REVISTA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA DE BUENOS AIRES
16 (Entrega II) 131-141 Dic., 1965

632.488.43:633.63

Viruela de la remolacha azucarera

Parte II - (*)

Tipos de colonias de Cercospora beticola aislados en el país (**)

POR

CLOTILDE JAUCH (***)

Introducción

Contrariamente a lo que los autores afirman, siempre se tuvo dificultad en aislar *Cercospora beticola* Sacc. en cultivo puro, utilizando los métodos corrientes de aislamiento, dado que en las colonias aparecen infecciones bacterianas. La purificación de las cepas de *Cercospora,* recurriendo a sucesivas acidificaciones del medio de cultivo, da resultado negativo en la mayoría de los casos, por cuanto aunque la cepa parece pura, lo es sólo aparentemente. Al haber permanecido entre algunas hifas unas pocas bacterias, éstas se multiplican con rapidez, en cuanto se deja de acidificar el medio.

Los dos métodos descriptos en este trabajo proporcionaron siempre excelente resultado. El citado en segundo término es el que se usó en la casi totalidad de los casos.

(*) Parte I: ver esta Revista 15 (Entrega 33): 80-86, Dic. 1963.

(**) Trabajo realizado con fondos de la Comisión Administradora del Fondo de Promoción de la Tecnología Agropecuaria Convenio Nº 108, entre Facultad de Agronomía y Veterinaria, Cátedra de Fitopatología y el I.N.T.A. Publicación Nº 3.

(***) Ing. Agr. Profesora titular del Departamento de Patología Vegetal, orientación Fitopatología.

(****) Canova, A. *Ricerche su la biologia e l'epidemiologia della Cercospora beticola* Sacc. *Parte I.* Ann. Sper. Agr. 13 (1): 37 - 82 pág. 64, 1959.

MÉTODOS DE TRABAJO

1er. método

Es el método indicado por Canova (****) que se transcribe a continuación: "De las hojas de plantas enfermas de viruela se limpian prolijamente los conidios existentes sobre la superficie de las manchas y luego se colocan en cámara húmeda para forzar la producción de conidios. Estos últimos, mediante una lanceta son recogidos y dispersados en algunas gotas de agua destilada y estéril, que con anterioridad se habían ubicado sobre la superficie de agar al 5 % en cajas de Petri; sucesivamente, con movimientos oportunos se actúa de manera que el agua con los conidios quede distribuída en una delgada capa sobre la superficie del agar. Las cajas se colocan a incubar en una estufa a 25°C. Una vez empezada la germinación de los conidios se procede a la separación individual de éstos (bajo el microscopio con aumento de 45 diámetros iluminando la superficie del agar por transparencia) mediante el transplante de los discos de agar sobre el que se hallan los conidios. Estos son trasplantados a otras cajas de Petri preparadas con agar papa glucosado".

También se obtuvieron excelentes resultados, agregando neomicina al agar, según lo aconsejado por Schmitthenner e Hilty (1) para aislar *Cercospora beticola* y otros hongos.

2º método

Los aislamientos monospóricos se realizaron con un micromanipulador de tipo casero, cuyo modelo y construcción se deben a la señorita Carmen M. Miche (2), a quien dejamos constancia de nuestro agradecimiento por haber construído para uso de la cátedra uno de estos aparatos y habernos permitido darlo a publicidad. Hemos creído oportuno describirlo y explicar su manipuleo, debido a que presta gran utilidad y su uso es sencillo. En esta Cátedra de Fitopatología permitió solucionar perfectamente la tarea de los aislamientos monospóricos, hasta que pudo adquirirse un micromanipulador Leitz equipado con microscopio Laborlux II.

(1) SCHMITTHENNER, A. F. and J. W. HILTY. A modified dilution technique for obtaining single spore isolates of fungi from contaminated material. Phytop. 52: 582-583. 1962.

(2) La señorita Carmen M. Miche ideó este modelo de micromanipulador, mientras desempeñaba la tarea de ayudante de la doctora Elisa Hirschhorn en el Instituto de Fitotecnia de Castelar (I.N.T.A.).

Acondicionamiento del micromanipulador

Hay que disponer de dos microscopios, que se indican en las ilustraciones con las letras X y XX, siendo X un microscopio en desuso y XX un microscopio provisto de platina Charriot.

Al microscopio X se le aplica en su platina una varilla de vidrio. Dicha varilla está sujeta a un soporte, que se coloca sobre la platina del microscopio o micromanipulador (fig. 1). El soporte está constituído por una planchuela de acero doblada en U como puede obser-

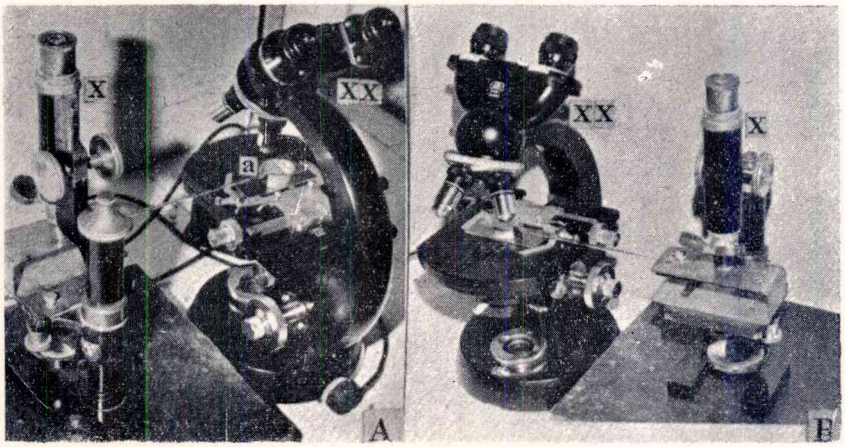

Fig. 1 — Vista de conjunto del micromanipulador: A. en posición de trabajo B. visto de frente. X micromanipulador; XX microscopio provisto de platina Charriot; a. camarita de hojalata con abertura al costado, que sustenta un cubre objeto de 30 x 30 mm.

varse en la figura 2 A; mide aproximadamente 10 cm. de largo, 4 cm. de ancho, dejando un espacio de 3,5 cm. La varilla b puede fijarse mediante el tornillo c; mide 16 cm. de largo y 2 mm. de diámetro, terminando en una finísima aguja doblada hacia arriba.

Los tornillos macro y micrométrico del microscopio X (fig. 1) proporcionan los movimientos en sentido vertical. La platina del microscopio XX permite los movimientos en sentido horizontal.

Se prepara un portaobjeto, en el que se coloca un trozo de hojalata en forma circular con una abertura al costado (fig. 3), y sobre éste un cubreobjeto de 30 x 30 mm., que lleva 4 trozos cuadrados (b) de agar papa, de aproximadamente 4 x 4 mm. de lado y 1,5 mm. de espesor (fig. 4) y un trozo rectangular (a) de agar papa de 5 x 16 mm. En un costado de la pequeña cámara formada es conveniente colocar un trozo de algodón empapado en agua, para evitar que se seque el ma-

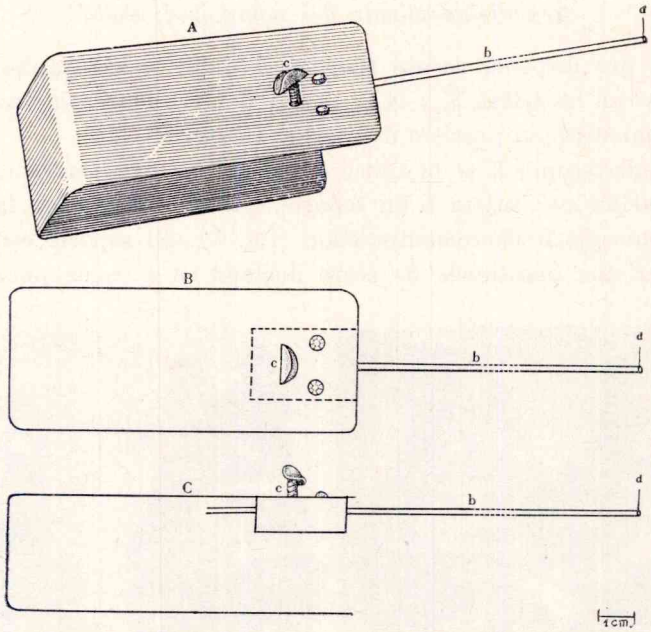

Fig. 2 — Soporte constituido por una planchuela de acero doblada en U. A. el soporte en perspectiva; B. parte superior del soporte; C. corte transversal del soporte.

Fig. 3 Fig. 4 Fig. 5

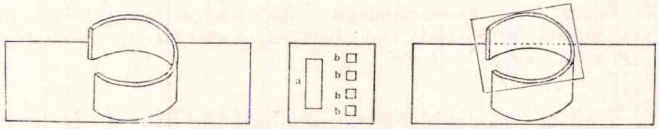

Fig. 3 — Camarita de hojalata de forma circular con una abertura al costado.
Fig. 4 — Cubre objeto de 30 x 30 mm. que lleva cuatro trozos cuadrados (b) de agar papa y un trozo rectangular (a) de agar papa.
Fig. 5 — Camarita lista para ser usada: el cubre objeto lleva en su cara inferior los trozos de agar papa, que ilustra la figura 4.

terial. El portaobjeto así armado se ubica en la platina Charriot del microscopio XX (fig. 1).

Modus operandi: Se enfrenta la aguja ubicada sobre la platina del microscopio X (fig. 3) con la entrada de la cámara (fig. 1 a y fig. 5) y se desplaza el micromanipulador X y el microscopio XX hasta que la punta coincida con el foco del microscopio.

Se aparta el portaobjeto y se procede a enfocar la aguja en el centro del campo, moviendo el micrométrico del micromanipulador. Una vez obtenido esto se dejan fijos el micromanipulador y el microscopio. La aguja quedará permanentemente sobre el centro del campo, desplazándose sólo de arriba hacia abajo y viceversa.

Se baja la aguja con el micrométrico del micromanipulador X y se desplaza la platina Charriot hasta enfocar los esporos (fig. 2 a).

Ubicado uno de ellos se sube la aguja, se hace adherir un esporo a su punta, se la baja nuevamente, se desplaza la platina hasta enfocar un trocito de agar papa (fig. 4 b) sobre el que se deja el esporo.

Finalmente se toma cada trocito y se coloca en un tubo con agar papa glucosado en pico de flauta y se lleva a la estufa a 25º C.

Es obvio hacer notar que todo el manipuleo debe hacerse en condiciones de absoluta asepsia.

Material

Las exsiccatas de *Cercospora beticola* de las que se realizaron aislamientos monospóricos están guardadas en la Cátedra de Fitopatología, bajo los siguientes números:

nº exsiccata	Remolacha azucarera variedad
469	Zwanessee
470	Poly Kühn
471	Cercopoly
472	Nemme
473	Klein Wanzleben E.
474	Kühn C. R.
475	Kühn C. R.
476	Kühn Poly
477-486-491	Nemos
478	Hilleshög
479	Klein Wanzleben E.
480	Kühn P
481	Kühn P
482-494	Polyrave
483	Hilleshög R. Poliploide
484	Hilleshög Standard Poliploide
485-493	Trirave
487	Kühn R.
488	Pedigree Van der Have
489	Zwanessee 111
490-495	Hilleshög R.
492	Zwaan Poly

C. Descripción de los síntomas macroscópicos

La descripción que suele encontrarse de las manchas debidas a *Cercospora beticola* es la siguiente: Las manchas son al principio dis-

persas y angulosas, luego más o menos redondeadas, de margen pardo, rojo púrpura o rojo violáceo ([1]), deprimidas en su centro en el que más tarde aparecen diminutos puntos negros constituidos por los cuerpos estromáticos (subículo), que originarán los conidióforos y los esporos. Se vuelven confluentes en los ataques graves.

El centro de las manchas varía del pardo al gris ceniciento, color que depende de la humedad ambiente. El diámetro de las mismas es de 1 a 2 mm., pudiendo alcanzar hasta 4 mm.

Además la viruela puede manifestarse presentando manchas de notables dimensiones, que luego se transforman en largas y amplias zonas secas, casi siempre carentes de la reacción antociánica.

En un período de baja humedad relativa las manchas del primer tipo son de color pardo, variable desde un tinte amarillento a un pardo ceniza, ya que soportan sólo conidióforos estériles. Por el contrario bajo la acción de la humedad se vuelven rápidamente gris plata, aterciopeladas y acto seguido emiten numerosos conidios hialinos ([2]).

Una observación detenida y prolija de los síntomas permitió comprobar que existían ciertas variantes como ser tamaño de la lesión, color del halo y del centro de la mancha. Se procedió entonces a estudiar si a estas variaciones de las características macroscópicas de las manchas, respondían diferencias culturales. Al comprobarse que no era así, se procuró determinar si estas diferencias eran consecuencia de una reacción varietal de la planta de remolacha azucarera frente al ataque de *Cercospora*. Es ésta la conclusión a la que se llegó, o sea, que las variedades de remolacha azucarera reaccionan en forma diferente al ataque de este hongo.

VARIACIONES MORFOLÓGICAS DE CEPAS MONOSPÓRICAS DE CERCOSPORA BETICOLA

Al realizar los aislamientos monospóricos ([3]) en agar papa glucosado al 2 %, pH = 7, se obtiene una gama variada de colonias de *Cercospora* ([4]) ([5]), lo cual hay que tener presente cuando se

([1]) CHUPP, CH. *A monograph of the fungus genus Cercospora.* Ithaca, N. York, 1953.

([2]) VIENNOT BOURGIN. *Les champignons parasites des plantes cultivées.* Tomo II: 1516-1527 1949.

([3]) Los aislamientos monospóricos han sido realizados en su mayoría por el técnico Francisco Pesoa.

([4]) FRANDSEN, N. O. *Untersuchungen über Cercospora beticola.* I. *Verhalten des Pilzes in Künstlicher Kultur.* Zucker 8: 451 - 456. 1955.

([5]) CANOVA, A. Ver cuadro X del trabajo de este autor, *op. cit.*

empieza a trabajar con esta especie fungícola, para evitar su eliminación creyéndolas infecciones.

En el cuadro nº 1, se han reunido las características morfológicas de 93 cepas monospóricas, considerándose el desarrollo del micelio aéreo, el color del mismo, la pigmentación del substrato y la profundidad de la pigmentación en el medio de cultivo. Se utilizó para la designación del color, el tratado de Ridgway "Color Standard and color nomenclature". - Washington D.C. 1962.

No se asentó la producción de conidios en columna separada por cuanto éstos aparecieron sólo en cinco cepas de las 93 aisladas, dato que se especificó en cada caso al pie de página.

Resumen

Se describen minuciosamente los dos métodos usados para aislar *Cercospora beticola* Sacc., por considerarlo de utilidad, dado lo engorroso que resulta aislar dicho hongo en cultivo puro.

Se especifican las variaciones morfológicas de 93 cepas monospóricas de *Cercospora beticola* aisladas de diferentes localidades del país, tomándose en cuenta el desarrollo del micelio aéreo, el color del mismo, la pigmentación del substrato, la profundidad de la pigmentación en el medio de cultivo y la producción de conidios en los limitados casos que ésta se manifestó.

Por su practicidad se describe un micromanipulador de tipo casero inédito, ideado por la técnica señorita Miche.

Summary

Two method used to isolate *Cercospora beticola Sacc.* are described. It is related minutely a micromanipulator of the home-made type not published up to now. In a table are joined morphologic variations of 93 monosporic cultures of *Cercospora beticola* proceeding from different localities of Argentina. Culture characteristics are grown of mycelium, color, substratum pigmentation, depth of pigmentation in the culture medium and the production of conidia, in the few opportunities that ones have appeared.

CUADRO nº 1

VARIACIONES MORFOLOGICAS DE CEPAS MONOSPORICAS DE CERCOSPORA BETICOLA Sacc. en AGAR PAPA GLUCOSADO AL 2 %, pH = 7

Nº de cepas	*Procedencia*	*Desarrollo del micelio aéreo*	*Color del micelio aéreo*	*Pigmentación del substrato* (x)	*Profundidad de la pigmentación en el medio de cultivo*
131	(1)	abundante	rosado	Raw Sienna III 17 i	2 mm.
132	(1)	no sobrelevado	rosado	Olive - Buff XL 21 ''' d	2 mm.
133	(1)	tipo fieltro	blanco	Tea Green XLVII 25 ''' b	2 mm.
134	(1)	escaso	blanco en parte amarillento	Olive Buff XL 21 ''' d	3 mm.
135	(1)	escaso	rosado	Olivaceous Black XLVI 21 '''' m	2 mm.
136	(1)	abundante	rosado	Grayish Olive XLVI 21 '''' —	1 mm.
137	(1)	escaso	grisáceo	Pale Olive - Buff XL 21 ''' f	2 mm.
138	(1)	abundante	rosado	Yellowish Glaucous XLI 25 ''' f	—
139	(1)	abundante lanudo	rosado	Dark Ivy Green XLVI 25 '''' k	2 mm.
140	(1)	abundante	grisáceo	Dark Olive - Gray LI 23 ''''' i	—
141	(2)	tipo fieltro	rosado	Dusky Olive - Green XLI 25 ''' m	2 mm.
142	(2)	escaso tipo fieltro *	rosado	Pale Vinaceous - Lilac XLIV 69 '''	—
143	(2)	abundante	rosado	Tea Green XLVII 25 '''' b	2 mm.
144	(2)	escaso tipo fieltro *	grisáceo	Deep Grayish Olive XLVI 21 ''' i	2 mm.
145	(2)	abundante	rosado	Vetiver Green XLVII 25 '''' —	2 mm.
146	(2)	abundante	rosado	Deep Olive - Buff XL 21 ''' k	1 mm.
147	(2)	abundante lanudo	rosado	Pois Green XLI 29 ''' i	—
148	(2)	abundante	rosado	Olive XXX 21 '' m	1 mm.
149	(2)	abundante	rosado	Tawny-Olive XXXIX 17 '' i	2 mm.
150	(2)	abundante lanudo	rosado	Yellowish Olive XXX 23 '' k	2 mm.
151	(2)	abundante	rosado	Brownish Olive XXX 19 '' m	3 mm.
152	(2)	tipo fieltro	rosado	Citrine-Drab XL 19 ''' i	2 mm.
153	(2)	escaso *	grisáceo	Deep Grayish Olive XLVI 21 '''' i	1 mm.
154	(2)	abundante	rosado	Citrine-Drab XL 19 ''' i	2 mm.
155	(3)	no muy abundante	grisáceo	Olivaceous Black (2) XLVII 25 '''' m.	3 mm.
156	(3)	no muy abundante	grisáceo	Dark Yvy Green XLVI 25 '''' k.	3 mm.

(*) Del ''Ridgway'' Color standards and color nomenclature - Washington. D. C. 1912.

Los aislamientos se realizaron con material de remolacha azucarera procedente de:

(1) Estación Experimental de Balcarce (I.N.T.A.) var. Kühn R.

(2) Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires, variedad K.W.E.

(3) Chacra Experimental de Pereira Iraola (Secr. As. Agr. de la Prov.) - variedad Cercopoly.

(*) Producción de conidios.

Nº de cepas	Procedencia	Desarrollo del micelio aéreo	Color del micelio aéreo	Pigmentación del substrato	Profundidad de la pigmentación en el medio de cultivo
157	(3)	no muy abundante	grisáceo	Deep Grayish Olive XLVI 21 '''' I	1 mm.
158	(3)	abundante	blanco	Dark Grayish Olive XLVI '''' k.	2 mm.
159	(3)	no muy abundante	grisáceo	Deep Grayish Olive XLVI 21 '''' i.	2 mm.
160	(3)	abundante	blanco	Dark Ivy Green XLVI 25 '''' k.	2 mm.
161	(3)	no muy abundante	grisáceo	Deep Grayish Olive XLVI 21 '''' i.	2 mm.
162	(3)	no muy abundante	grisáceo	Dark Ivy Green XLVI 25 '''' k.	2 mm.
163	(3)	no muy abundante	grisáceo	Olivacecus Black (2) XLVII 25 '''' m	2 mm.
164	(3)	no muy abundante	grisáceo	Dark Ivy Green XLVI 25 '''' k.	2 mm.
165	(4)	escaso	grisáceo	Deep Grayish Olive XLVI 21 '''' i	4 mm.
166	(4)	escaso	grisáceo	Deep Grayish Olive XLVI 21 '''' i	4 mm.
167	(4)	abundante	gris oscuro	Yew Green XXXI 27 '' m	4 mm.
168	(4)	escaso	gris oscuro	Dark Greenish Olive XXX 23 '' m.	3 mm.
169	(4)	escaso	gris	Yow Green XXXI 27 '' m	3 mm.
170	(4)	escaso	grisáceo	Ivy Green XXXI 25 '' m	2 mm.
171	(4)	no sobrelevado	grisáceo	Lincoln Green XLI 25 ''' k	2 mm.
172	(4)	escaso	grisáceo	Pois Green XLI 29 ''' i	2 mm.
173	(4)	escaso	gris	Slate-Olive XLVII 29 '''' i	3 mm.
174	(4)	escaso	gris	Leaf Green XLI 29 ''' k	3 mm.
175	(4)	escaso	gris	Leaf Green XLI 29 ''' k	2 mm.
176	(4)	escaso *	gris ceniciento	Leaf Green XLI 29 ''' k	4 mm.
177	(4)	escaso	gris ceniciento	Deep Grape Green XLI 25 ''' i	2 mm.
178	(4)	escaso	gris	Deep Greenish Glaucous XLI 29 ''' d	3 mm.
179	$(4)_1$	escaso	rosado	American Green XLI 33 ''' i	1 mm.
180	$(4)_1$	abundante	rosado	American Green XLI 33 ''' i	3 mm.
181	$(4)_1$	abundante	rosado	Leaf Green XLI 29 ''' k	2 mm.
182	$(4)_1$	abundante	rosado	Dusky Yellowish Green XLI 27 ''' m	3 mm.
183	$(4)_1$	abundante	rosado	Slate-Olive XLVII 29 '''' i	2 mm.
184	$(4)_1$	abundante	gris ceniciento	Grayish-Olive XLVI 21 '''' —	2 mm.
185	$(4)_1$	abundante	gris ceniciento	Lincoln Green XLI 25 ''' k	2 mm.
186	$(4)_1$	abundante	rosado	Pois Green XLI 29 ''' i	2 mm.
187	$(4)_1$	abundante	rosado	Asphodel Green XLI 29 ''' —	2 mm.

(3) Chacra Experimental de Pereira Iraola, variedad Cercopoly.

(4) Establecimiento ''Del Sud'' (Mar del Plata), variedad K. W. N.

$(4)_1$ Establecimiento ''Del Sud'' (Mar del Plata), variedad K.W.Z.

(*) Producción de conidios.

Nº de cepas	Procedencia	Desarrollo del micelio aéreo	Color del micelio aéreo	Pigmentación del substrato	Profundidad de la pigmentación en el medio de cultivo
188	$(4)_1$	abundante	rosado	Pois Green XLI 29 ''' i.	2 mm.
189	$(4)_1$	abundante	rosado	Andover Green XLVII 25 '''' i.	3 mm.
190	$(4)_1$	abundante	rosado	Leaf Green XLI 29 ''' k	3 mm.
191	$(4)_1$	escaso	rosado	Dusky-Olive-Green XLI 25 ''' m.	3 mm.
192	$(4)_1$	escaso	rosado	Lincoln Green XLI 25 ''' k	2 mm.
193	$(4)_1$	abundante	rosado	Lincoln Green XLI 25 ''' k	2 mm.
194	$(4)_1$	abundante	rosado	Leaf Green XLI 29 ''' k	2 mm.
195	$(4)_1$	abundante	gris	Dull Blachish Green XLI 29 ''' m	2 mm.
196	$(4)_1$	escaso	gris	Pois Green XLI 29 ''' i	1 mm.
197	$(4)_1$	escaso	gris	Deep Grape Green XLI 25 ''' i	2 mm.
198	$(4)_1$	escaso	gris	Lincoln Green XLI 25 ''' k	2 mm.
199	$(4)_1$	escaso	gris	Lincoln Green XLI 25 ''' k	2 mm.
200	$(4)_1$	escaso	gris	Pois Green XLI 29 ''' i.	2 mm.
201	$(4)_1$	escaso	gris	Pois Green XLI 29 ''' i	2 mm.
202	$(4)_1$	escaso	gris	Deep Grape Green XLI 25 ''' i	2 mm.
203	$(4)_1$	escaso	gris	Deep Grape Green XLI 25 ''' i	2 mm.
204	$(4)_1$	escaso	gris	Deep Grape Green XLI 25 ''' i	2 mm.
205	$(4)_1$	escaso	gris	Deep Grape Green XLI 25 ''' i	2 mm.
206	$(4)_1$	escaso	gris rosado	Dark American Green XLI 29 ''' k	1 mm.
207	$(4)_1$	escaso	gris	Dull Blachhish Green XLI 29 ''' m.	1 mm.
208	$(4)_1$	escaso *	gris	Leaf Green XLI 29 ''' k.	2 mm.
209	$(4)_1$	escaso		Pois Green 29 ''' i XLI	2 mm.
210	$(4)_1$	escaso	rosado	Deep Grape Green XLI 25 ''' i.	2 mm.
211	$(4)_1$	abundante	amarillento	Asphodel Green XLI 29 ''' —	1 mm.
212	$(4)_1$	escaso		Pois Green 29 ''' XLI-i	2 mm.
213	$(4)_2$	abundante	rosado amarillento	Hay's Lilac XXXVII 63 '' d	1 mm.
214	$(4)_2$	abundante	rosado amarillento	Hay's Lilac XXXVII 63 '' d	1 mm.
215	$(4)_2$	abundante	rosado amarillento	Hay's Lilac XXXVII 63 '' d	1 mm.
216	$(4)_2$	blanco en parte amarillento	rosado amarillento	Olive XXX 21 '' m.	1 mm.
217	$(4)_2$	abundante	rosado amarillento	Hay's Lilac XXXVII 63 '' d	1 mm.

$(4)_1$ Establecimiento ''Del Sud'' (Mar del Plata), variedad K.W.Z.

$(4)_2$ Establecimiento ''Del Sud'' (Mar del Plata), variedad U.S. 52.

(*) Producción de conidios.

Nº de cepas	*Procedencia*	*Desarrollo del micelio aéreo*	*Color del micelio aéreo*	*Pigmentación del substrato*	*Profundidad de la pigmentación en el medio de cultivo*
218	$(4)_2$	abundante	rosado amarillento	Hay's Lilac XXXVII 63 '' d	1 mm.
219	$(4)_2$	abundante	rosado amarillento	Hay's Lilac XXXVII 63 '' d	1 mm.
220	$(4)_2$	abundante	rosado amarillento	Olive XXX 21 '' m.	1 mm.
221	$(4)_2$	abundante	rosado amarillento	Hay's Lilac XXXVII 63 '' d	2 mm.
222	$(4)_2$	no sobrelevado	grisáceo	Jade Green XXXI 27 '' k	2 mm.
223	$(4)_2$	escaso	gris	Grayish-Olive XLVI 21 '''' —	2 mm.

$(4)_2$ Establecimiento ''Del Sud'' (Mar del Plata), variedad U.S. 52