

# Efectos de los Regímenes Luminosos, Temperaturas y Medios de Cultivo sobre la Esporulación, Crecimiento y Características Culturales de *Ascochyta pinodella* Jones<sup>1</sup>

S.M. Wolcan\*, R. Boggio Ronceros\*\*

## ABSTRACT

The present work was carried out to test the effect of interaction of four culture mediums, potato dextrose agar (PDA), V8 juice agar (V8A), Czapek agar (CA) and sweetpea agar (SA); three photoperiods (long day, short day and continuous darkness); and two temperature,  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , upon *A. pinodella* growth, sporulation and cultural characteristics. Light and the interaction between temperature and medium affected growth significantly. It was decreasingly stimulated by V8A, PDA, CA and SA, by  $21^\circ\text{C}$  and  $27^\circ\text{C}$  and, finally, by long day, darkness and short day. All the interactions affected sporulation significantly. The most favorable conditions were  $21^\circ\text{C}$  for both lighted photoperiods and PDA and CA. On the other hand, SA presented the highest sporulation rate at  $27^\circ\text{C}$  in darkness. Spore size is included for every treatment. Light favored colony zonation was more evident in PDA and V8A. It also improved sectoring development in PDA and CA.

## INTRODUCCION

En trabajos conducidos en laboratorio se ha probado que algunos factores como la iluminación, la temperatura y los nutrimentos, entre otros, modifican distintas características culturales de los hongos (3, 4, 6, 10, 13, 14, 20) y también su patogenicidad (9).

Con respecto a *Ascochyta pinodella* Jones, e incluso a otras especies de este género, se han realizado pocos trabajos de este tipo y en ellos sólo se ensayaron algunos factores en forma aislada (8, 11, 13, 17)

<sup>1</sup> Recibido para publicación el 25 de abril 1988

Agradecemos al Ing. H. Alippi por sus valiosas sugerencias para la realización de este trabajo y al Ing. Montaldi por habernos permitido el uso de las cámaras climatizadas pertenecientes al Instituto de Fisiología Vegetal de la UNLP. Trabajo realizado en la Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, UNLP

\* Ing. Agr., Investigadora Asistente de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires bajo la dirección del Ing. Agr. H. Alippi y docente de la Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, UNLP, 60 y 119, C.P.: 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina

\*\* Ing. Agr., M.Sc., Profesor Adjunto de la Cátedra de Cálculo Estadístico y Biometría de la Facultad de Agronomía, UNLP y Prof. Titular de la Cátedra de Estadística y Diseño Experimental de la Facultad de Agronomía de Azul, UNC.

## COMPENDIO

En este trabajo se probó el efecto de la interacción de cuatro medios de cultivo: agar de papa glucosado (APG), agar V8 (AV8), agar Czapek (AC) y agar arvejilla (AA); tres regímenes luminosos: día largo, día corto y oscuridad continua; y dos temperaturas:  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , sobre el crecimiento, la esporulación y las características culturales de *A. pinodella*. Sobre el crecimiento tuvieron significancia la luz y la interacción entre temperaturas y medios. Lo estimularon en orden decreciente los medios AV8, APG, AC y AA, las temperaturas  $21$  y  $27^\circ\text{C}$  y los regímenes de día largo, oscuridad y día corto. La esporulación se vio afectada significativamente por todas las interacciones. Las condiciones más favorables fueron temperatura de  $21^\circ\text{C}$  en los dos regímenes iluminados y en APG y AC. Sobre AA, opuestamente, hubo mayor esporulación en oscuridad y a  $27^\circ\text{C}$  y sobre AC a  $27^\circ\text{C}$  fue nula. Se incluyen dimensiones de esporas en cada tratamiento. La presencia de luz estimuló la zonación de las colonias, la cual fue más evidente en los medios APG y AV8. La iluminación también favoreció el desarrollo de sectores en los medios APG y AC.

El objetivo de la presente investigación fue probar el efecto de la combinación de los tres factores citados (tres regímenes luminosos, dos temperaturas y cuatro medios de cultivo) sobre el crecimiento, la esporulación y las características culturales de *A. pinodella* a los efectos de destacar las condiciones más favorables para su desarrollo

## MATERIALES Y METODOS

El hongo se aisló a partir de lesiones de hojas y tallos de chícharo (*Lathyrus sativus* L.) y se cultivó sobre APG. Se obtuvieron 96 colonias de origen monospórico que se transfirieron al centro de cajas de Petri con los medios de cultivo a ensayar: agar de papa glucosado = APG (1), agar Czapek = AC (1), agar V8 = AV8 (16) y agar arvejilla = AA (filtrado de 300 g de hojas de arvejilla (*Lathyrus odoratus* L.) licuadas, 17 g de agar y c.s.p. 1 000 ml de agua destilada).

Las colonias se incubaron en cámaras climatizadas ajustadas a temperaturas de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cada una de ellas se dividió en dos compartimientos con dos regímenes de iluminación: día largo = DL (16 h de luz compuestas por 8 h con todos los tubos fluorescentes encendidos, los cuales proporcionaron una intensidad de  $180 \mu\text{e m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  y 8 h con dos tubos

encendidos ( $28 \mu\text{e m}^{-2} \text{ seg}^{-1}$ ), y 8 h de oscuridad) y día corto = DC (8 h de luz con dos tubos encendidos y 16 h de oscuridad) Los ciclos luminicos fueron ajustados de acuerdo con la duración de los fotoperíodos de verano e invierno en las latitudes medias. Además, se trabajó con oscuridad continua = OC, la que se logró envolviendo las cajas con papel de aluminio. El material se mantuvo en las cámaras sobre bandejas colocadas a 40 cm de la fuente lumínica

Se trabajó con cuatro repeticiones de cada tratamiento.

En las observaciones finales se tomaron en cuenta las siguientes características:

a) Crecimiento vegetativo: se consideró el diámetro de las colonias (promedio de dos diámetros opuestos) Observación a los ocho días

b) Grado de esporulación de las colonias: para ello se prepararon suspensiones de esporas agregando a cada caja 3.5 ml de agua destilada y raspando la superficie de las colonias con un asa. El recuento se hizo con ayuda de la cámara de Neubauer. Se complementó con datos sobre dimensiones y número de tabiques de 50 esporas de cada tratamiento Observación a los ocho días.

Los datos referidos a "diámetro de las colonias" y a "cantidad de esporas por ml de suspensión" se estudiaron a través de un análisis factorial de  $4 \times 3 \times 2$  (5, 18), siendo los factores: medios de cultivo (M) x regímenes luminicos (L) x temperaturas (T)

c) Características culturales: se tuvo en cuenta el aspecto y el color del micelio según la carta de Rayner (19), la sectorización y la zonación. Observación a los ocho días

## RESULTADOS

### a) Crecimiento

En el Cuadro 1 se transcriben los valores medios de crecimiento en los distintos tratamientos

De acuerdo con el análisis de variancia el efecto de la luz (L) fue altamente significativo También tuvo significancia ( $P = 0.05$ ) la interacción T x M. En relación con esta última se observa (Fig. 1) que en el medio AC el crecimiento a las distintas temperaturas fue semejante En AV8 y AA se estimuló significativamente ( $P = 0.01$ ) a  $21^\circ\text{C}$ , al igual que en APG ( $P = 0.05$ ). Asimismo, dentro de cada temperatura se observó mayor crecimiento sobre AV8, disminuyendo en APG, AC y AA.

La luz lo estimuló significativamente ( $P = 0.01$ ) en el tratamiento de día largo. En oscuridad también se observó buen crecimiento, pero sin significancia estadística (Fig. 1).

### b) Esporulación

Los valores medios de la esporulación en cada tratamiento figuran en el Cuadro 1

En el análisis estadístico se observó que las interacciones de segundo (L x M, L x T y T x M) y de tercer orden (L x M x T) mostraron alta significancia, con lo cual se anularon los efectos principales (L, M y T).

Al analizar la interacción L x M se observó que con los medios APG y AC hubo diferente comportamiento en ausencia y en presencia de luz ( $P = 0.01$ ), manifestándose inhibición de la esporulación en la oscuridad (Fig. 2). En AA y AV8 la respuesta fue semejante en los tres regímenes luminicos Se destaca el estímulo de la oscuridad sobre la esporulación en AA, comportamiento opuesto al de los demás medios.

Con respecto a la interacción L x T, se evidenció una diferencia significativa ( $P = 0.01$ ) de la esporulación en los tratamientos de día largo y día corto, siendo estimulada a  $21^\circ\text{C}$  (Fig. 3). En la oscuridad la respuesta fue semejante en las dos temperaturas.

En la interacción T x M se observó que en los medios APG, AC y AV8 la esporulación disminuyó al aumentar la temperatura, aunque sólo sobre AC la diferencia fue estadísticamente significativa ( $P = 0.01$ ). En AA se incrementó levemente a  $27^\circ\text{C}$  (Fig. 4)

En el Cuadro 2 se observan las dimensiones y el porcentaje de esporas bicelulares en los distintos tratamientos Sobre APG en oscuridad predominaron notoriamente las unicelulares en ambas temperaturas. En oposición, sobre AV8, si bien el porcentaje de bicelulares fue bajo en todos los tratamientos, en oscuridad fue levemente superior tanto a  $21^\circ\text{C}$  como a  $27^\circ\text{C}$  Sobre AA el comportamiento fue afectado por las temperaturas y la iluminación. El tamaño de las esporas fue mayor sobre AC y menor en casi todos los tratamientos mantenidos en oscuridad.

### c) Características culturales

*A. pinodella* desarrolló colonias circulares con elevación difusa, borde filamentosos y zona periférica sumergida en el medio, de color menos intenso

En todos los tratamientos la pigmentación del micelio fue semejante dentro de cada medio y varió entre ellos Asimismo fue más intenso en las zonas con

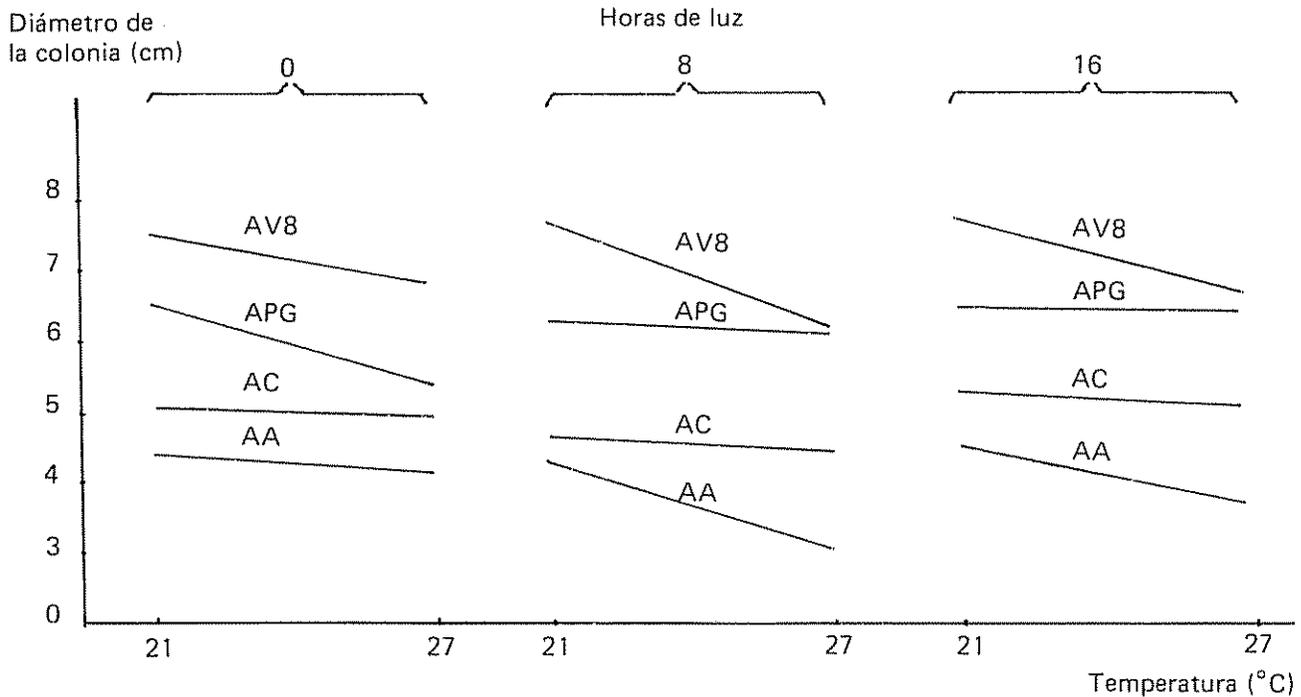


Fig. 1 Interacción de las temperaturas y los medios de cultivo dentro de los distintos regímenes lumínicos que afectan el crecimiento de *A. pinodella*

fructificaciones. Sobre APG varió entre los colores 65 Isabelline, 48 Olivaceous y 88 Hazel. Sobre AC desarrolló micelio aéreo con hifas aglutinadas erectas, de tipo "cordé" (15), dando colonias blancas (sin fructificaciones) o pigmentadas 4 Peach o 41 Salmón. En los tratamientos que esporularon, los picnidios se

agruparon en sentido radial. En AV8 produjo micelio hialino y en AA el centro de las colonias se cubrió de picnidios maduros y en la periferia desarrolló micelio gris, elevado. En oscuridad, sobre AC y AV8 se observaron porciones de micelio sumergido, de aspecto húmedo, brillante, estéril.

Cuadro 1. Promedio de los valores de crecimiento y esporulación de *A. pinodella* (1) diámetro de las colonias (cm); (2) esporas/ml ( $\times 10^6$ ); (3) zonación poco definida; z: zonación (en todas las cajas dentro del tratamiento); s: sectorización (el subíndice señala el número de cajas con sectores dentro del tratamiento).

Temperatura			21°C			27°C		
Horas de luz			16	8	0	16	8	0
Medios de cultivo	APG	Crecimiento <sup>(1)</sup>	6.38 <sup>z</sup> <sub>s<sub>1</sub></sub>	6.25 <sup>z</sup> <sub>s<sub>3</sub></sub>	6.38	6.37 <sup>z</sup>	6.02 <sup>z</sup>	5.42 <sup>z</sup>
		Esporulación <sup>(2)</sup>	13.62	16.44	0.54	5.64	10.76	0.74
	AC	Crecimiento	5.27 <sup>z</sup> <sub>s<sub>1</sub></sub>	4.66 <sub>s<sub>2</sub></sub>	4.96	5.07	4.45 <sub>s<sub>1</sub></sub>	5.00
		Esporulación	15.49	15.81	—	—	—	—
	AV8	Crecimiento	7.60 <sup>z</sup>	7.50 <sup>z</sup>	7.28	6.65 <sup>z</sup>	6.87 <sup>z</sup>	6.87
		Esporulación	1.47	3.19	3.07	0.47	2.38	0.45
	AA	Crecimiento	4.47 <sup>z(3)</sup>	4.29 <sup>z(3)</sup>	4.08 <sup>z(3)</sup>	3.77 <sup>z(3)</sup>	3.18 <sup>z(3)</sup>	4.08 <sup>z(3)</sup>
		Esporulación	6.73	1.37	0.66	0.93	3.22	7.69

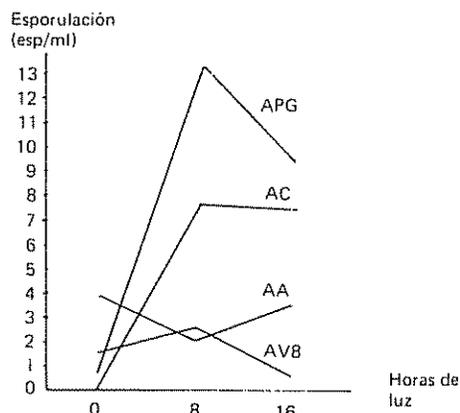


Fig 2 Interacción entre la luz y los medios de cultivo que afectan la esporulación de *A. pinodella*

En el Cuadro 1 se indican los tratamientos en los cuales las fructificaciones se agruparon en anillos concéntricos (zonación). Estos fueron poco visibles sobre AA y muy definidos sobre APG y AV8. Fueron estimulados por la presencia de luz.

En algunos tratamientos indicados en el Cuadro 1 desarrollaron "sectores" de color más oscuro que el resto de la colonia, sobre los cuales los picnidios se distribuyeron en sentido radial. Microscópicamente mostraron características diferentes al resto de la colonia, presentando mayor cantidad de clamidosporas y en muchos casos esporas de color pardo y mayores dimensiones 11.0 a 16.0 (13.76)  $\mu\text{m}$  las bicelulares y 4.0 a 8.0 (6.28)  $\mu\text{m}$  las unicelulares, con mayor porcentaje de las primeras).

Cuadro 2. Dimensiones y septación de las esporas de *A. pinodella* (medición de 50 esporas por tratamiento).

Medios de cultivo	Temperatura		21°C			27°C		
	Horas de luz	Dimensiones	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Esporas bicelulares (%)	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Esporas bicelulares (%)
APG	16	7.5 - 13.5 $\bar{X} = 9.95$	3.2 - 4.0 $\bar{X} = 3.60$	56	7.0 - 13.0 $\bar{X} = 9.50$	3.0 - 5.5 $\bar{X} = 3.60$	58	
	8	5.0 - 13.0 $\bar{X} = 9.70$	2.5 - 4.2 $\bar{X} = 3.60$	58	7.0 - 14.5 $\bar{X} = 9.95$	3.5 - 5.0 $\bar{X} = 3.73$	76	
	0	5.0 - 11.0 $\bar{X} = 8.46$	3.0 - 3.9 $\bar{X} = 3.61$	10	4.8 - 11.0 $\bar{X} = 7.50$	2.8 - 4.2 $\bar{X} = 3.52$	8	
AC	16	8.0 - 15.0 $\bar{X} = 11.02$	3.5 - 5.5 $\bar{X} = 3.80$	52	-	-	-	
	8	8.0 - 15.0 $\bar{X} = 11.52$	3.5 - 5.8 $\bar{X} = 3.88$	58	-	-	-	
	0	-	-	-	-	-	-	
AV8	16	6.0 - 15.0 $\bar{X} = 9.42$	2.5 - 4.0 $\bar{X} = 3.12$	6	7.0 - 13.8 $\bar{X} = 9.41$	3.2 - 4.2 $\bar{X} = 3.72$	6	
	8	7.0 - 12.0 $\bar{X} = 9.26$	3.0 - 4.0 $\bar{X} = 3.47$	18	7.5 - 13.5 $\bar{X} = 9.32$	3.4 - 4.0 $\bar{X} = 3.76$	6	
	0	5.0 - 12.0 $\bar{X} = 8.68$	2.0 - 4.0 $\bar{X} = 3.45$	26	7.0 - 14.0 $\bar{X} = 9.50$	3.2 - 6.5 $\bar{X} = 3.87$	22	
AA	16	7.0 - 14.0 $\bar{X} = 10.0$	2.8 - 3.8 $\bar{X} = 3.50$	44	7.0 - 14.0 $\bar{X} = 8.93$	2.7 - 4.4 $\bar{X} = 3.70$	42	
	8	5.0 - 12.0 $\bar{X} = 8.68$	2.8 - 3.8 $\bar{X} = 3.39$	38	7.0 - 11.5 $\bar{X} = 9.14$	3.5 - 4.0 $\bar{X} = 3.79$	56	
	0	6.5 - 13.5 $\bar{X} = 8.75$	2.7 - 3.9 $\bar{X} = 3.40$	20	6.5 - 15.0 $\bar{X} = 8.30$	2.0 - 4.0 $\bar{X} = 3.59$	52	

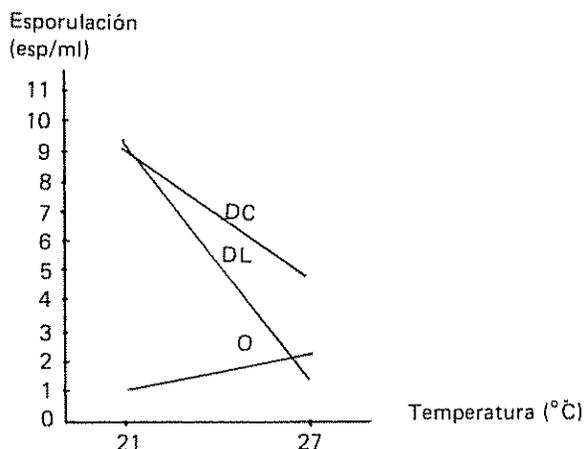


Fig. 3. Interacción entre las temperaturas y los regímenes luminosos que afectan la esporulación de *A. pinodella*

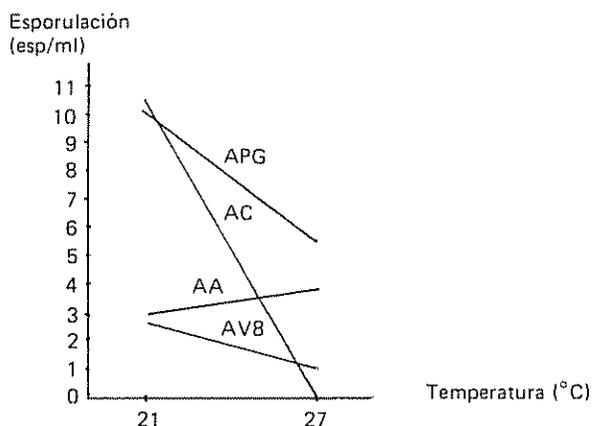


Fig. 4. Interacción entre las temperaturas y los medios de cultivo que afectan la esporulación de *A. pinodella*

#### DISCUSION

El comportamiento de *A. pinodella* se modificó al combinar los factores del ensayo de manera diferente

El crecimiento fue afectado significativamente por la luz y por la interacción entre los medios y las temperaturas.

Sobre la esporulación, en cambio, se observó una marcada significación de todas las interacciones. La condición más favorable fue el cultivo sobre APG a 21°C y expuesto a la luz. En general, la iluminación incrementó la producción de esporas, como probaron otros autores en relación con distintos hongos (3, 4, 6, 10, 11, 20). Sin embargo, su efecto puede ser diferente al combinarse con otros factores. El medio elaborado con hojas de arvejilla se comportó de manera

particular al permitir mayor esporulación que los restantes en oscuridad continua. Incluso, a 27°C, fue esta la condición que más lo estimuló. Probablemente esta planta produzca alguna sustancia que induce la producción de esporas de *A. pinodella* sin necesidad de recibir estímulo lumínico, tal como demostraron Binder y Lilly (2) sobre cultivos de *Dendrophoma obscurans*

La incidencia de zonación en las colonias fue afectada principalmente por el tipo de sustrato y por la presencia o no de luz; Hafiz (8) obtuvo resultados semejantes con colonias de *A. rabiei*.

La sectorización fue inducida en determinados medios bajo irradiación lumínica. Lynch (13) observó también que el desarrollo de sectores en las colonias de *Cercospora beticola* fue estimulado por la presencia de la luz. Lindford y Sprague (12) y Gould (7) describieron la tendencia de *A. pinodella* a producir sectores y variaciones en cultivo. Los primeros autores mencionan que en estos casos no se modificaron las características de las esporas. En el presente trabajo sí se observaron variaciones en las dimensiones y en el color, pero no se siguió la evolución de la descendencia como para comprobar si se trataba de una característica estable

#### LITERATURA CITADA

1. AINSWORTH, G. C. 1971. Dictionary of the fungi. 6 ed. Kew, Surrey Commonwealth Mycological Institute. 663 p.
2. BINDER, F. L.; LILLY, V. G. 1975. Substitution of the radiation requirement for sporulation by host tissue in *Dendrophoma obscurans*. Mycologia 67: 1025-1031.
3. CALPOUZOS, L.; STALKNECHT, G. F. 1965. Sporulation of *Cercospora beticola* affected by an interaction between light and temperature. Phytopathology 55:1370-1371.
4. CHO, C. T. 1975. Effect of light and temperature on the sporulation and mycelial growth of *Mycosphaerella fragariae*. Korean Journal of Plant Protection 14: 205-208.
5. COCHRAN, W.; COX, G. 1971. Diseño experimental México, Ed. Trillas, S. A., 660 p.
6. DOUGLAS, D. R. 1972. The effect of light and temperature on sporulation of different isolates of *Alternaria solani*. Canadian Journal of Botany 50:629-634.
7. GOULD, C. J. 1949. *Ascochyta pinodella* foot rot in western Washington. Phytopathology 39:947-949.

8. HAFIZ, A. 1951. Cultural studies on *Ascochyta rabiei* with special reference to zonation. *Trans Brit Mycol* 34:259-269
9. IONNAIDIS, N M ; MAIN, C L. 1973. Effect of culture medium on production and pathogenicity of *Alternaria alternata* conidia. *Plant Disease* 57:39-42
10. KUROZAWA, C ; BALMER, E. 1975. Efeito do regime de iluminação na esporulação de *Septoria lycopersici* Speg em três diferentes meios de cultura. *Arquivos do Instituto Biológico* 42:151-156
11. LEACH, C M ; TRIGONE, E J. 1965. An action spectrum for light induced sporulation in the fungus *Ascochyta pisi*. *Plant Physiology* 40:808-812
12. LINDFORD, M B ; SPRAGUE, R. 1927. Species of *Ascochyta* parasitic on the pea. *Phytopathology* 17:381-398.
13. LYNCH, F J ; GEOGHEGAN, M J. 1978. Environmental regulation of variation of *Cercospora beticola*. *Transactions of the British Mycological Society* 71:495-496.
14. MENTEN, J O M ; MARQUES, L A P. 1979. Influencia do inoculo, meio de cultura e regime de luz no desenvolvimento micelial e esporulação de *Mycosphaerella fragariae* (Tul) Lind (*Ramularia tulasnei* Sacc). *Fitopatologia Brasileira* 4:63-71.
15. MLSSIAEN, C M ; CASSINI, R. 1968. Recherches sur les fusarioses. 4. La systématique des *Fusarium*. *Ann. des Epiph* 19:387-459
16. MILLER, P M. 1955. V8 juice as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology* 45:461
17. ONDREJ, M. 1970. Comparative study on some species of *Ascochyta* on nutrient media. *Biologia, Bratislava Ser. A.* 25:679-690.
18. PIMENTEL GOMES, I. 1978. Curso de estadística experimental. Buenos Aires, Arg. Hemisferio Sur. 323 p.
19. RAYNER, R W. 1970. A mycological colour chart. Kew, Surrey, Commonwealth Mycological Institute. 31 p.
20. WOLCAN, S. Efectos de los medios de cultivo, regímenes luminosos y temperaturas sobre el crecimiento y esporulación de *Septoria lycopersici* Speg. Turrialba (en prensa)