

ESTUDIO SOBRE LA SEPTORIOSIS DEL TRIGO EN LA REPUBLICA ARGENTINA

Cristina Alicia Cordo (*)

SUMMARY

Septorios's studie about wheat in Argentine. The techniques used for obtaining sporulated cultures of Septoria tritici on artificial media and under controlled conditions are described. It's recomended the use of agar malta to begin the single spore isolation. This media stimulates the formation of mucous colony and makes easier the replication on sporulation media. Many sporulationes are obtained on czapeck dox V8, a synthetical media whit vegetable juice.

A practical method of inoculation is proposed to determinate the behaviour of a high number of lines or varieties under controlled conditions. It's effective when it's used in greenhouse or in laboratory.

It was obtained a good infection applying a spray of spore suspension in distilled water.

The concentration of this solution is about $6 - 10 \times 10^6$ esp/ml.

The incubation in wet chamber of polyetilen lasts 96 h.s. It was determinated, through sucesives essays, the bert en vironmental conditions, under which the pathogen and varieties host lives: 21°C; 65-85% relative humidity; the light intensity more over 3000 lux for 12 - 16 h/d.

The last results will be taken after 30 days of inoculation.

Investigación realizada en el Instituto de Botánica "Spegazzini" de la Fac. de Ciencias Naturales y Museo y la Cátedra de Cerealicultura de la Fac. de Agronomía (UNLP) y auspiciada por la Comisión de Investigaciones Científica de la provincia de Buenos Aires.

(*) Becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires.

INTRODUCCION

La septoriosis constituye uno de los problemas de gran importancia en el cultivo del trigo. Este término designa dos enfermedades de sintomatología parecida: mancha de la hoja, producida por Septoria tritici Rob. ex Desm., y la mancha de las glumas y nudos del trigo cuyo patógeno es Stagonospora nodorum Castell. ex Germ. (*). La primera de ellas, es la más frecuente y difundida en nuestro país. Sus ataques, importantes desde varios años atrás, recrudecieron a partir de 1972, con altos niveles de susceptibilidad, en especial, sobre los cultivares y líneas de crianza con germoplasma mejicano (E. T. R. E. -INTA Castelar: 27, 28, 29, 30, 31). Habiéndose difundido en una amplia zona de la región triguera, las variedades con germoplasma de ese origen, predominando en algunas subregiones, es de esperar que la enfermedad adquirirá aún mayor importancia. De ahí la necesidad de estudiarla y buscar métodos para mejorar los procesos de selección por resistencia al parásito.

Con este trabajo se pretende esclarecer la técnica de cultivo de Septoria tritici, para obtener una abundante esporulación en medios artificiales.

Se propone también un método práctico de inoculación, para la determinación del comportamiento de líneas o cultivares de trigo, bajo condiciones controladas, mediante infecciones artificiales en estado temprano de crecimiento (tercera hoja).

(*) Septoria nodorum (Berk.) Berk., ha sido considerada como Stagonospora nodorum (Berk.) Castell. et Germ., en Ann. Fac. Sci. Agr. Univ. Torino, 10; 71-75. 1975-1976

REVISION BIBLIOGRAFICA

Los caracteres culturales de Septoria tritici han sido estudiados por muchos investigadores (10, 11, 13, 16, 20, 39). En general, cuando una espóra germina sobre un sustrato artificial, forma una colonia levuliforme, de aspecto mucoso y color rosa pálido, constituida por conidios secundarios. Estos pueden transformarse en hifas verde oliváceas o producir un micelio compacto que forma un estroma.

También la esporulación fue tratada con profundidad. Weber (39), von Vechman (37) y Luthra (20) la demostraron sobre APG; Hilu y Bever (16) comprobaron que las esporas se forman en abundancia sobre *czapeck dox V¹⁸*, tanto en oscuridad como bajo luz fluorescente. Gareth Jones y Lee (15) lograron una esporulación excelente sobre este medio, pero incubando bajo radiación de ultravioleta cercano. Leach (18), Arsenijevic (2) obtuvieron buena respuesta en agar malta, pero bajo la misma radiación.

El control genético de la enfermedad, sería el método más efectivo y económico para evitar su difusión y perjuicio. En ese caso, es necesario incorporar, mediante planes de cruzamiento, genes de resistencia al material fitotécnico en proceso de selección. Con el objeto de hacerlo más viable y efectivo, se ha desarrollado un método de inoculación artificial, que permite probar dicha resistencia en un estado vegetativo temprano del hospedante. Puede practicarse tanto en invernáculo como en laboratorio, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. El método que se propone se basó en investigaciones realizadas por autores de otros países (4, 6, 8, 9, 12, 16, 22, 24, 32, 33, 37, 39).

MATERIAL Y METODOS

Cultivo y esporulación del patógeno

Se usaron los aislamientos monospóricos de S. tritici, obte

nidos de hojas infectadas, procedentes de distintas subregiones ecológicas trigueras. El material fue facilitado por las Estaciones Experimentales del INTA de Balcarce, y las Charcas Experimentales de Miramar y Tres Arroyos (MAA) todas ubicadas en la Subregión ecológica IV. También procedieron de Coronel Dorrego (Subregión ecológica V sud); y de la Estación Experimental Julio Hirschhom (FALP) en Los Hornos (Subregión ecológica II). Los picnidios fueron inmersos en una gota de agua destilada estéril y las esporas exudadas se sembraron en placas de petri con agar agua. Cada espора germinada se aisló sobre medio agar malta. Produjo una masa de conidios secundarios, que fueron repicados a los medios esporulantes.

Los cultivos se mantuvieron mediante aislamientos monopóricos. Los mismos no debieron ser repicados más de dos veces sucesivas.

Se probaron sustratos artificiales que estimularan una esporulación apropiada para preparar una solución inoculante. Se estudió comparativamente la producción de esporas de tres aislamientos de S. tritici (38388 C. D., 141B, G 532Y), en cuatro medios artificiales: agar malta (AM), agar-papa-glu cosado (APG), czapeck dox V'8 (CZDV'8) y agar harina de a vena (AHA). Todos se entubaron en pico de flauta.

El medio agar malta se preparó con extracto de malta natural (30 grs) peptonas micológicas (5 grs.), agar (20 grs.) y agua destilada 1000 ml. El medio APG, deshidratado OXOID, se preparó según indicaciones del envase. Para el CZDV'8 y el AHA, se extrajeron instrucciones de Plant Pathologist's Pocketbook (pag. 236-239) (24). El jugo vegetal adicionado al CZDV'8 se preparó según indicaciones dadas por Diener (11).

En cada estría se sembró volúmenes constantes de masa conidial, de 12 días. Fue esparcida en zig-zag con un anillo en anillo de 6 mm de diámetro, siguiendo recomendaciones de Gareth Jones y Lee (15).

Los tres aislamientos estuvieron sujetos a tres tratamientos lumínicos: 1) luz continua (L. C.) por un tubo fluorescente de 15 watt, que proveyó una iluminancia de 2150 lux (equivalente a una int. lumínica de 7184 erg/cm². secc), a 12 cm. de los cultivos; 2) luz-oscuridad (L/0) correspondiente a las variaciones diurnas; 3) oscuridad continua (O. C) cubriendo los cultivos con papel de fotografía negro.

La temperatura media registrada en el transcurso de la experiencia fue de 17°C con un incremento de 4°C dentro de la cámara proveedora de L. C. De este estudio comparativo se seleccionó el aislamiento que se empleó en posteriores ensayos de inoculación.

Se usaron 4 repeticiones para cada medio, probando en cada una, los tres aislamientos bajo los tres regímenes lumínicos. Se consideraron tres períodos de observación (14, 24 y 50 días). Para cada uno se extrajo de cada block, un solo tubo de cada medio y de cada aislamiento. Se practicaron 6 recuentos de esporas de cada tubo, hallandola concentración promedio volcadas en el cuadro 1.

Método de inoculación.

Buscando la posibilidad de determinar el comportamiento de un número elevado de líneas o cultivares de trigo, se desarrolló un método que puede conducirse bajo condiciones controladas, mediante infestaciones artificiales sobre plántulas en la primera etapa de crecimiento (tercera hoja). Esto facilita un descarte temprano de las líneas susceptibles al parásito, permitiendo la selección en las primeras generaciones segregantes del material en proceso de mejoramiento.

La patogenicidad del aislamiento seleccionado (38388 C. D.) se determinó en invernáculo sobre variedades resistentes y susceptibles en estado de tercera hoja, se escogieron sobre la base del análisis de los promedios de ataque de los últimos 10 años (E. T. R. E.) que revelaban un comportamiento

Cuadro 1 - Concentración de esporas producidas por tres aislamientos de *Septoria tritici* (*)

Días después de la siembra	Resumen de las tablas del promedio de recuentos											
	Aislamiento 38388 C.D.				Aislamiento 141 B				Aislamiento G 532 Y			
	AM	AHA	APG	CZDV'8	AM	AHA	APG	CZDV'8	AM	AHA	APG	CZDV'8
14 días	0	3,57	0	1,72	0	0	0	0	0	2,12	0	0
24 días	0,65	1,85	0	1,21	0	1,02	0	0	0	1,95	0,67	1,55
50 días	0	3,25	0	8,51	0	0	0	2,78	0	0	0	2,06
14 días	0	6,89	0	0,55	0	0,95	1,48	1,94	0	2,15	0	0
24 días	0	3,30	1,19	0	0	0	1,67	0	1,10	1,71	0,45	1,18
50 días	0	2,04	0	10,57	0	0	0	0	0	0	0	2,21
14 días	0	3,67	0	0,92	0	0	0	0	0	2,02	0	0,76
24 días	0	5,90	0,35	0	0	1,39	1,32	0	0	1,07	0	1,77
50 días	0	1,20	0,37	8,63	0	0	0	3,51	0	0,91	0	3,63

Obscur.continua Luz.continua Luz.Obscur.

(*) Concentración de esporas obtenida por recuento en cámara de Fuchs Rosenthal, calculada en millones de esporas por mililitro (10⁶ esp./ml.).

to uniforme. Las variedades se agruparon en : 1) resistentes Purplstraw, Candeal Durumbuck; 2) medianamente resistentes: Buck Atlántico, Buck Manantial, Klein Atlas, Klein Toledo, Pergamino Gaboto MAG; 3) susceptibles: Fontezuela INTA, Marcos Juárez INTA y Dekalb Tala. También se inocularon alguna de estas variedades en estado de hoja bandera, para comprobar la persistencia de comportamiento.

El siguiente método se condujo en invernáculo y en laboratorio, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. En el último caso, los cultivares hospedantes continuaron creciendo desde el momento de la inoculación en una cámara de crecimiento. Para los ensayos conducidos en invernáculo, se trabajó con una temperatura media de 27°C y una humedad relativa media de 53%. Los realizados en la laboratorio sirvieron, hasta el momento, para determinar la influencia de algunas características ambientales (intensidad lumínica, temperatura, fotoperíodo) y otros factores tales como, incorporación de adhesivo en la solución inoculante, estado temprano de crecimiento.

Mediante un atomizador, se aplicó una solución de esporas suspendida en agua destilada. La concentración de la misma puede oscilar entre 6 a 10 millones de esporas por ml. Previo a la inoculación, los órganos a tratarse frotaron suavemente con la yema de los dedos humedecidos. De esta forma se eliminó la cera cuticular minimizando el escurecimiento de la gota de inóculo.

Las plántulas, una vez inoculadas permanecieron 96 hs. en cámara húmeda con cobertura de polietileno. Semanalmente y por espacio de un mes, se las revisó para determinar el porcentaje de cobertura picnidial sobre la lámina.

El diseño experimental fue de bloques al azar con 3 repeticiones, se inocularon 30 plantas de cada variedad (10 por block) dejando a 5 más como testigo. Este esquema se eempleó para ensayos conducidos en invernáculo y laboratorio.

RESULTADOS

Producción de esporas en cultivo .

De los tres aislamientos probados, en el 38388C. D., originado de Coronel Dorrego, se determinan los valores máximos de esporulación bajo todas las condiciones probadas.

Dos medios favorecen la producción continua de esporas. El agar harina de avena permite la esporulación de S. tritici a los 14 días de la siembra del inóculo y bajo los tres regímenes lumínicos; sin embargo bajo luz continua la concentración de esporas obtenida resulta la mayor ($6,89 \times 10^6$ esp/ml.). Esto se demuestra por el estudio de las medias, para los cuatro medios artificiales, mediante el test de Tukey.

Cuadro 2

Cuadro de contraste entre medias para 4 medios de cultivo (cepa 38388C. D.)

	AM=O	AHA= 4,71	APG= O	CZDV'8 = 1,06
0	O	4,71 ⁺⁺	O	1,06
4,71	-	-	4,71	3,65 ⁺⁺
0	-	-	-	1,06

d. m. s. 5% = 2,20

d. m. s. 1% = 2,74

Sobre medio CZDV'8 y bajo los tres regímenes, el patógeno produce una colonia estromática originaria de una concentración de esporas mayor que sobre el medio anterior, pero requiere para ello, 40 días más. Se obtuvieron las siguientes concentraciones: $10,57 \times 10^6$ esp/ml bajo L.C.; $8,51 \times 10^6$ esp/ml bajo L/O; $8,63 \times 10^6$ esp/ml bajo O.C. El estudio de las medias por el test de Tukey comprueba el resultado anterior.

Cuadro 3

Cuadro de contraste entre medias para 4 medios de cultivo
(cepa 38388 C.D.)

	AM = O	AHA = 2,16	APG = 0,12	CZDV'8 = 9,24
O	-	2,16	0,59	9,24 ⁺⁺
2,16	-	-	2,04	7,08 ⁺
0,12	-	-	-	9,12 ⁺⁺

d. m. s. 0,05 = 3,27

d. m. s. 0,01 = 4,07

El factor determinante de la esporulación está regido por el valor nutritivo de los medios. El hongo crece mejor sobre medios naturales como el agar harina de avena, o que contienen extractos de vegetales, como el CZDV'8, que sobre medios sintéticos (16). La esporulación bajo O.C., como ocurrió en varias oportunidades, confirma que la riqueza del sustrato es decisiva (19).

La incidencia de L.C. es necesaria en la primera etapa de crecimiento del patógeno en el medio, especialmente en AHA. Este factor acrecienta la esporulación.

El agar malta en contadas ocasiones estimuló la producción de esporas. Se recomienda para la obtención de aislamientos monospóricos. En él se forman colonias levuliformes de conidios secundarios, que por su consistencia mucosa facilita los repiques hacia medios esporulantes.

Experimento de inoculación en invernáculo

Salvo para el cultivar Dekalb Tala, los demás demostraron una correlación de comportamiento ante inoculaciones en estado de tercera hoja de bandera. Todas las variedades de T. vulgare probadas resultaron afectadas. En el cuadro 4 se transcriben los promedios obtenidos de tres bloques de repetición a partir de la observación del porcentaje de co-

bertura picnidial sobre tercera hoja.

Cuadro 4.

Desarrollo picnidial sobre plántulas inoculadas artificialmente con el aislamiento 38388 C.D.

Variedades	3 ^o hoja	4 ^o hoja
Purplestraw	11,38 %	3,33 %
Candéal Durumbuck	0 "	0 "
Buck Atlántico	6 "	0,5 "
Buck Manantial	1,66 "	6,85 "
Klein Atlas	1,66 "	1,83 "
Klein Toledo	0,5 "	1,83 "
Pergamino Gab. MAG	2,23 "	0,83 "
Fontezuela INTA	9,3 "	0 "
Marcos Juárez INTA	20,03 "	10,13 "
Dekalb Tala	3,16 "	1,33 "

Se aplicó análisis de variancia para detectar estadísticamente, diferencias de comportamiento de las variedades en estudio.

La influencia de los factores ambientales quedó reflejada por la significancia del efecto de bloques. Los tratamientos respondieron de forma diferente, demostrado por el valor de F altamente significativo, establecido en el siguiente cuadro.

Cuadro 5

Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio

FV	GL	SC	CM	F
Tratamientos	9	3698,93	410,99	25,24 ⁺⁺
Bloques	2	183,29	91,64	5,62 ⁺
Error	18	293,21	16,28	
Total	29	4175,43		

d. m. s. 5% = 11,76

d. m. s. 1% = 14,38

Mediante el test de Tukey, se estudiaron los valores medios, resumido en el siguiente cuadro.

Cuadro 6

Cuadro de contraste entre valores medios del porcentaje de cobertura picnial

	\bar{X}_1 22,3	\bar{X}_2 0,0	\bar{X}_3 13,7	\bar{X}_4 16,3	\bar{X}_5 10,7	\bar{X}_6 8,7	\bar{X}_7 9,9	\bar{X}_8 17,3	\bar{X}_9 33,3	\bar{X}_{10} 9,9
\bar{X}_1 22,3	--	22,3 ⁺⁺	8,6	5,97	11,54	13,6 ⁺	12,37 ⁺	4,94	11,03	12,34 ⁺
\bar{X}_2 0,0		--	13,7 ⁺	16,3 ⁺⁺	10,7	8,7	9,93	17,36 ⁺⁺	33,3 ⁺⁺	9,96
\bar{X}_3 13,7			--	2,63	2,94	5,0	3,77	3,66	19,6 ⁺⁺	3,74
\bar{X}_4 16,3				--	5,57	7,63	6,40	1,03	17,0 ⁺⁺	6,37
\bar{X}_5 10,7					--	2,06	0,83	6,60	22,5 ⁺⁺	0,80
\bar{X}_6 8,7						--	1,23	8,66	24,6 ⁺⁺	1,23
\bar{X}_7 9,9							--	7,43	23,4 ⁺⁺	0,03
\bar{X}_8 17,3								--	15,9 ⁺⁺	7,40
\bar{X}_9 33,3									--	23,37 ⁺⁺
\bar{X}_{10} 9,9										--

El contraste entre medias (test de Tukey) permite apreciar que Candeal Durumbuck (\bar{x}_2) con 0,0 de ataque, resultó la más resistente y dio diferencias muy significativas en su comparación con Marcos Juárez Inta ($\bar{X}_9=33,3$), Purplestraw ($\bar{X}_1=22,3$), Fontezuela INTA ($\bar{X}_8=17,3$), Buck Manantial ($\bar{X}_4=16,3$), y sólo significativas con Buck Atlántico ($\bar{X}_3=13,7$).

Considerando los trigos pan, se destaca el mejor comportamiento de Klein Toledo ($\bar{X}_6=8,7$), que da diferencias al 0,01 con Marcos Juárez INTA y al 0,05 con Purplestraw. Igual comportamiento da Pergamino Gaboto MAG ($\bar{X}_7=9,93$) y De-kalb Tala ($\bar{X}_{10}=9,96$).

La más susceptible Marcos Juárez INTA, es superada con

alta significancia por todas las variedades excepto Purples-traw (\bar{X}_1); está indicando que todas presentan una susceptibilidad menor que la primera.

Las demás comparaciones no dieron diferencias con expresión estadística.

Ensayo de inoculación en laboratorio.

El método de inoculación en invernáculo resultó igualmente efectivo cuando se aplicó en el laboratorio. Fue necesario determinar las condiciones ambientales que condujeron a mayor efectividad. El resultado de las variaciones probadas se midió con sólo dos variedades: Marcos Juárez INTA (susceptible) y Buck Napostá (resistente). Se escogieron sobre la base de un comportamiento constante a través de sucesivos ensayos de inoculación, efectuados con anterioridad.

Los factores analizados hasta el momento han sido: intensidad lumínica; tpo. de cobertura de cámara húmeda; estado de crecimiento temprano, más adecuado para la respuesta de la inoculación; empleo de un adhesivo incorporado a la solución inoculante. Están siendo probados: distintas concentraciones de esporas, otros productos adhesivos, y efecto combinado de la temperatura y fotoperíodo.

Con relación a la intensidad de luz, medida en unidades de iluminancia, se recomienda ajustar la cámara a valores mayores de 3000 lux. En los ensayos conducidos con 4800 lux, se obtuvo un funcionamiento normal del hospedante y una rápida colonización de los tejidos por parte del patógeno. Con menor iluminancia ($I_1=1200-2000$ lux) las dos variedades probadas no mostraron diferencias en el comportamiento; en cambio, cuando crecieron bajo 4800 lux (I_2), las diferencias en comportamiento resultaron altamente significativas.

Cuadro 7

Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio

F. V.	G. L.	S. C.
V dI ₁	1	2485,77 ^{n. s.}
V dI ₂	1	2069,4 ⁺⁺

La apreciación del comportamiento de ambas variedades se hace posible cuando el período de incubación y post-incubación de la enfermedad se realiza a una intensidad lumínica relativamente elevada que favorezca el desarrollo normal de la planta y el establecimiento del patógeno.

Las dos intensidades lumínicas probadas (2000 y 4800 lux) no afectaron el comportamiento del cultivar resistente Buck Napostá (V₁), pero sí en cambio, el del susceptible Marcos Juárez INTA (V₂).

Cuadro 8

Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio

F. V.	G. L.	S. C.
I d V ₁	1	4049,73 ^{n. s.}
I d V ₂	1	24849,58 ⁺⁺

Por su naturaleza, la variedad resistente V₁ experimenta bajos porcentajes de infección, a pesar de crecer bajo una intensidad lumínica relativamente elevada. En cambio, sobre la variedad susceptible (V₂) es donde se observa con más fidelidad, la influencia de una intensidad apropiada; los porcentajes de cobertura obtenida a 4800 lux son notablemente mayores que los alcanzados a 2000 lux. Esto resulta de fundamental importancia para diferenciar líneas o variedades susceptibles al parásito.

En cuanto al efecto del tipo de cámara húmeda usada en la incubación una vez más se confirma que la construida con cobertura de polietileno es mejor.

Cuadro 9

Análisis de variancia para las fuentes de variación en estudio

F. V.	G. L.	S. C.
V d Cámpoliet.	1	15891,0 ⁺⁺
V d Camcelof.	1	4576,86 ^{n. s.}

La cobertura de polietileno aseguró una humedad relativa elevada, sin rehumectación durante las 96 hs. de incubación. En las condiciones en que se condujeron los ensayos, permitió apreciar marcadas diferencias en el comportamiento de las variedades intervinientes.

Las pruebas referidas al estado de crecimiento más apropiado para la determinación del comportamiento, permite concluir que el de tercera hoja es el más recomendable, por varias razones:

1) La segunda hoja tiene tendencia a secarse prematuamente, antes de tomar la observación final; por lo tanto, podría interrumpirse el avance del patógeno en pleno período de infección.

2) El ancho y longitud de la lámina de la tercera hoja es mayor que el de la segunda, según lo observado, por ello, la recepción del inóculo es más segura en la primera de ellas, garantizando una superficie de inoculación mayor.

3) La infección se practica en una época temprana, para la que no se necesita mantener las plantas durante mucho tiempo, y es más fácil que no presenten ataques de otras enfermedades.

En otro ensayo se probó un producto adhesivo que incorporado a la solución inoculante, podría evitar la limpieza con los dedos, que hace más trabajoso el método. Hasta el momento sólo se empleó una solución de gelatina (0,25g.) y oleato de sodio (0,05g.) por cada 100 ml. de solución inoculante. En este caso no resultó efectiva porque si bien no afectó la germinación de las esporas, pudo haber ocurrido una alteración en la apertura estomática que dificultaría la penetración del tubo germinativo del parásito.

Las variedades probadas se comportaron correctamente cuando las inoculó sin adhesivo (s/a). No ocurrió así en las inoculaciones practicadas con dicho producto (c/a).

Cuadro 10

Cuadro comparativo de los valores medios de subtratamientos (s/a) sin adhesivo, (c/a) con adhesivo y (T) testigo

	$\bar{X}_{c/a}$ 9,55	$\bar{X}_{s/a}$ 15,93	\bar{X}_T 0
$\bar{X}_{c/a}$ 9,55	---	6,38 ⁺⁺	9,55 ⁺⁺
$\bar{X}_{s/a}$ 15,93	---	---	15,93 ⁺⁺
\bar{X}_T 0	---	---	---

Se aprecia un efecto altamente significativo del desarrollo del patógeno sobre los individuos tratados sin adhesivo, al compararlo con los resultados de los tratamientos con dicho producto. Se observó el mismo efecto del testigo, con respecto a los otros dos subtratamientos.

Hasta el momento, el ajuste de temperatura más apropiado en todos los ensayos practicados ha sido de 21°C; la humedad relativa osciló entre 65-85%. Con referencia al fotoperíodo, de acuerdo con los resultados obtenidos en diversos ensayos, se recomienda el de 12 hs y 16 hs. de luz.

DISCUSION

Uno de los problemas importantes en este trabajo ha sido encontrar medios artificiales de cultivo que estimularan una producción abundante de esporas. De esta forma se dispondría de una fuente constante de inóculo, para obtener resultados satisfactorios en infestaciones artificiales.

El agar malta resultó excelente para producir conidios secundarios. Constituyeron colonias mucosas, de tipo levuliforme. Dichos conidios facilitaron los repiques sobre medios esporulantes.

El factor determinante de la esporulación ha sido el valor nutritivo de los medios probados. Dos de ellos ofrecieron los mejores resultados, el czapeck dox V'8 y el agar harina de avena. El primero estimula una abundante esporulación después de un período prolongado de tiempo, bajo cualquier régimen lumínico incidente. Por el contrario, sobre Agar harina de avena, esporula en tan sólo 14 días, aunque produciendo una concentración de esporas menor. Estos resultados están de acuerdo con lo expuesto por Hilu y Bever (16). Afirman que S. tritici crece mejor sobre medios que contienen extractos vegetales, como el CZDV'8. El patógeno, aún bajo oscuridad continua produce una colonia estromática sobre la que aparece el exudado de picnidiosporas.

Atendiendo a la esporulación bajo oscuridad continua, se estaría de acuerdo con lo expuesto por Leach(19). Sostuvo, que algunos hongos cuando crecen sobre medios suficientemente nutritivos, pueden sintetizar todos los precursores requeridos para la esporulación; si lo hacen sobre medios incompletos y en oscuridad, no esporulan.

La incidencia continua de luz resultó apropiada en la primera etapa de crecimiento del patógeno sobre el medio agar harina de avena. La esporulación bajo estas condiciones se observó a los 14 días. De acuerdo a lo expuesto por

en laboratorio empleando una cámara de crecimiento. En ambos casos, deben ajustarse las condiciones ambientales afectantes, para obtener los mejores resultados. La temperatura más apropiada para el logro de una buena infección es de 21°C coincidiendo con Renfro (25). La humedad relativa podrá variar entre 65-85%, a pesar que el autor anterior recomienda oscilaciones de 75-100%. Con respecto al fotoperíodo, muy buenos resultados se obtuvieron con ajuste de 12 hs. y 16 hs. de luz. En cuanto a la intensidad lumínica incidente, deberá superar los 3000 lux. Como lo expuso Benedict, la intensidad de luz incidente en las primeras horas después de la inoculación es responsable de la aceleración de los cambios estructurales de la espora. La formación del tubo germinativo y de las hifas ocurrió más rápido bajo intensidades menores de 5000 lux. La penetración de la hifa al tejido hospedante se aceleró a 8000 lux, mientras que el desarrollo hifal y de picnidios, dentro de la cavidad subestomática, se incrementó bajo intensidades fluctuantes entre 2000 - 4000 lux.

Agradecimientos

Este trabajo fue auspiciado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Bs. As. y conducido en el Instituto de Botánica "Spegazzini" y Cátedra de cerealicultura de la Fac. Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata.

Mi reconocimiento a los profesores que lo dirigieron Ingenieros Agrónomos J. C. Lindquist y H. O. Arriaga. Al Ingeniero Agrónomo Rafael Boggio, por la ejecución del Análisis Estadístico de los distintos ensayos.

A los directores del citado Instituto y Comisión de Investigaciones Científicas por facilitar los medios necesarios para la concreción de este trabajo.

Calpouz (5), la incidencia de luz en los primeros estadios es necesaria para la formación de picnidios, y en estadios posteriores, completa la maduración de las fructificaciones e induce la formación de esporas. También afirmó que los picnidios se producían bajo un rango amplio de intensidades (80-8000 erg./cm² x secc.). La fuente lumínica empleada en este ensayo proveía una iluminancia de 2150 lux, equivalente a 7184 erg/cm² x secc. (17).

La siembra de conidios secundarios del patógeno sobre los medios esporulantes, resultó más efectiva por el método de siembra en estría (15).

En cuanto al método de inoculación empleado, consiste en aplicar mediante un atomizador, una solución de esporas diluida en agua destilada. La concentración de esporas aplicada puede oscilar entre 6 - 10 millones esp/ml., recomendando pulverizar 1 a 2 ml/planta. Para obtener la concentración deseada se debe inundar cada estría esporulada de CZDV'8 con 3 ml. de agua destilada.

Los órganos a tratar deben ser frotados suavemente con la yema de los dedos humedecidos para asegurar la permanencia de la gota del inóculo sobre ellos. Sería de utilidad suprimir esta etapa del método, incorporando a la solución inoculante, unas gotas de adhesivo o humectante.

La incubación en cámara húmeda de polietileno deberá ser de 96 hs. Al cabo de las mismas, las plantas deben retornar a las condiciones ambientales originales para continuar su desarrollo.

El período de incubación total, duró para todas las variedades, entre 12 y 14 días. Al cabo de los mismos, los picnidios aparecieron en la superficie de la lámina. La expresión de total madurez de los mismos, se alcanzó entre la tercera y cuarta semana después de la inoculación.

Este método puede practicarse tanto en invernáculo, como

RESUMEN

Se describe el procedimiento seguido para obtener cultivos esporulados de Septoria tritici, en medios artificiales y bajo condiciones controladas.

Se propone un método práctico de inoculación para la determinación del comportamiento de un alto número de líneas o cultivares bajo condiciones controladas, mediante infecciones artificiales sobre plántulas de trigo. Esto posibilita su empleo en las primeras generaciones segregantes del material, en proceso de mejoramiento, con un descarte temprano, de las líneas susceptibles al parásito.

Se recomienda el uso del medio agar-malta, para la obtención de aislamientos monospóricos. Este sustrato estimula la formación de colonias de consistencia mucosa, que facilita la realización de un gran número de repiques sobre medios esporulantes. También el agar-harina de avena, permite la esporulación a los 14 días de la siembra del inóculo y bajo los tres regímenes lumínicos que se probaron (L.C; O.C; L/O). Sin embargo, bajo luz continua, la concentración de esporas obtenidas resulta la mayor, Sobre medio czapeck dox V8 y bajo los tres regímenes, el patógeno produce una mayor concentración de esporas que sobre el medio anterior, pero requiere para ello aproximadamente 40 días más. La incidencia de la luz continua resulta necesaria en la primera etapa de crecimiento del patógeno en el medio, para acrecentar la producción de esporas.

En cuanto al método de inoculación, puede ser practicado tanto en invernáculo como en laboratorio. Consiste en aplicar una solución de esporas cuya concentración puede oscilar entre 6 y 10 millones por mililitro. El período de incubación se cumple durante 96 horas en cámara húmeda con cobertura de polietileno.

Los resultados finales del comportamiento de los cultivos en estudio pueden obtenerse a los 30 días de la inocula-

ción, registrando semanalmente, el porcentaje de cobertura picnidial, desde el comienzo del ensayo.

BIBLIOGRAFIA

1. Antonelli, E. F. et. al., 1970. Fuentes de germoplasma de resistencia a enfermedades y plagas. Rev. Inv. Agron., Ser. 2, 7 (3): 133-151. 2 diagrs. 2 tabs. English Summary. INTA, Castelar.
2. Arsenijevic, M., 1965. Septoria tritici Rob&Desm., a parasite of wheat in the S. R. Serbia. Zastita Bilja, 16(83): 5-70 (Serbian with an English Summary).
3. Benedict, W. C., 1971. Differential effect of light intensity on the infections of wheat by S. tritici. Physiol. Plant. Path. I (1): 55-66
4. Caldwell & Narvaez, I., 1960. Losses to winter wheat from infection by S. tritici (Abs.) Phytopathology, 50: pág. 630.
5. Calpouz, L. & Lapis, D. B., 1970, Effect of light on picnidium formation, sporulation and tropism by Septoria nodorum. Phytopathology, 60:791-794
6. Calpouz, L. & Shearer, B. L., 1973. Relative prevalence of S. avenae f. sp. triticea, S. nodorum and S. tritici on spring wheat in Minnesota. Plant Diseases Reporter, 57 (2): 99-107
7. Cooke, B. M. & Gareth Jones, D. 1970. The effect of near ultraviolet irradiation and agar medium on the sporulation of S. nodorum and S. tritici, Trans. Brit. Mycol. Soc., 54 (2): 221-226

8. ----- . 1970, The epidemiology of S. tritici and S. nodorum. II-Comparative studies of head infections by S. tritici and S. nodorum on spring wheat. Trans. Brit. Mycol. Soc. , 54(3): 395-404
9. ----- . 1971. The epidemiology of S. tritici and S. nodorum. III-The reaction of spring and winter wheat varieties to infection by S. tritici and S. nodorum Trans. Brit. Myco. Soc. 56 (1);121-135
10. Dickson, J. G. , 1974. Diseases of the field crops. Mc Graw-Hill. B. K. C. O. , 427 págs. New York and London.
11. Diener, U. L. , 1952. A method for inducing abundant sporulation of Stemphylium solani in pure culture (Abs). Phytopathology, 42: 7
12. Eyal, Z. , Amiri & Wahl, I. , 1973. Physiologic specialization of S. tritici Phytopathology, 63(9); 1087 - 1091
13. Fernandez Valiela, M. V. , 1952. Introducción a la Fitopatología. Editor y Distribuidor Talleres Gráficos "Gadola", 872
14. Gäumann, E. , 1946, Pflanzliche Infektionslehre Verlag Birkhauser, Basel, 611 págs.
15. Gareth Jones, D. & Lee, N. P. , 1974. On secondary conidia of Septoria. Trans. Brit. Mycol. Soc. , 62(1); 208-213
16. Hilu, H. M. & Bever, W. M. , 1957, Inoculation, over-summering and susceptible pathogen relationship of Septoria tritici species. Phytopathology, 47:474-480

17. Klein, R.M. 1973. Determination of the irradiation energy at different, Wavelength in the with lighth. Horti. Science, 8 (3): 325-328
18. Leach, C.M., 1962, Sporulation on diverse species of fungi under nearultraviolet radiation. Can.J.Bot 40:1577-1602
19. Leach C.M. & Trione, E. J. 1969. Light induced sporulation and sporogenic substance in fungi. Phytopathology, 59 (7): 1078-1082
20. Luthra, C. J., Sattar, A. & Ghani, M. A. 1937. A comparative study of species of Septoria occurring on wheat. Indian J. Agric. Sci. 7: 271-289.
21. Luthra, C. J., Sattar, A & Ghani, M. A. 1938. Perpetuation and control of Septoria diseases of wheat in the Punjab. Agric. Live. Stk. India 8(1):17-25
22. Mackie, W. W., 1926. Resistance to S. tritici in wheat. Phytopathology, 19 (12): 1139-1140
23. Miles A.M., 1955. The meaning of pathogenicity: 1-16 págs. in J. Whowie and A. J. O. 'Hea, Mechanism of microbial pathogenicity. Simposium 5 Soc. Gen. Microb. Cambridge University Press, 333
24. Plant Pathologist's-Pocketobook. 1968, Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England. Printed in Great Britain by Lamport Gilbert Printers LTD, 267
25. Renfro, B. L. & Young, H. C., 1956, Techniques for studying varietal response to Septoria leaf blotch of wheat. (Abs.) Phytopathology, 46: 23-24
26. Rillo, A. O. & Caldwell, R. M., 1966. Inheritance of resistance to S. tritici in Triticum aestivum sub sp. vulgare, Bulgaria 88. Phytopathology, 56: 897

27. Rodríguez Amieva, P. J. et. al. 1968. Ensayo territorial de enfermedades en trigo, cebada, avena, centeno y lino en la región cerealera argentina en 1968 IN T.A. Instituto Fitotécnico, Boletín Informativo N° 28: 19. Castelar.
28. -----, 1970. Ibidem, Ins. Fitot. Bol. Inf. N°30: 23
29. -----, 1971. Ibidem, Ins. Fitot. Bol. Inf. N°31: 27
30. -----, 1972. Ibidem, Inst. Fitot. Bol. Inf. N°32: 22
31. -----, 1974. Ibidem, Inst. Fitot. Bol. Inf. N°34: 24
32. Sarasola, M. A. R. de y Sarasola, A., 1969, Micosis. Septorios del trigo. Curso de Fitopatología para graduados. Apuntes de clase N°56. INTA Castelar.
33. Scharen, A. L. & Krupinsky, J. M. 1973. The effect of age on virulence of S. nodorum spores on wheat. Phytopathology 65: 761-766
34. Shearer, B. L., Zadoks, J. C. 1972. The latent period of S. nodorum in wheat 1-The effect of T° and H° treatments under controlled conditions. Neth. Journ. of Plant Path 78(6) 231-245.
35. Spegazzini, C., 1902, Mycetes Argentinenses (Ser. II). Anal. Mus. Nac. Bs. As. T. 8 (Ser. 3ª, t. i): 83.
36. Sprague, R. 1950. Diseases of cereals and grasses in N. America. Ronald Press, N. York, 538
37. Von Vechman, B., 1961. The influence of environmental factors on growth, sporulation and pathogenicity of S. tritici Desm. and S. nodorum Berk., and the pathological response of inoculated wheat varieties. N. Sc. Thesis, University of Stellenbosch, South Africa.

38. Wakefield, 1940, Nomina Generica Conservanda. Contribution from the nomenclature committee of the British Mycological Society. III. Septoria Sacc. (1884) versus Septoria Fr. (1828). Trans. Brit. Mycol. Soc. 24: 291.
39. Weber, G. F., 1922. Septoria diseases of wheat. Phytopathology, 12: 537-585

III JORN. FITOSAN. ARGENT.

6-8-IX-1978 - S. de Tucumán

II V: 669-691 pp. 1979
Impreso en Fas. Agron. y Zoot.