

Una Variante Micelias Albina de *Septoria lycopersici* SPEG¹

A. Perelló*, S. Wolcan*, H. Alippi**

ABSTRACT

Morphological and histopathological characteristics of a nonsporulating *Septoria lycopersici* Speg. mycelial-type variant are presented. Its stability was tested under several conditions and pathogenicity compared to that of pycnidiospores and secondary (free) conidia. The variant resulted as pathogenic as conidia, though less than the pycnidiospores. Lesions caused by this mycelium are identical to the ones caused by spores, except that pycnidia are not present. Mycelium penetration and growth in the host coincide with the behavior observed in infections from pycnidiospores.

COMPENDIO

En el presente trabajo se describen las características morfológicas e histopatológicas de una variante micelias albina no esporulante de *Septoria lycopersici* Speg. Se analizó su estabilidad en distintas condiciones y se comparó la patogenicidad del micelio albino, de conidios secundarios (libres) y de picnidiosporas. El micelio albino resultó tan patogénico como los conidios secundarios, pero menos que las picnidiosporas. El tipo de lesiones ocasionado por el micelio albino fue idéntico al causado por las esporas, excepto por la ausencia de picnidios. La penetración, y posterior desarrollo de este micelio en el tejido hospedante, coincidió con el comportamiento observado para las infecciones originadas por picnidiosporas.

INTRODUCCION

El hongo causante de la viruela del tomate, *Septoria lycopersici* Speg., produce normalmente picnidiosporas en medios de cultivo. En algunos sustratos pobres, desarrolla sólo conidios secundarios (libres) cuya patogenicidad sobre tomate, según Kurozawa y Balmer (15), es dudosa. Por otra parte, en algunas ocasiones se observó sobre APG un mutante blanco micelias no esporulante que, inoculado sobre plantas de tomate, ha resultado más agresivo que las picnidiosporas (14) o no infectivo (17). En los

presentes ensayos se observó también una variante albina de tipo micelias (AM).

Esta investigación tuvo por objeto estudiar la morfología, fisiología y patogenicidad de la variante AM, y determinar si existe diferencia entre la virulencia de las picnidiosporas, conidios secundarios y micelio albino.

MATERIALES Y METODOS

Origen de la variante AM

La variante AM de *Septoria lycopersici* se obtuvo en dos circunstancias: a) a partir de un cultivo típico (estromático) se lograron colonias monospóreas sobre agar Czapek; b) en una colonia típica cultivada sobre APG y mantenida por transferencia de masas de esporas durante varias generaciones, apareció un sector micelias albino. Con este material se realizaron los estudios morfofisiológicos y patogénicos de la variante.

1 Recibido para publicación 15 de diciembre de 1988.
Se agradece al Ing. Santiago Sarandón por su apoyo en la resolución del análisis estadístico.

* Ings. Agrs., Becaria de Perfeccionamiento e Investigadora Asistente de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de la Plata (UNLP), calle 60 y 119 (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina.

** Ing. Agr. Profesor Titular de la Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, UNLP, Buenos Aires, Argentina.

Morfología y fisiología de las colonias

Se observó el comportamiento de la variante AM en distintos medios de cultivo. Estos se sembraron con trocitos de agar y micelio de 3 mm de diámetro, tomados con un sacabocados, del borde de las colonias miceliarias. Las colonias se incubaron en las siguientes condiciones: a) cámara climática a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ con un fotoperíodo de 12 h de luz (3500 lux) y el agregado de luz cercana a la ultravioleta (365 nm); b) en laboratorio (luz natural y entre 13°C y 20°C); y c) oscuridad continua a 20 ± 2 grados centígrados.

Los medios ensayados fueron agar de papa glucosado: APG (1); agar Czapek: AC (1); agar V_8 : AV_8 (20); agar Czapek Dox V_8 : $ACDV_8$: (6); agar glucosa: AG (15); agar tomate: AT (filtrado de 300 g de hojas de tomate trituradas, 17 g de agar y c.s.p. 1000 ml de agua destilada); agar pimiento: AP (filtrado de 300 g de hojas de pimiento trituradas, 17 g de agar y c.s.p. 100 ml de agua destilada); agar extracto de malta con peptona y levadura: AMPL (30 g de extracto de malta, 5 g de peptona bacteriológica, 2 g de extracto de levadura, 17 g de agar y c.s.p. 1000 ml de agua destilada); agar de Joham: AJ (12); agar nutriente: AN (23); agar sodio y levadura: ASL (18) y agar sodio y levadura sucrosado: ASLS (18).

Se realizaron observaciones diarias sobre el crecimiento y el aspecto de las colonias.

Patogenicidad

Se realizaron ensayos para determinar la patogenicidad de la variante AM y para comparar la agresividad del micelio albino, las picnidiosporas y los conidios secundarios.

Las pruebas se condujeron en invernáculo (18°C - 24°C ; 85% - 95% HR). Se inocularon plantas de tomate de la variedad Platense Línea 7, al estado de seis hojas. Se pulverizaron con una suspensión de esporas o de fragmentos miceliarios cuya concentración se ajustó con el hemacitómetro de Neubauer. Posteriormente se mantuvieron 72 h en cámara húmeda.

Se emplearon dos plantas por maceta y 10 macetas por tratamiento. A los 15 días de la inoculación se realizó la evaluación utilizando una escala de valores de 0 a 5 (Fig. 1), considerando el área foliar necrosada de las tres hojas centrales de cada planta.

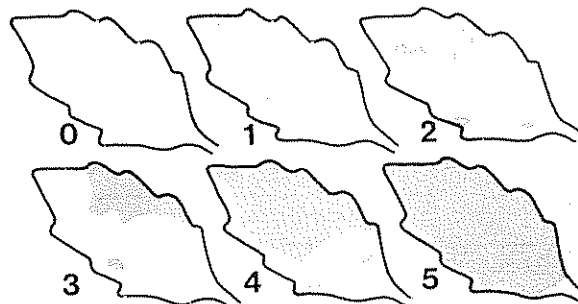


Fig. 1. Escala de infección de *S. lycopersici* sobre folíolos de tomate. Valores al 0 a 5.

Los datos se compararon estadísticamente mediante un análisis de variancia. Las diferencias mínimas significativas (DMS) se analizaron según la prueba de Tukey (P: 0.01).

- Las plantas de tomate se inocularon con micelio de colonias "jóvenes" (15 d) y "viejas" (cuatro meses) cultivadas en APG. El inóculo consistió en una suspensión de fragmentos miceliarios obtenidos de acuerdo con la técnica de Andrus (3). La concentración de ajustó a 3.5×10^6 fragmentos por mililitro.
- Se comparó la agresividad de las picnidiosporas obtenidas a partir de un cultivo típico (estromático) con los conidios secundarios del mismo origen y con el micelio proveniente de la variante AM. Los tres tipos de inóculo se obtuvieron a partir de colonias de 15 días, desarrolladas sobre AMPL, AG y APG, respectivamente. La suspensión de inóculo se ajustó a una concentración de 1.2×10^6 esporas o fragmentos miceliarios por mililitro.

Histopatología

Con el objeto de realizar el estudio histopatológico del micelio albino y de las esporas de *S. lycopersici*, se aplicó la técnica de aclaramiento y tinción desarrollada por Alippi (2).

RESULTADOS

Origen de la variante AM

- a) La mayoría de las colonias reprodujo el tipo cultural parental (estromático) y unas pocas presentaron características del tipo miceliar albino.

Su aspecto fue mucoso y brillante, de color blanco y sin desarrollo de fructificaciones (Fig. 2). Las mismas se mantuvieron estables luego de sucesivas transferencias.

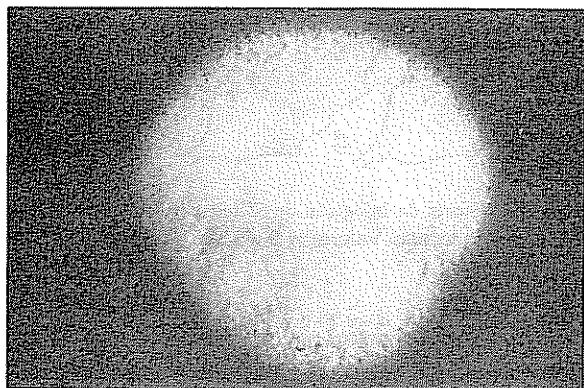


Fig. 2. Colonia de la variante AM de *S. lycopersici* sobre APG. Observación a los ocho días (x 2.5).

b) El sector albino inicial desarrollado en la colonia típica produjo micelio blanco, algodonoso, compacto y afiltrado. Microscópicamente se observaron hifas hialinas, largas, agrupadas en haces tipo "cordé" (19). Bajo el micelio

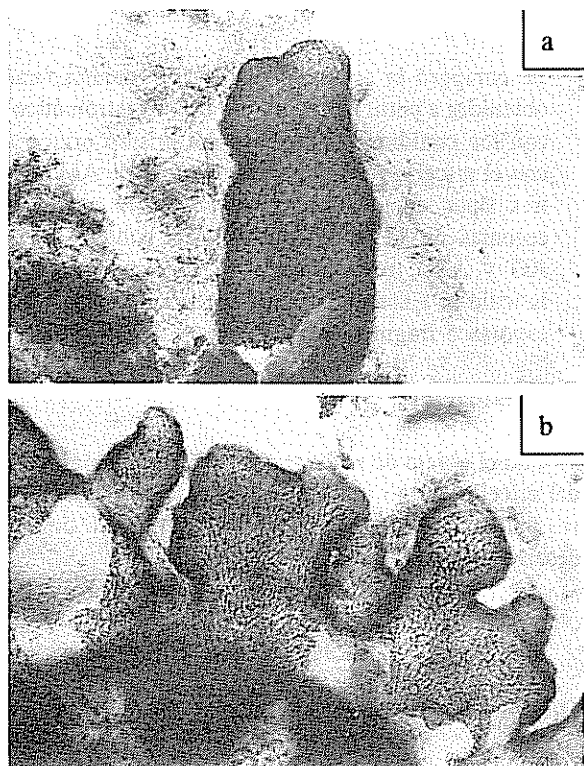


Fig. 3. Picnidios anormales desarrollados sobre el sector miceliar de *S. lycopersici* a) Forma alargada (x 260), b) forma irregular (x 130).

desarrollaron picnidios anormales: alargados (Fig. 3a) o irregulares (Fig. 3b), que produjeron esporas de forma y tamaño típicos. Luego de algunas transferencias sucesivas en APG se obtuvieron colonias albinas de tipo miceliar puro (sin fructificaciones). Estas características se mantuvieron estables.

Morfología de las colonias

No hubo diferencia de comportamiento entre las colonias incubadas según los tratamientos indicados en a), b) y c). Sin embargo, hubo variación entre los distintos medios.

A los 21 días de la siembra se observó que sobre APG, AMPL y ACDB el diámetro de las colonias varió entre 30 mm y 36 mm; hubo desarrollo de micelio albino, algodonoso y muy denso, que provocó depresiones y elevaciones irregulares en la superficie de los medios. En APG se observó zonación.

Sobre AV₈, ASLS y AP, los diámetros oscilaron entre 23 mm y 30 mm; desarrolló micelio albino, denso, pulverulento, con depresiones irregulares en AV₈ y ASLS y radiadas en AP.

Sobre el resto de los medios los diámetros de las colonias variaron entre 2 mm y 11 mm, con poco desarrollo miceliar blancuzco, de tipo pulverulento en ASL, mucilaginoso y brillante en AN y rosado en AJ. Se observó difusión al agar de pigmentación rosada en los medios APG, ASLS, ASL, AMPL y AC.

Entre los 15 y 35 días se produjo el envejecimiento de las colonias, con detención del crecimiento aéreo en todos los casos. Las hifas adquirieron una coloración similar al 61 Rosy Buff y 87 Fawn (22), aspecto mucoso, brillante y consistencia compacta. Al transferir trocitos de estas colonias al mismo medio de cultivo fresco, se recuperaron las características descritas para el micelio joven.

En todos los tratamientos ensayados se observó estabilidad en las características culturales de la variante AM. Las mismas se mantuvieron sin cambios durante transferencias sucesivas realizadas a lo largo de tres años de observaciones.

Patogenicidad

— El análisis de los datos demostró que no hubo diferencias entre la infección ($I =$ valor promedio de la infección según la escala) inducida por el micelio joven ($I = 1.77$) y el envejecido ($I = 1.28$) (DMS 1%:1.25).

— A los seis días de la inoculación se observaron manchas foliares pequeñas (3 mm) en las plantas infectadas con micelio. A los nueve días se visualizaron manchas necróticas en los tratamientos restantes.

No se registraron diferencias significativas entre la agresividad del micelio de la variante AM ($I = 1.49$) y los conidios secundarios ($I = 1.57$). Ambos elementos infectivos fueron menos agresivos que las picnidiosporas ($I = 4.26$) (DMS 1%:0.60).

En las lesiones causadas por los dos tipos de esporas, se observó la formación de picnidios, los cuales, a partir de los reaislamientos, reprodujeron colonias de tipo estromático.

En ninguna de las lesiones originadas por la variante AM se apreció la formación de picnidios, aunque sí se observó micelio sobre la superficie. En todos los casos, los reaislamientos reprodujeron colonias de tipo miceliar.

No se manifestaron diferencias en el aspecto de las lesiones provocadas por las tres clases de inóculo.

Histopatología

El micelio utilizado como inóculo penetró tanto a través de los estomas como directamente por la unión de células epidérmicas (Fig. 4a); del mismo modo lo hicieron las hifas provenientes de la germinación de las picnidiosporas. Esta sería la primera cita acerca de penetración directa por parte de *S. lycopersici*. De las lesiones originadas por la variante AM se observó la emergencia de hifas más o menos gruesas a través de los estomas (Fig. 4b). Esto mismo ocurrió en las lesiones provenientes de inoculaciones con picnidiosporas; habiéndose observado igual proceso en otras especies del género *Septoria* (2).

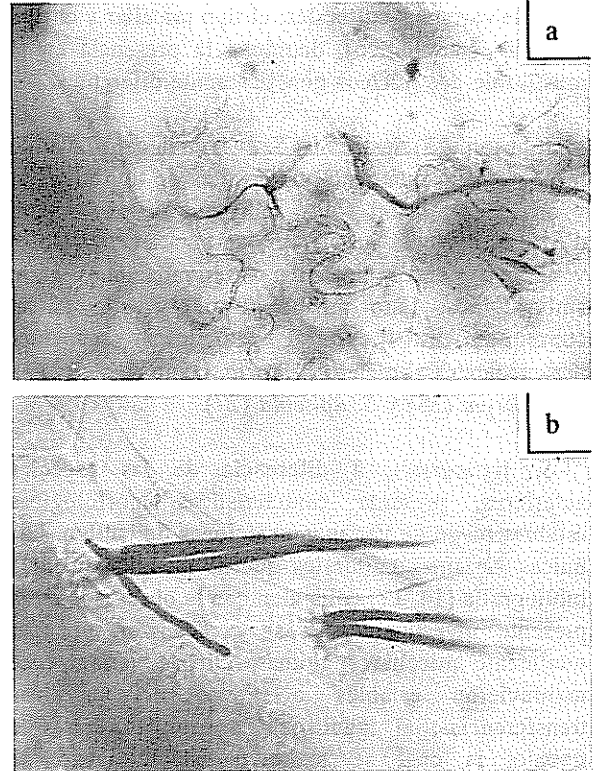


Fig. 4. Histopatología de la variante AM de *S. lycopersici*. a) Penetración directa de hifas a través de la unión de las células epidérmicas (x 270); b) hifas gruesas emergen a través de los estomas del tejido infectado (x 270).

DISCUSION

Se define como saltación a un tipo de mutación que aparece en cultivos artificiales y puede ser mantenida sin cambio luego de sucesivas generaciones de transferencias (28). Otros términos como variación discontinua, mutación, disociación y fenómeno dual, han sido empleados para describir los cambios en las características morfológicas o fisiológicas que se observan a partir de la condición normal (1, 9, 11, 28).

Con respecto a la patogenicidad, se ha señalado que una variante puede ser más virulenta que la cepa parental (14, 16), menos virulenta (4, 5, 8, 17, 26) o no manifestar diferencias con el mismo (21).

Hansen y Smith (11) y Hansen (10) en sus estudios sobre variabilidad de hongos imperfectos, entre los cuales incluyen algunas especies del género *Septoria*, sugieren la presencia en la naturaleza de dos

tipos de variantes culturales: el tipo miceliar y el tipo conidial (estromático), debido a la presencia en el micelio de dos núcleos genéticamente diferentes.

Johnson (13) destaca en *S. avenae* la capacidad de producir frecuentemente variaciones de tipo miceliar y de tipo picnidial sobre medios artificiales; pero dichas variaciones no siempre se mantienen estables y además pueden presentar intergradaciones entre ambos tipos. Esto mismo fue observado en el comportamiento cultural de otras especies pertenecientes al género *Septoria*, como *S. tritici* (7), *S. nodorum* (25) y *S. apiicola* (27).

S. lycopersici, a diferencia de las especies anteriores, presenta características morfológicas estables luego de varias generaciones de cultivo. Las únicas variantes culturales que se mencionan en la bibliografía (14, 17) coinciden con la observada en la presente investigación y se caracterizan por ser totalmente miceliar albinas. Dichas variantes se mantuvieron estables a través de sucesivas transferencias, al igual que la estudiada en este trabajo, la cual se mantuvo estable luego de transferencias mensuales durante tres años y sometida a distintas condiciones de cultivo (luz, temperatura y medios).

El origen de la variante AM no ha sido determinado aún. Una hipótesis podría ser que la variación apareció como resultado de un proceso heterocariótico (10, 11) o como resultado de una mutación (14, 17).

La capacidad patogénica de estas cepas albinas fue nula (17), superior a la de las picnidiosporas (14) o, tal como se observó en los resultados de este ensayo, inferior a la del cultivo parental.

En cuanto a la infectividad de los conidios secundarios, la bibliografía no ofrece ningún trabajo al respecto, excepto lo sugerido por Kurozawa y Balmer (15). El presente trabajo confirma que dichas esporas son infectivas, pero menos agresivas que las picnidiosporas.

En la naturaleza, es probable que se produzcan tanto cepas miceliar como conidios libres y que ambos actúen como modo alternativo de dispersión del patógeno en condiciones ambientales favorables. En la variante AM dicha dispersión se llevaría a cabo por medio de las hifas gruesas que emergen a través

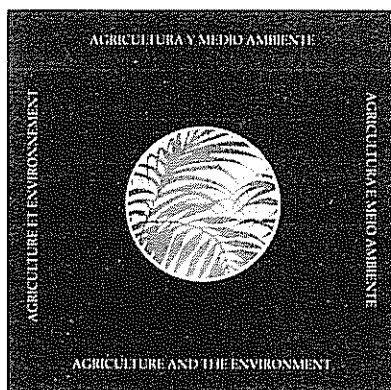
de los estomas y que podrían ser desprendidas y transportadas y difundidas por el agua o el viento. Ya que las formas picnidiales también emiten esas mismas hifas, se considera que éstas actuarían como un mecanismo alternativo de dispersión.

LITERATURA CITADA

1. AINSWORTH, G.C. 1971. Dictionary of the fungi. 6. ed. Kew, Surrey, Commonwealth Mycological Institute. 663 p.
2. ALIPPI, H.E. 1986. Observaciones sobre la histopatología de la viruela del apio. Revista Argentina de Micología 9(3):23-25.
3. ANDRUS, C.F. 1941. Preparation of inoculum with a mechanical liquifier. Phytopathology 31:566-567.
4. BONDE, R. 1929. Physiological strains of *Alternaria solani*. Phytopathology 19:533-548.
5. BURKHOLDER, W.H. 1925. Variations in a member of the genus *Fusarium* grown in culture for a period of five years. American Journal of Botany 12:245-253.
6. COOKE, B.M.; JONES, G.D. 1970. A field inoculation method for *Septoria tritici* and *Septoria nodorum*. Plant Pathology 19:72-74.
7. CORDO, C.A.; LINDQUIST, J.C. 1987. Análisis cualitativo de la variabilidad cultural de *Septoria tritici*. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 25(1-2):59-77.
8. CORMACK, M.W. 1951. Variation in the cultural characteristics and pathogenicity of *Fusarium avenaceum* and *F. arthrosporioides*. Canadian Journal of Botany 29:32-45.
9. FOSTER, J.W. 1949. Natural variation. In Chemical activities of fungi. New York, Academic Press. p. 184-208.
10. HANSEN, H.N. 1938. The dual phenomenon in imperfect fungi. Mycologia 30:442-455.
11. HANSEN, H.N.; SMITH, R.E. 1932. The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. Phytopathology 22:953-964.
12. HENIS, Y.; CHET, ? 1968. Developmental biology of sclerotia of *Sclerotium rolsfii*. Canadian Journal of Botany 46:947-948.

13. JOHNSON, T. 1952. Cultural variability in *Septoria avenae* Frank. Canadian Journal of Botany 30:318-330.
14. KUROSZAWA, C.; BALMER, E. 1975. Variabilidade de *Septoria lycopersici* Speg., agente causal da mancha foliar do tomateiro. Arquivos do Instituto Biológico 42:17-22.
15. KUROSZAWA, C.; BALMER, E. 1977. Efeito de fatores nutricionais, iluminação e de cepas na formação de "conídios secundários" de *Septoria lycopersici* Speg. Summa Phytopathologica 3:59-65.
16. LE CLERG, E.L. 1939. Studies on a cultural variant of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 29:267-274.
17. MAC NEILL, B.H. 1950. Studies in *Septoria lycopersici* Speg. Canadian Journal of Research 28:645-672.
18. MANANDHAR, J.B.; HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. 1986. *Colletotrichum destructivum*, the anamorph of *Glomerella glycines*. Phytopathology 76:282-285.
19. MESSIAEN, C.M.; CASSINI, R. 1968. Recherches sur les fusarioses. IV. La Systématique des *Fusarium*. Annales des Epiphyties 19:387-459.
20. MILLER, P.M. 1955. V₈ juice as a general purpose medium for fungi and bacteria. Phytopathology 45:461.
21. NEWTON, M.; JOHNSON, T. 1927. Color mutations in *Puccinia graminis tritici* (Pers.) Erikss. and Henn. Phytopathology 17:711-725.
22. OSWALD, J.W. 1949. Cultural variation, taxonomy and pathogenicity of *Fusarium* species associated with cereal root rots. Phytopathology 39:359-376.
23. RAYNER, R.W. 1970. A mycological colour chart. Kew, Surrey, Commonwealth Mycological Institute/ British Mycological Society. 31 p.
24. RICKER, A.J.; RICKER, R.S. 1936. Introduction to research on plant diseases. New York, John S. Swift. 26 p.
25. SCHAREN, A.L.; KRUPINSKY, J.M. 1970. Cultural and inoculation studies of *Septoria nodorum*: Cause of glume blotch of wheat. Phytopathology 60:1480-1485.
26. WENDLING, R. 1939. Variability of *Fusarium vasinfectum* in culture. Phytopathology 29:755.
27. WOLCAN, S. 1985. Efectos de determinados factores del medio sobre el comportamiento de algunos patógenos de hortalizas: Informe científico. Buenos Aires, Arg., Comisión de Investigaciones Científicas. p. 6.
28. WOLF, F.T.; WOLF, F.A. 1947. Physiologic specialization and variation among fungi. In The Fungi: An Advanced Treatise. G.C. Ainsworth, A.S. Sussman (Eds.). New York. v. 2, p. 257-258.

LIBRO RECOMENDADO



US\$20.00

Agricultura y Medio Ambiente. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Cuatrilingüe en español, inglés, francés y portugués. 76 p. ISBN 92-9039-193-6.

El testimonio gráfico de fotografías de diversos lugares del continente americano plasma el dramático dilema de cómo el desbordante crecimiento tecnológico está llevando a la humanidad al borde de la destrucción de su ambiente natural. La gran calidad artística de esta publicación fue posible, también, gracias al generoso apoyo de la Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional (ACDI).

Ver lista de publicaciones disponibles para la venta y boleta de solicitud en la última sección de la revista Turrialba.