

## METODO SIMPLE PARA LA OBTENCION DE INOCULO DE *Septoria tritici* ROB. EX DESM.

Analfá Perello\*, Cristina Cordo\*, Silvia Wolcan\* y S. Sarandón\*\*

\*Cátedra de Fitopatología y \*\*Cátedra de Cerealicultura, Facultad de Agronomía de La Plata, CC 31 (1900) La Plata, Argentina.

Recibido: 10-5-1988

Aceptado: 2-0-1988

La conducción de estudios sobre grados de virulencia de *Septoria tritici*, así como la detección de fuentes de resistencia varietal en el trigo, requieren el empleo de inoculaciones artificiales en ensayos conducidos ya sea en el campo o en un invernáculo. En dichas inoculaciones se emplean tanto picnidiosporas (Cooke y Jones, 1970) (Hilu y Bever, 1957) (Lee y Jones, 1974) como conidios secundarios (Ballantyne, 1983) (Eyal, Amiri y Wahl, 1973) obtenidos mediante técnicas engorrosas o poco prácticas para la producción de inóculo en gran escala.

Con respecto a los conidios secundarios, Jones y Lee (1974) describieron su morfofisiología en cultivo artificial e indicaron una mayor velocidad de producción respecto de las picnidiosporas. Djerbi (1972) documentó su producción "in vitro" y Annone (1988) confirmó su ocurrencia "in vivo" sobre hojas de trigo.

Los antecedentes bibliográficos (Annone, 1984) (Djerbi, op. cit.) indican el hábito de crecimiento conidial o levaduriforme de muchos aislamientos de *S. tritici*, en contraposición con el de tipo miceliar de otros. En la Argentina, se desconoce el comportamiento de los diferentes aislamientos del patógeno en cuanto a la producción y permanencia del estado levaduriforme en cultivo artificial. Asimismo, no está comprobado si ambos tipos de esporas poseen igual capacidad infectiva.

La presente investigación se condujo con el objeto de conocer el hábito de crecimiento de varios aislamientos de *S. tritici* y comparar la patogenicidad de las picnidiosporas con la de los conidios secundarios del hongo. La finalidad fue presentar una alternativa de

producción de inóculo en forma rápida y abundante mediante el empleo de los conidios secundarios.

**Producción de inóculo:** Se trabajó con 27 cepas de *S. tritici* aisladas según las técnicas de rutina (Eyal et al., 1987) a partir de hojas de trigo de distintas variedades, infectadas naturalmente. Dicho material provino de diversas localidades trigueras de la provincia de Buenos Aires.

La suspensión de picnidiosporas de cada cepa se sembró en el medio agar agua al 2 0/0. Al cabo de 5 - 6 días se visualizaron pequeñas colonias monospóricas que se transfirieron al medio agar extracto de malta "Oxoid" modificado (AMM) (30 g de extracto de malta, 5 g de peptonas micológicas, 2 g de extracto de levadura, 20 g de agar y 1000 ml de agua destilada) dispuesto en tubos en pico de flauta designados "tubos madre". Entre el 4to. y 5to. día de cultivo desarrolló una colonia levaduriforme, rosada, circular, mucosa, de conidios secundarios, la cual se extendió en zigzag con una asa. Esto incrementó la producción de conidios desarrollando una estría voluminosa sobre la superficie del agar. A los 3 días se multiplicó el inóculo por extendido a nuevos tubos en pico de flauta. Otra alternativa consistió en el empleo de Erlenmeyers de 250 ml de capacidad con 50 ml del medio citado, dispuesto en forma inclinada. Las condiciones de cultivo fueron: a) temperatura ambiente de laboratorio ( $18 \pm 3$  °C) y luz natural difusa (12 h de luz - oscuridad) y b) conservación en frío (cámara refrigerante a 5 °C) y oscuridad.

Se analizó la formación y estabilidad de los conidios secundarios de las 27 cepas según lo siguiente: cada aislamiento se cultivó en 10

tubos del medio AMM para cada combinación aislamiento condición de cultivo. Al final de la experiencia se observaron 540 tubos. Se siguió la evolución de cada aislamiento hasta la estromatización de la colonia.

**Pruebas de patogenicidad:** Para comparar la patogenicidad de los conidios secundarios y de las picnidiosporas de *S. tritici*, se inocularon plantas de trigo de una variedad resistente (Norking Lider), intermedia (Buck Pangaré) y susceptible (Marcos Juárez INTA) según los comportamientos registrados en el ETRE (Rodríguez Amieva et al, 1980, 1981, 1982 y 1983).

El inóculo empleado se obtuvo a partir de un aislamiento altamente virulento proveniente de la variedad Victoria INTA. Las inoculaciones se efectuaron con conidios secundarios de 9 días desarrollados en AMM y con picnidiosporas de 38 días cultivadas sobre agar Czapek Dox V' 8 (ACDV' 8) según la técnica de Lee y Jones (1974).

Las plantas de trigo se inocularon en el estado de 3a hoja mediante la pulverización de conidios secundarios o de picnidiosporas suspendidos en agua destilada estéril. En ambos casos la concentración se ajustó con el Hematócitómetro de Neubauer (Jairo Castaño, 1986) a  $8 \times 10^6$  conidios/ml. Para obtener tal concentración en volumen de 200 ml, se emplearon los conidios secundarios desarrollados en diez tubos o en un Erlenmeyer con el medio AMM y las picnidiosporas desarrolladas en 200 tubos o en 20 Erlenmeyers con el medio ACDV, 8. Las plantas, luego de inoculadas, se mantuvieron 96 h en una cámara húmeda. El ensayo se condujo en un invernáculo a temperatura media mínima de 10 °C y media máxima de 25 °C.

Para los 2 tratamientos se empleó un diseño factorial enteramente al azar con 2 repeticiones. Se destinaron 5 plantas/maceta y 3 macetas/tratamiento. La evaluación se efectuó a los 28 días en la tercera hoja de cada planta donde se consideró el porcentaje de área foliar cubierta por picnidios. Los resultados se compararon mediante un análisis de varianza y las diferencias mínimas significativas se analizaron según la prueba de Tuckey ( $P = 0,01$ ).

Todas las cepas ensayadas produjeron en cultivo conidios secundarios que permanecieron

sin cambio entre 8 y 13 días. La producción de inóculo a los 10 días osciló entre  $1,2 \times 10^6$  y  $1,7 \times 10^6$  conidios/ml x tubo y entre  $1,5 \times 10^7$  y  $2,4 \times 10^7$  conidios/ml x Erlenmeyer según la cepa considerada. Para este tiempo, las picnidiosporas no habían desarrollado, extendiéndose a 35 días el tiempo necesario para obtener una concentración de inóculo equivalente.

Con respecto a las condiciones de cultivo, la temperatura no modificó los hábitos de crecimiento levaduriforme o mucoso y picnidial, pero sí su perdurabilidad. En los cultivos mantenidos a baja temperatura (5 °C) se observó mayor duración del estado mucoso. En algunos aislamientos este estado permaneció inalterado luego de varios meses de observación.

En cuanto a la patogenicidad, los conidios secundarios y las picnidiosporas produjeron el mismo tipo de síntoma. Dentro de cada variedad no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de área foliácea afectada por los distintos tipos de inóculo. Sí se observaron diferencias de susceptibilidad entre las variedades (Tabla 1). El período transcurrido hasta la aparición de picnidios en el 50 % de las plantas de cada tratamiento fue de 18 días.

A través de los resultados obtenidos se comprobó que la totalidad de las cepas ensayadas produjeron conidios secundarios en la primera etapa de su desarrollo, luego de lo cual, la mayoría estromatizó, mientras que otros envejecieron en este estado sin fructificar. Esto mismo fue observado por Annone (Op. cit, 1984) quien describió la ocurrencia de varios tipos culturales en cepas extranjeras. Lee y Jones (Op. cit) indicaron una mayor velocidad de producción de conidios secundarios con respecto a las picnidiosporas en medio sólido. Los resultados de la presente experiencia corroboraron lo anterior: en la obtención de conidios secundarios se necesitó una vigésima parte del sustrato (AMM) y una cuarta parte del tiempo de incubación requeridos para la producción de picnidiosporas. La técnica desarrollada en este trabajo presenta las siguientes ventajas: 1) se independiza el desarrollo del cultivo de la exposición a luz cercana a la ultravioleta (Cooke y Jones, op. cit.; Lee y Jones, op. cit.);

Tratamientos	MJ	BP	NL	Promedio de tratamientos
Conidios secundarios	25,90 a	19,80 a	28,70 a	24,80 a
Picnidiosporas	28,50 a	18,70 a	27,20 a	24,80 a
Promedio de variedades	27,20 A	19,20 B	28,00 A	

TABLA 1: Area foliar de trigo afectado por picnidiosporas y conidios secundarios de *S. tritici*. Variedades: Marcos Juárez INTA (MJ), Buck Pangaré (BP) y Norking Líder (NL). Interacción variedades por tratamiento: no significativa. Dentro de cada columna, los valores seguidos por la misma letra en minúscula no difieren estadísticamente entre sí al nivel de 0,01 de probabilidades. Los valores seguidos por la misma letra en mayúscula no difieren estadísticamente entre sí al nivel de 0,01 de probabilidades.

2) se elimina el prolongado período de incubación de los cultivos (Hilu y Bever, op. cit.) y 3) se suprime el agitado mecánico continuo (Ballantyne, op. cit., y Eyal, Amiri y Wahl, op. cit.) y el posterior filtrado del inóculo para eliminar los restos miceliarios.

Se concluye que los conidios secundarios de *S. tritici* obtenidos en medio sólido y a baja temperatura (5 °C) constituyeron una fuente de inóculo de producción más rápida y sencilla

que empleando picnidiosporas. Su uso es especialmente ventajoso en ensayos donde se requiera manejar simultáneamente grandes volúmenes de inóculo, de distintos aislamientos.

Además, la similitud de reacción hallada al inocular con picnidiosporas y con conidios secundarios permite resultados comparables al emplear indistintamente uno u otro tipo de esporas.

#### BIBLIOGRAFIA

- Annone, J. G. Cultural types of *Septoria tritici* Rob. ex. Desm. Occurrence in Washington, stability and virulence. M. S. Thesis. Washington State University, Pullman, Washington. 68 pp. (1984).
- ..... Observación de conidios secundarios de *Septoria tritici* por medio de impresiones foliares. Informe Técnico INTA No 214: 1-15. (1988).
- Ballantyne, B. In: Proceedings of Australian Plant Breeding Conference. Adelaide, 14-18 February, 1983, pp 329-330.
- Cooke, B. M. and G. D. Jones. A Field Inoculation Method for *Septoria tritici* and *Septoria nodorum*. Plant Path 19: 72-74. (1970).
- Djerbi, M. Contribution a l'étude de la sporulation du *Septoria tritici* Desm. Arch. Inst. Pasteur. Tunis 49 (1/2): 61-68.
- Eyal, Z.; Z. Amiri and I. Wahl. Physiological specialization of *Septoria tritici*. Phytopathology 63: 1087-1089. (1973).
- Eyal, Z.; A. L. Scharen; J. M. Prescott y M. Van Ginkel. Enfermedades del trigo causados por *Septoria*: conceptos y métodos relacionados con el manejo de estas enfermedades. CIMMIT, Méjico, D. F., 52 pp, (1987)
- Hilu, H. M. and W. M. Bever. Inoculation, oversummering and suscept-pathogen relationship of *Septoria tritici* on *Triticum* species. Phytopathology 47: 474-480. (1957).

Tratamientos	MJ	BP	NL	Promedio de tratamientos
Conidios secundarios	25,90 a	19,80 a	28,70 a	24,80 a
Picnidiosporas	28,50 a	18,70 a	27,20 a	24,80 a
Promedio de variedades	27,20 A	19,20 B	28,00 A	

TABLA 1: Area foliar de trigo afectado por picnidiosporas y conidios secundarios de *S. tritici*. Variedades: Marcos Juárez INTA (MJ), Buck Pangaré (BP) y Norking Líder (NL). Interacción variedades por tratamiento: no significativa. Dentro de cada columna, los valores seguidos por la misma letra en minúscula no difieren estadísticamente entre sí al nivel de 0,01 de probabilidades. Los valores seguidos por la misma letra en mayúscula no difieren estadísticamente entre sí al nivel de 0,01 de probabilidades.

2) se elimina el prolongado período de incubación de los cultivos (Hilu y Bever, op. cit.) y 3) se suprime el agitado mecánico continuo (Ballantyne, op. cit., y Eyal, Amiri y Wahl, op. cit.) y el posterior filtrado del inóculo para eliminar los restos miceliares.

Se concluye que los conidios secundarios de *S. tritici* obtenidos en medio sólido y a baja temperatura (5 °C) constituyeron una fuente de inóculo de producción más rápida y sencilla

que empleando picnidiosporas. Su uso es especialmente ventajoso en ensayos donde se requiera manejar simultáneamente grandes volúmenes de inóculo, de distintos aislamientos.

Además, la similitud de reacción hallada al inocular con picnidiosporas y con conidios secundarios permite resultados comparables al emplear indistintamente uno u otro tipo de esporas.

#### BIBLIOGRAFIA

- Annone, J. G. Cultural types of *Septoria tritici* Rob. ex. Desm. Occurrence in Washington, stability and virulence. M. S. Thesis. Washington State University, Pullman, Washington. 68 pp. (1984).
- ..... Observación de conidios secundarios de *Septoria tritici* por medio de impresiones foliares. Informe Técnico INTA No 214: 1-15. (1988).
- Ballantyne, B. In: Proceedings of Australian Plant Breeding Conference. Adelaide, 14-18 February, 1983, pp 329-330.
- Cooke, B. M. and G. D. Jones. A Field Inoculation Method for *Septoria tritici* and *Septoria nodorum*. Plant Path 19: 72-74. (1970).
- Djerbi, M. Contribution a l'étude de la sporulation du *Septoria tritici* Desm. Arch. Inst. Pasteur. Tunis 49 (1/2): 61-68.
- Eyal, Z.; Z. Amiri and I. Wahl. Physiological specialization of *Septoria tritici*. Phytopathology 63: 1087-1089. (1973).
- Eyal, Z.; A. L. Scharen; J. M. Prescott y M. Van Ginkel. Enfermedades del trigo causados por *Septoria*: conceptos y métodos relacionados con el manejo de estas enfermedades. CIMMIT, Méjico, D. F., 52 pp, (1987)
- Hilu, H. M. and W. M. Bever. Inoculation, oversummering and suscept-pathogen relationship of *Septoria tritici* on *Triticum* species. Phytopathology 47: 474-480. (1957).

- Jairo Castaño, Z.** Prácticas de Laboratorio de Fitopatología. Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano. Departamento de Protección Vegetal. Publicación MIPH. EAP N° 95. 45 pp. (1986).
- Jones, G. D. and N. Lee.** Production of secondary conidia by *Septoria tritici* in culture. Trans. Br. Mycol. Soc. 62 (1): 212-213. (1974).
- Lee, N. and G. D. Jones.** Rapid method for spore production in three *Septoria* species. Trans. Br. Mycol. Soc. 62 (1): 208-211. (1974).
- Rodríguez Amieva, P. J.; F. L. Mujica; J. H. Frecha y E. F. Antonelli.** Ensayo Territorial de Resistencia a Enfermedades de Trigo, Triticale, Avena, Cebada, Centeno y Lino en la Región Cerealera Argentina en 1980. INTA, Instituto Fitotécnico, Boletín Informativo N° 39: 19 págs. Castelar. (1980)
- ..... IBIDEM, Inst. Fitot. Bol. Inf. N° 40: 24 págs. Castelar. (1981).
- ..... IBIDEM, Inst. Fitot. Bol. Inf. N° 41: 24 págs. Castelar. (1982).
- ..... IBIDEM, Inst. Fitot. Bol. Inf. N° 42: 27 págs. Castelar. (1983).