de la colonia con un ansa. El recuento de esporas se efectuó con ayuda de la cámara de Neubauer. Los resultados se analizaron estadísticamente aplicando el método de varianza y la prueba de Duncan.

En el ensayo b se trabajó con suspensiones de conidios de 3 ml y se aplicó la prueba de Tukey. La elección del medio de cultivo que favoreció la producción de picnidiosporas se hizo sobre la base de la observación macroscópica de las colonias. Se tuvo en cuenta la producción de cirros porque al preparar las suspensiones de esporas se arrastraban conidios secundarios y éstos, observados bajo el microscopio, en muchos tratamientos no pudieron distinguirse morfológicamente de las picnidiosporas.

En el ensayo c el recuento de picnidiosporas se hizo de igual manera que el de conidios, pero las suspensiones se prepararon raspando los cirros con ayuda de un pincel de cerdas suaves.

Características de las esporas

Se sembraron conidios secundarios y picnidiosporas en gota pendiente de agua destilada estéril, en cámara de Van Tieghen (2). A los 2 días se observaron las características de los 2 tipos de esporas. Paralelamente, se midieron picnidiosporas desarrolladas sobre ACDV luego de 14 días de incubación, y conidios secundarios desarrollados sobre APG luego de siete días.

RESULTADOS

Efecto de dos tipos de siembra

En la Fig. 1 se pueden observar las cantidades promedio de conidios secundarios producidos a partir de los distintos tipos de siembra luego de siete días de incubación. Se destaca la superioridad de la técnica de extendido sobre la siembra puntual (cualquiera sea el tipo de inóculo empleado).

El análisis estadístico confirmó esta observación acusando diferencia significativa ($P = 0.05$) entre los

2 tipos de siembra, no así entre los 2 tipos de inóculo dentro de cada siembra.

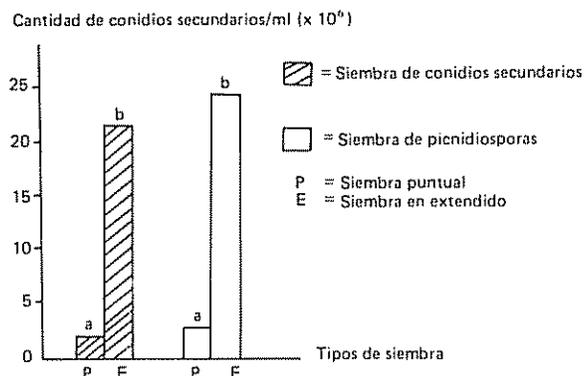


Fig. 1. Cantidades de conidios secundarios de *S. apiicola* (expresadas en esporas/ml en una suspensión de 5 ml), producidos sobre APG, según el inóculo y el modo de siembra. Observación a los 7 días. Las distintas letras sobre las barras indican tratamientos significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Duncan ($P = 0.05$)

El aspecto de las colonias, en todos los casos, fue de tipo levaduriforme, brillante y mucoso, color canela-rosado, superficie con elevaciones y depresiones.

En las colonias de origen puntual el desarrollo se extendió pocos mm a partir del punto de siembra. Cuando se sembró con extendido de esporas, toda la superficie afectada se cubrió con una densa capa de conidios secundarios, multiplicándose la producción de los mismos.

La evolución de las colonias originadas a partir de cualquiera de los dos tipos de esporas no mostró diferencias. Por el contrario, las colonias originadas a partir de los dos tipos de siembra, difirieron entre sí. Las de origen puntual fueron elevadas, de superficie rugosa, oscuras (debido al envejecimiento de los conidios secundarios iniciales y a la estromatización del micelio), con poca cobertura miceliar gris, picnidios maduros distribuidos en forma homogénea, borde y centro de la colonia con conidios secundarios de formación reciente, color canela-rosado. Las originadas a partir de la siembra en extendido, también de aspecto rugoso pero no elevadas, semejantes a las anteriores sólo en la porción con más cantidad de medio de cultivo. La mayor superficie de la colonia estaba compuesta por conidios secundarios oscuros, envejecidos, con algunos picnidios aislados.

Efecto de distintos medios de cultivo

Conidios secundarios

En el análisis estadístico se determinó que en la producción de conidios secundarios no hubo diferencia significativa entre los medios APG, AFM y AV₈, los cuales superaron significativamente ($P = 0.01$; $DMS = 80.05$) al resto de los medios de cultivo (Fig. 2).

Picnidiosporas

A los 20 días de incubación, sobre AN y AA no desarrollaron fructificaciones; en AHA y AC se observaron pocos picnidios inmaduros; sobre APG, AV₈, AM, AEM y AL se registraron cirros de distribución dispareja; sobre AMPL y ACDV la producción de fructificaciones maduras fue muy abundante y de distribución homogénea. Sobre estos dos últimos medios podían distinguirse cirros desde los 11 días de la siembra, siendo numerosos a partir de los 14 días.

En todos los tratamientos se pudo observar la cobertura inicial de conidios secundarios, los cuales, al envejecer, fueron oscureciéndose y perdiendo su capacidad de germinar.

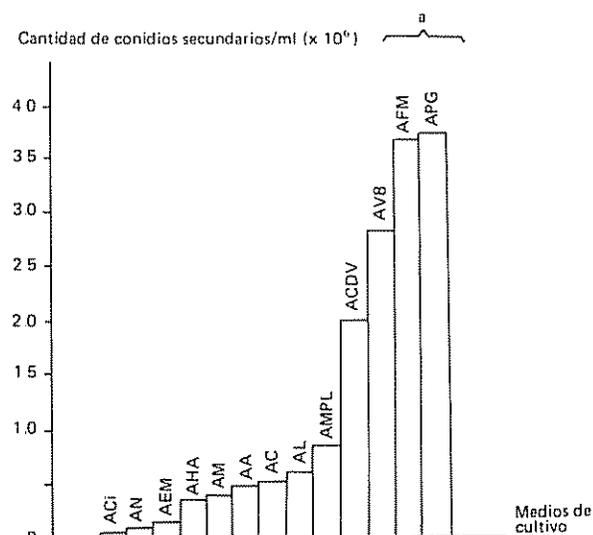


Fig. 2. Producción de conidios secundarios de *S. apiicola* sobre 13 medios de cultivo. Observación a los 7 días. a: medios que se destacaron significativamente del resto ($P = 0.01$; $DMS = 80.05$).

Mantenimiento de las colonias

Se observó que, para prolongar la viabilidad de las colonias, se deben hacer repiques alternando los medios de cultivo y por lo tanto, el tipo de inóculo.

Fueron favorables los pasajes de conidios secundarios, cultivados hasta 10 días en APG, a ACDV. Las picnidiosporas de hasta 30 días producidas sobre este medio, se repicaron a APG, para reiniciar el ciclo. También, resultó aceptable la repetición de hasta tres pasajes sucesivos por el mismo medio, antes de cambiar al otro.

Efecto de distintos regímenes luminosos

Conidios secundarios

Al analizar los valores resultantes del ensayo con la prueba de Duncan, se observó una superioridad significativa ($P = 0.05$) en la cantidad de conidios secundarios producida en los dos regímenes con alternancia de luz controlada, con respecto al de oscuridad continua. Entre los tres tratamientos iluminados no se manifestó diferencia significativa (Fig. 3).

Cantidad de conidios secundarios/ml ($\times 10^6$)

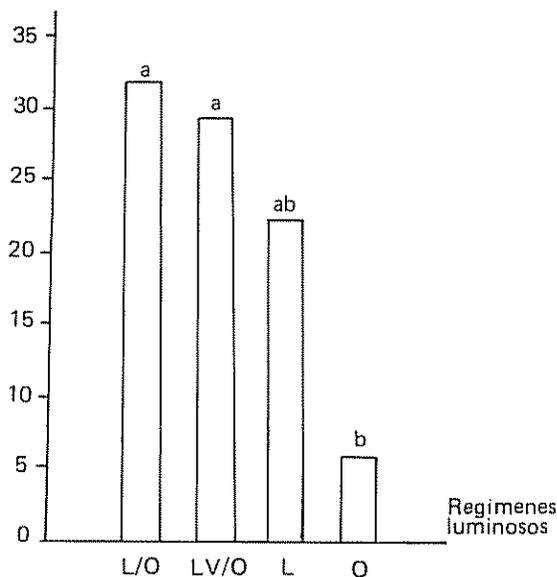


Fig. 3. Producción de conidios secundarios de *S. apicola* desarrollados sobre APG, en los distintos regímenes luminosos. Observación a los 7 días. Las distintas letras sobre las barras implican tratamientos entre los cuales hubo diferencia significativa ($P = 0.05$) según la prueba de Duncan.

Picnidiosporas

El análisis estadístico acusó diferencia significativa ($P = 0.05$) entre el tratamiento que incluye luz ultravioleta y el de oscuridad, estimulando el primero la esporulación. Entre los tres regímenes iluminados no hubo diferencia significativa. Tampoco entre el de oscuridad y los dos luminosos (excluyendo el de luz ultravioleta) (Fig. 4).

En las Figs. 3 y 4 puede apreciarse que la cantidad de conidios secundarios desarrollados en las condiciones más favorables para su producción (medio de cultivo y régimen luminoso) e incubados durante siete días, casi triplica la cantidad de picnidiosporas producidas en condiciones favorables e incubadas en el doble período de tiempo.

Características de las esporas

Conidios secundarios

Hialinos, cilíndricos o levemente curvos, con extremos redondeados, tortuosos, articulados, fragmentables. Dimensiones sobre APG: 15.0 a $37.5 \mu\text{m}$ (25.4) \times 2.5 a $4.6 \mu\text{m}$ (3.52), con 0 a 5 tabiques (Fig. 5a). En gota pendiente se hincharon y germinaron por cualquiera de sus células, originando nuevas esporas o micelio. Antes de germinar, muchas de ellas se fragmentaron a la altura de los septos (Fig. 5b).

Picnidiosporas

Hialinas, filiformes, generalmente con la célula basal algo ensanchada y la terminal aguzada. Dimensiones sobre ACDV: 30.0 a $71.0 \mu\text{m}$ (42.84) \times 3.7 a $4.0 \mu\text{m}$ (3.81), con tres a cuatro tabiques (Fig. 6a). En gota pendiente germinaron por cualquiera de sus células, principalmente las terminales, en menor cantidad que los conidios secundarios; produjeron micelio y conidios (Fig. 6b).

DISCUSION

Los medios de cultivo ensayados incluyeron aquellos ricos en vegetales, en sales minerales, combinados o pobres en elementos nutritivos. Los conidios secundarios, si bien fueron más abundantes en los medios ricos, se produjeron sobre todos los medios sin excepción. No así las picnidiosporas, que sólo prosperaron sobre algunos de los medios ricos. Por lo tanto, debido a las pocas exigencias nutricionales que manifestaron, es válido suponer que la producción de estos conidios se lleve a cabo en la naturaleza al combinarse condiciones favorables tales como temperatura, humedad, pH, etc.

En ensayos preliminares se comprobó la patogenicidad de los conidios, la cual, en un segundo trabajo, se comparará con la de las picnidiosporas (11).

Cantidad de picnidios poras/ml ($\times 10^6$)

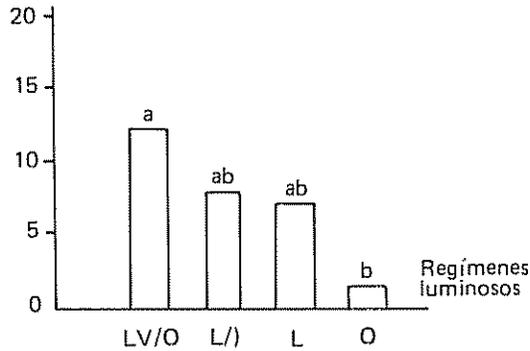


Fig 4 Producción de picnidiosporas de *S. apiicola* desarrolladas sobre ACDV en los distintos tratamientos luminosos. Observación a los 14 días. Las distintas letras sobre las barras indican tratamientos entre los cuales se manifestó diferencia significativa ($P=0.05$) según la prueba de Duncan)

Con respecto a la función que desempeñarían los conidios secundarios, dentro del ciclo de la enfermedad, ésta podría consistir en su difusión dentro del cultivo, al desarrollar sobre la planta o sobre el rastrojo aún en condiciones desfavorables para la producción de picnidios maduros.

Kurozawa y Balmer (8) obtuvieron conidios secundarios producidos por *Septoria lycopersici* al cultivar este hongo sobre suelos pobres esterilizados. Si bien aclaran que las condiciones naturales difieren de las ensayadas y podrían alterar el resultado, no descartan la posibilidad de que representen un elemento de perpetuación en el suelo. Esta consideración podría extenderse a *S. apiicola*.

CONCLUSION

De acuerdo con lo probado en estos ensayos resulta más ventajoso el empleo de conidios secundarios como inóculo para multiplicar el hongo en trabajos de laboratorio

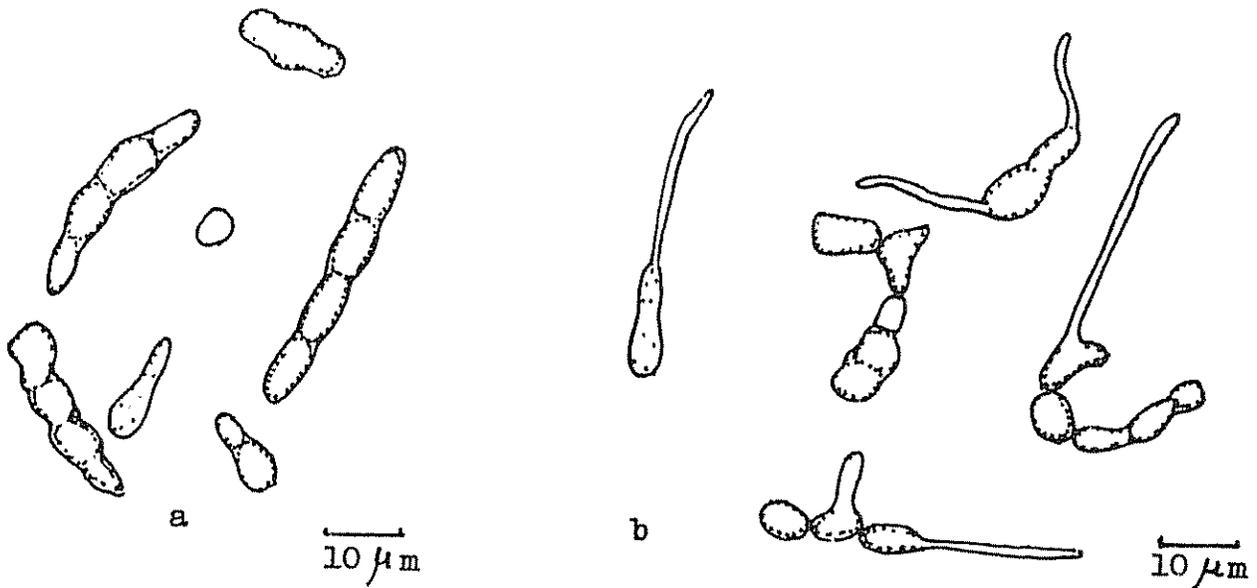


Fig. 5. Conidios secundarios de *S. apiicola*: a: esporas maduras desarrolladas sobre APG; b: esporas germinadas en agua destilada.

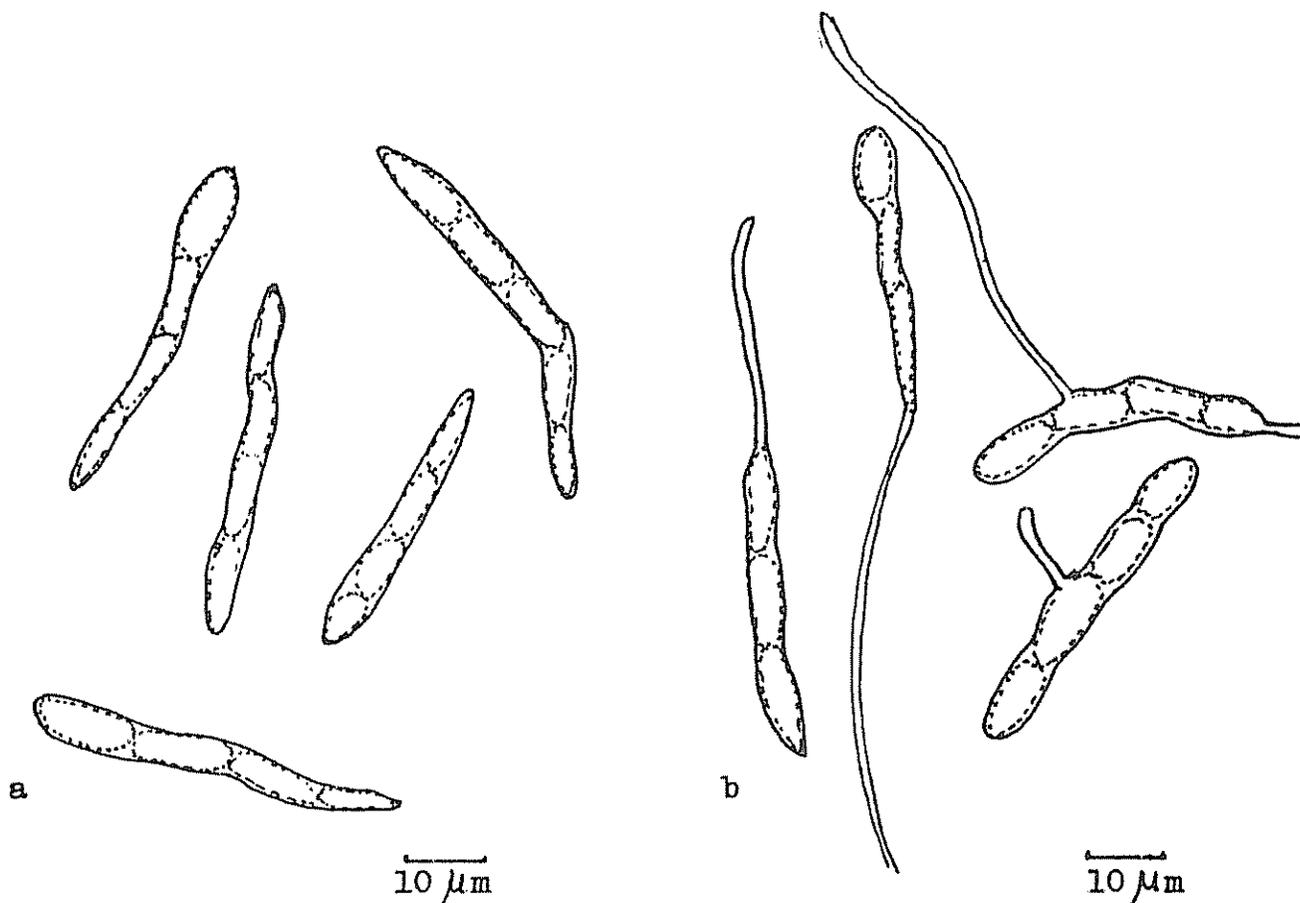


Fig. 6. Pienidiosporas de *S. apiicola*. a: esporas maduras desarrolladas sobre ACDV; b: esporas germinadas en agua destilada

LITERATURA CITADA

- 1 AINSWORTH, G.C. 1971. Dictionary of the fungi 2 ed Kew, Surrey. 663 p.
- 2 ALIPPI, H.E.; CARRANZA, J.M. 1975. Métodos y técnicas generales fitopatológicas. In Fitopatología, Curso Moderno. Ed por A.A. Sarasola, M.A. Roca de Sarasola. Buenos Aires, Hemisferio Sur. Vol. IV:189-214.
- 3 BOUSQUET, J.F.; SRAJENNIKOFF, M. 1974. Isolement et mode d'action d'une phytotoxine produite en culture par *Septoria nodorum* Berk. Phytopathologische Zeitschrift 80:355-360.
- 4 CAMPANILLE, G. 1926. Sulle septoriosi del sedano. Boll. R. Staz. Pat. Veg. N.S. 4(1):44-71. RAM 5: 402.
- 5 COOKE, B.M.; JONES, G.D. 1970. A field inoculation method for *Septoria tritici* and *Septoria nodorum*. Plant Pathology 19:72-74.
- 6 GABRIELSON, R.L.; GROGAN, R.G. 1964. The celery late blight organism *Septoria apiicola*. Phytopathology 54:1251-1257.
- 7 JONES, G.; LEE, N. 1974. Production of secondary conidia by *Septoria tritici* in culture. Transactions of British Mycological Society no. 1: 212-213.
- 8 KUROZAWA, C.; BALMER, E. 1977. Efecto de fatores nutricionais, iluminação e cepas na formação de "conídios secundários" de *Septoria lycopersici* Speg. Summa Phytopathologica 3(1):59-67.
- 9 LEONIAN, L.H. 1924. A study of factors promoting picnidium formation in some *Sphaeropsidales*. American Journal of Botany 11:19-50.
- 10 MILLER, P.M. 1955. V₈ juice as a general purpose medium for fungi and bacteria. Phytopathology 45:461.