

La Viruela de la Remolacha Azucarera

Parte I

I. - Producción de Conidios de *Cercospora beticola* en medios artificiales *

POR

CLOTILDE JAUCH **

Cercospora beticola Sacc., al igual que otras especies de *Cercospora*, posee la característica de producir comúnmente colonias estériles; sólo en forma esporádica da esporos en los medios de cultivo. Las colonias pueden diferenciarse, macroscópicamente, presentando las primeras abundante micelio aéreo, mientras las segundas son achaparradas.

La obtención de conidios es imprescindible, a fin de poder encarar cualquier clase de investigación, como ser la clasificación del microorganismo— siendo insuficiente a tal fin los caracteres culturales y los del cuerpo vegetativo—, las determinaciones de las susceptibilidades varietales, el poder anticriptogámico de los productos, etc.

A fin de obtener una manera sencilla, segura y rápida de producir en medios artificiales abundantes conidios, han sido hechas numerosas tentativas por parte de los investigadores E. W. Schmidt (1928), G. H. Coons y F. G. Larmer (1930), A. Wenzel (1931), E. F. Vestal (1933), C. M. Nagel (1934), H. Darpoux y R. Boiteau (1952), O. Plotho (1952), N. O. Frandsen (1953) y A. Canova (1957 y 1959).

* Trabajo realizado con fondos de la Comisión Administradora del Fondo de Promoción de la Tecnología Agropecuaria. Convenio n° 108, entre la Facultad de Agronomía y Veterinaria, Cátedra Fitopatología y el I.N.T.A. Publ. n° 1.

** Ing. Agr. Profesora Titular del Departamento de Patología Vegetal, orientación Fitopatología.

Con las cepas argentinas de procedencia monospórica, aisladas de remolacha azucarera, correspondientes a los Nros. 165-176 y 245 de la colección de la Cátedra de Fitopatología se experimentaron las técnicas propuestas por Nagel (5), Frandsen (8) y Canova (9 y 10), por cuanto al parecer brindan los mejores resultados. *

Técnica de trabajo

Método n° 1

Se preparó un medio de cultivo a base de decocción de hojas de remolacha y agar, según la técnica de Nagel (5): las hojas de remolacha azucarera (300 gramos) son finamente pisadas para extraer el contenido celular; se añade entonces un litro de agua destilada, más 1,2 % de agar fundido (hervido 5 minutos), luego se cuele a través de un género doble de tipo para queso, se entuba y pone en autoclave a algo menos de una atmósfera de presión (12 libras) durante 15 minutos.

Es de notar que tiene gran importancia de que la presión y el tiempo de permanencia en autoclave sean los indicados, a fin de que el medio de cultivo mantenga el color verde hoja y sea por consiguiente más apropiado para una mayor producción de conidios. Lo expuesto por Nagel, ha sido confirmado por las experiencias realizadas en la cátedra. En efecto la primera vez que se preparó dicho medio al no haberse respetado en su totalidad las indicaciones del autor, el medio de cultivo tenía color verde seco y la producción de esporos fué muy pobre. Referente a la cantidad de agar 1,2 %, es ésta la proporción ideal por cuanto al haber más agua libre sobre la superficie del medio nutritivo, *Cercospora* esporula más abundantemente. Tal condición es la más similar al "habitat" natural de este hongo, que es de alto tenor de humedad.

Método n°2

El medio de cultivo se prepara con tierra de jardín, colocándose una capa de más o menos medio centímetro en una caja de Petri y

* Hay otra posibilidad de obtener abundante producción de esporos sin recurrir a medios artificiales, la que consiste en inocular las plantas con una suspensión en agua de trocitos de colonias de *Cercospora* finamente triturados. De inmediato se colocan a las plantas inoculadas en un ambiente con elevada humedad relativa (95 al 100 %), durante 2 a 3 días, luego en un ambiente de humedad relativa de 60 % aproximadamente. En cuanto aparecen las manchas típicas de *Cercospora*, se recortan las hojas enfermas y se colocan en cámara húmeda; a los pocos días los conidios se forman sobre las manchas.

esterilizándose a una atmósfera durante 20 minutos. Luego se ubican sobre la tierra, hojas de plantas de remolacha adultas, cortadas en tiras largas. Se esteriliza en autoclave a menos de una atmósfera durante 15 minutos. Sobre este medio se pulveriza la suspensión de pequeños trozos de micelio de *Cercospora*, obtenidos triturando en un mortero esterilizado dos colonias gigantes de dos semanas de edad (1, 5 a 2 centímetros de diámetro), a la cual se agregan más o menos diez centímetros de agua para facilitar el triturado. Entre el cuarto y el sexto día aparecen numerosos esporos de *Cercospora*. Estos abundan principalmente en el borde de las tiritas de hojas de remolacha, o sea en contacto con la tierra. Según Frandsen (8) que ideó este método, la producción de conidios sería consecuencia de la acción estimulante de las pectinas contenidas en las plantas de remolacha.

Método n° 3

Se desmenuza en un mortero esterilizado (10) el micelio de una colonia de *Cercospora*, a la cual se agrega agua destilada, sembrándola luego en una caja de Petri con agar papa glucosado. De dichas cajas se recortan a los tres días, cuadraditos de agar de 4 a 5 milímetros de lado, pues para ese tiempo el hongo se ha extendido por todo el medio de cultivo. Los cuadrados recortados se depositan en cajas de Petri, en cuya tapa se coloca previamente un papel de filtro mojado. La colonia se incuba a 25° C. Los conidios aparecen más numerosos en el borde de los cuadraditos que sobre su superficie. Los conidios se obtienen después de 48 horas, a una temperatura de 25° C, y continúan produciéndose por un período de 10 a 14 días. Es fácil separarlos con la ayuda de un pincel.

Método n° 4 (figuras n° 1 y 2).

Se preparan colonias gigantes de *Cercospora beticola* en agar papa glucosado en estufa a 25° C. Cuando la colonia mide alrededor de tres centímetros (más o menos a los diez días), se quita con una lanceta el micelio aéreo, y se ubica nuevamente en estufa a la misma temperatura, después de haber colocado en la tapa de la caja de Petri un papel de filtro embebido con agua. Se recomienda vigilar que el papel se mantenga húmedo en los días sucesivos, recordando que este hongo necesita elevada humedad relativa para fructificar.

Desde las 48 horas, durante más o menos 10 a 12 días, se siguen produciendo numerosos conidios sobre la superficie de la colonia.

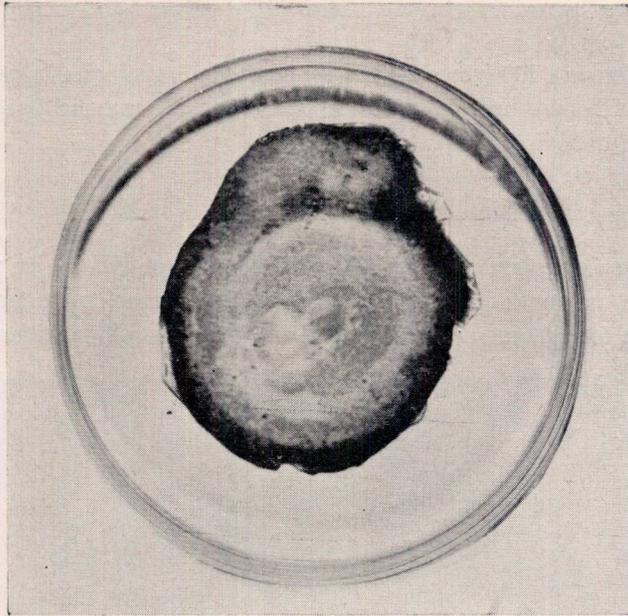


Fig. N^o 1 Colonia de *Cercospora beticola* Sacc. empleada para la producción de conidios. Colonia íntegra con micelio aéreo.

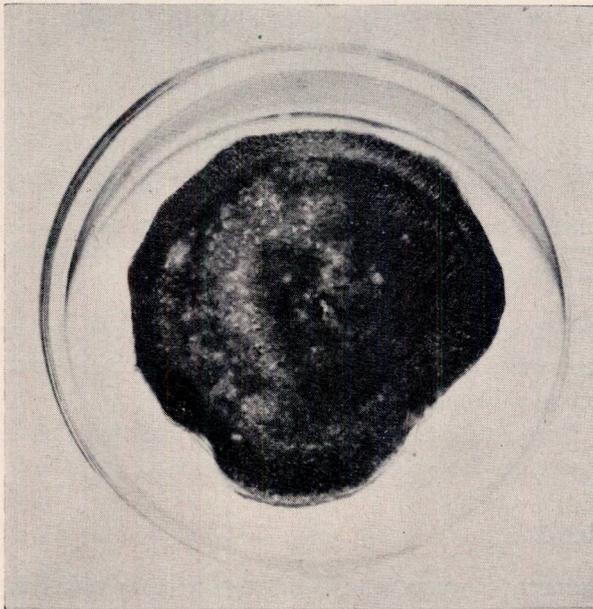


Fig. N^o 2 La misma colonia anterior, sobre cuya superficie se produjo la diferenciación de numerosos conidios, después de que fuera privada del micelio aéreo.

El Canova (10) que concibió este método, opina que la producción de los conidios se debe a la acción mecánica del trauma producido al quebrar el micelio.

Conclusiones.

De los cuatro métodos arriba indicados, el que dió mejor resultado es el citado en segundo término; asimismo la separación de los conidios del micelio se realiza en forma rapidísima, sumergiendo las tiras de hojas

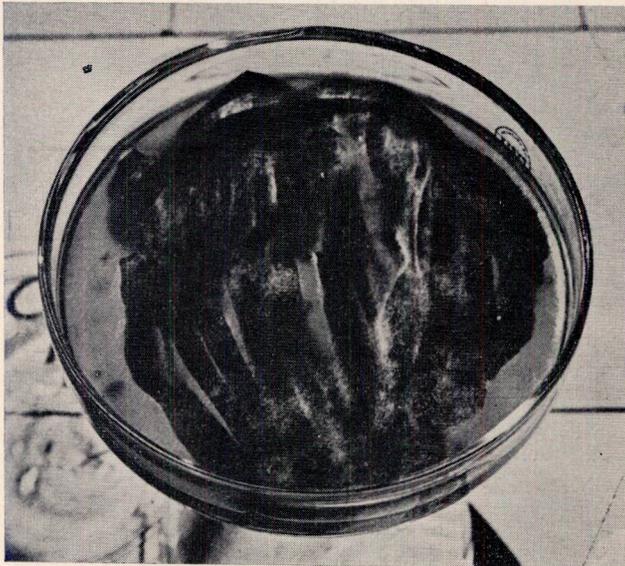


Fig. Nº 3. Colonia de *Cercospora beticola* Sacc. desarrollada en agar agua al 1,5 % al cual se agregaron hojas de remolacha cortadas en largas tiras. Sobre la superficie se formó gran cantidad de conidios.

de remolacha directamente en el agua. La turbidez de la suspensión es el único inconveniente que presenta este método, en el cual la producción de esporos es rápida y abundante.

En los demás métodos 1-3 y 4 hay que arrastrar los conidios con la ayuda de un pincel o de una pequeña espátula.

Nuevo Método.

Se ensayaron algunas modificaciones a estos métodos. El mejor resultado, o sea una abundante esporulación, se obtiene en el medio de cultivo preparado con agar agua al 1,5 % —colocado en caja de Petri— al cual se agregan hojas de remolacha, cortadas en largas tiras (ver

figura n^o 3), esterilizándose 15 minutos en autoclave a menos de una atmósfera (presión 0,7 o 0,8 de atmósfera). La siembra de *Cercospora* se realiza pulverizando el medio de cultivo con una suspensión en agua del micelio bien desmenuzado. En la tapa de la caja de Petri se coloca un papel de filtro mojado, el cual tiene que ser mantenido húmedo, mientras dure la experiencia.

Es ésta la técnica que se adoptará para la producción de esporos en medio artificial en los sucesivos trabajos de investigación con *Cercospora beticola*, por cuanto permite disponer de numerosos esporos en poco tiempo (3 a 4 días) y preparar una límpida suspensión de los mismos.

Al sembrar en una misma caja de Petri dos cultivos monospóricos de *Cercospora* de procedencia distinta, se logró la formación de mayor número de esporos que en las cajas que habían sido sembradas con ambas cepas por separado.

En este caso es posible que se produzcan fenómenos de anastomosis, fusión de hifas y división de éstas, a la cual está conectada primeramente una mezela y luego una segregación de los varios citoplasmas. En esta teoría se basan los trabajos de Calpouzou (11) y de Jinks (12) para explicar la esporulación de *Cercospora musae* y *Aspergillus nidulans* respectivamente.

R E S U M E N

Se ensayaron 4 métodos diferentes para la producción de conidios de *Cercospora beticola*, que posee la característica de producir comúnmente colonias estériles en los medios de cultivo. Se comprobó la superioridad de uno de estos métodos con relación a los tres restantes.

Se da a conocer un nuevo método para lograr la esporulación de *C. beticola* en medios artificiales. Las primordiales ventajas de éste son la disponibilidad de numerosos esporos en poco tiempo (3 a 4 días) y la obtención de una suspensión conidial límpida.

BIBLIOGRAFIA

1. SCHMIDT, E. W. *Untersuchungen über Cercospora Blattfleckenkrankheit der Zuckerrübe*. Zeitschr. Parasitenk. I, 100-137. 1928.
2. COONS, G. H. and F. G. LARMER. *The physiology and variations of Cercospora beticola in pure culture*. Papers of Michigan Acad. of Sci., pp. 33 1930.
3. WENZEL, A. *Beitrage zur Kenntniss der Blattfleckenkrankheit der Zuckerrübe*. Phytopath. Z. III, 519-529. 1931.
4. VESTAL, E. F. *Pathogenicity, host response and control of Cercospora leaf-spot of sugar beets*. Iowa, Agr. Exp. Sta. Bull. 168: 44-72. 1933.
5. NAGEL, C. M. *Conidial production in species of Cercospora in pure culture*. Phytopathology, 24: 1101-1110. 1934.

6. DARPOUX, H. et R. BOITEAU. *Recherches sur la Cercospora beticola effectuées en 1951 à la Station centrale de Pathologie Végétale* Inst. Techn. Fr. Bett. Industr. 12 pp., 1952.
7. PLOTHO, O. *Weitere Vontersuchungen zur Zytologie und Morphologie der Cercospora beticola*. Zucker, 5: 379-383. 1952.
8. FRANDSEN, N. O. *Konidienbildung bei Cercospora beticola in künstlichen Kulturen*. Zucker, 6: 441-443. 1953.
9. CANOVA, A. *Formazione di conidi di Cercospora beticola Sacc in coltura artificiale*. Ann. Sper. Agr. 11 (5): Suppl., pp. XCVII-CVI. 1957.
10. CANOVA, A. *Ricerche su la biologia e l'epidemiologia della Cercospora beticola Sacc*. Ann. Sper. Agr. 13 (1): 37-82. 1959.
11. CALPOUZOS, L. *Controlled sporulation of Cercospora musae Zimm. in pure culture*. Nature, 173: 1084-1085. 1954.
12. JINKS, J. L. *Somatic selection in fungi*. Nature, 164: 409-410. 1953.