

## SUSCEPTIBILIDAD DE DISTINTOS ORGANOS DE ACELGA Y REMOLACHA A VARIOS AISLAMIENTOS DE *PHOMA BETAE* FRANK

S. M. WOLCAN (1) y A. E. PERELLO (2)

Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía, UNLP CC 31, 1900 La Plata, Argentina.

Recibido: 30 de junio, 1989. Aceptado: 29 de noviembre, 1989

### RESUMEN

En los análisis de muestras de "semillas" (glomérulos) de acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*) y remolacha (*Beta vulgaris* var. *rapacea*) se comprobó la disminución del poder germinativo y necrosis en las radículas de las plántulas ocasionadas por un hongo identificado como *Phoma betae* Frank.

La intensidad de la afección alcanzó valores entre el 17 y el 54% en las muestras provenientes de la Provincia de Buenos Aires (clima húmedo) y entre el 0,5 y el 7,5% en las de la Pcia. de San Juan (clima seco). La infección no se redujo al tratar previamente las semillas con hipoclorito de sodio al 5%, lo que indicó la localización del patógeno en los tejidos profundos. Se inocularon hojas de acelga, raíces de remolacha y semillas de ambas spp. y, además, se infectó suelo estéril.

Sobre las hojas de acelga y las raíces de remolacha no se produjeron lesiones importantes. Por el contrario, las inoculaciones de las semillas redujeron sensiblemente el poder germinativo y la emergencia de las plántulas; ocurrió lo mismo con el suelo infectado. En este ensayo se observó diferente agresividad de los distintos aislamientos.

Esta es la primera cita para la Argentina de *Phoma betae* Frank.

Palabras claves: *Phoma betae*, acelga, remolacha.

### SUMMARY

## SUSCEPTIBILITY OF SALT-WORT (*Beta vulgaris* var. *cicla*) AND BEET (*B. vulgaris* var. *rapacea*) TO DIFFERENT ISOLATES OF *Phoma betae* FRANK.

Low germination capacity and radicle necrosis of seedlings were observed on seeds of salt-wort (*Beta vulgaris* var. *cicla*) and beet (*B. vulgaris* var. *rapacea*) glomerules ("seeds").

These symptoms were caused by a fungus identified as *Phoma betae* Frank.

Infection percentage in samples from wet areas (Province of Buenos Aires) was between 17-54% and in samples from dry areas (Province of San Juan) was between 0,5-7,5%. The infection percentage was not reduced after previous "seed" treatment with sodium hypochlorite 5%. This could mean that the pathogen localization was in deep tissues. Pathogenicity tests were done by inoculations of sterile soil, salt-wort leaves, beet roots and both species "seeds". On salt-wort leaves and beet roots the lesions were not important. On the other hand, seed inoculations reduced the germination capacity and seedlings emergence. The same happened in the case of inoculated soil. The isolates evidenced different pathogenicity capacity. The results confirm that the isolated fungus from beet and salt-wort glomerules is *Phoma betae*. This is the first report in Argentine.

Key-words: *Phoma betae*, salt-wort, beet.

### INTRODUCCION

En los análisis de sanidad de semillas que se llevan a cabo en la Cátedra, se detectó un patógeno responsable de reducir el poder germinativo, provocar síntomas necróticos en la radículas y el cuello y ocasionar la pérdida de las plántulas

de acelga (*B. vulgaris* var. *cicla*) y de remolacha (*B. vulgaris* var. *rapacea*) de distinta procedencia.

El agente etiológico se identificó como *Phoma betae* Frank (teleomorfo: *Pleospora betae* Bjoerling), el cual no ha sido registrado anteriormente en el país. Los antecedentes bibliográficos se refieren principalmente a la afección sobre

(1) Investigadora de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC)

(2) Becaria de la CIC

remolacha azucarera (Bugbee y El-Nashaar, 1983; Byford, 1978; Gambogi y Byford, 1976; Gaskill, 1950; Mc. Kay, 1952; Singh y Singh, 1981) pero se ha publicado muy poco sobre su incidencia en la remolacha de consumo hortícola (Heberg y Ramsey, 1948; Newton y Boshier, 1946). Diversos autores señalan las pérdidas importantes que ocasiona *P. betae* como patógeno de semillas (Byford, 1978; Leach, 1947; Leach y Mac Donald, 1976; Mc Kay, 1952; Singh y Singh, 1981; Wiesner, 1965). También produce daños considerables en raíces almacenadas (Bugbee, 1979; Bugbee y Cole, 1981; Bugbee y El-Nashaar, 1983; Gaskill, 1950; Payén, 1967). En cambio, en la remolacha hortícola, Heberg y Ramsey (1948) enfatizan la importancia de las lesiones en las raíces almacenadas y lo consideran un patógeno débil de las plántulas.

El presente trabajo se realizó con el objeto de probar la susceptibilidad de diferentes órganos de acelga y remolacha a varios aislamientos de *P. beate* Frank.

## MATERIALES Y METODOS

### Análisis de sanidad de las semillas.

Se analizaron semillas (glomérulos) de acelga y remolacha procedentes de las provincias de Buenos Aires (Balcarce, Gorina y San Pedro) y de San Juan cosechadas en la campaña 85/86.

Se empleó la técnica del papel de filtro según las Normas Internacionales para Tests de Semillas (ISTA) (Neegard, 1983).

Esta consiste en la siembra de las muestras (400 semillas) en cajas de Petri con 3 hojas de papel de filtro humedecido e incubadas en cámara climatizada a  $18 \pm 2^\circ \text{C}$ , con ciclos alternados de 12 h de luz/oscuridad (incluye radiación cercana a la ultravioleta). Las observaciones se efectuaron a los 8 días. Se analizaron el poder germinativo y el porcentaje de infección de los glomérulos y se registró el número de plántulas por muestra (por tratarse de glomérulos triseminados, cada uno puede originar más de una plántula).

## ETIOLOGIA

El hongo se aisló mediante el repique de esporas exudadas por los picnidios maduros formados sobre las radículas. Se cultivó sobre Agar Papa Glucosado (APG) y se mantuvo en las condiciones citadas anteriormente. Se efectuaron observaciones diarias.

### Desinfección externa de las semillas

Se desinfectaron 3 muestras de remolacha "Cruzamiento" (San Pedro) (200 glomérulos cada una), con hipoclorito de sodio comercial al 5% durante 15, 20 y 25 min respectivamente. Luego se lavaron con agua corriente durante 10 min. Como testigo se empleó otra muestra sin desinfectar. Se sembraron en cajas de Petri sobre papel de filtro y se mantuvieron en las condiciones descriptas. Las observaciones se efectuaron a los 10 días.

## INOCULACIONES

### a. Semillas

Las semillas de remolacha y acelga "Anepán" procedentes de San Juan, se desinfectaron previamente con hipoclorito de sodio al 5% durante 15 min. y se lavaron con agua corriente. Se emplearon los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de remolacha "Cruzamiento" (San Pedro), remolacha "Detroit" (San Pedro) y acelga (Gorina).

En cada caso se procedió a sumergir las semillas durante 10 min. en una suspensión de esporas en agua destilada estéril ( $10^6$  esporas .  $\text{ml}^{-1}$ ). Las condiciones de siembra e incubación fueron las indicadas arriba. Las observaciones se efectuaron a los 10 días.

### b. Hojas

Se inocularon plantitas de acelga de 10 cm de altura con una suspensión de  $7,5 \times 10^6$  esporas .  $\text{ml}^{-1}$ , aplicada con un pincel de cerdas

suaves. Se mantuvieron en una cámara húmeda durante 48 h a 17-24° C y luego permanecieron en un invernáculo a esa temperatura.

Se observaron durante 20 días.

#### c. Raíces de remolacha

Se siguieron dos técnicas. En cada caso se inocularon 10 raíces jóvenes y adultas de remolacha Detroit cuya superficie se desinfectó con alcohol al 70% y se lavó con agua corriente.

c.1. En las zonas apical y distal de las raíces se seccionaron con un bisturí trocitos de 0,5 cm de lado y profundidad aproximadamente. En las heridas se depositaron bloquesitos de agar con micelio y esporas del hongo y luego se restituyó la porción del tejido y se selló con vaselina sólida.

c.2. A las zonas apical y distal de las raíces de remolacha se les inyectó una suspensión en agua de  $5 \times 10^6$  esporas. ml<sup>-1</sup>.

Las raíces se mantuvieron en una cámara húmeda durante 48 h bajo condiciones de laboratorio. Se efectuaron observaciones periódicas durante 15 días.

#### Suelo

1. En un suelo tinalizado contenido en terrinas se sembraron 50 semillas de acelga

"Anepán" y 50 de remolacha (procedentes de San Juan), previamente inoculadas según se explicó antes.

2. El suelo se infectó con una suspensión de  $5 \times 10^6$  esporas . ml<sup>-1</sup> en el cual se sembraron 50 semillas de cada hospedante, desinfectadas según lo descrito con anterioridad. Como testigo se empleó suelo tinalizado y semillas desinfectadas. Las terrinas se mantuvieron en un invernáculo a 20-25° C y 85-95% de humedad. Las observaciones se efectuaron a los 6, 10 y 14 días después de la siembra.

En estos ensayos y en las inoculaciones de hojas y raíces, se empleó como inóculo el aislamiento procedente de la muestra de acelga de Gorina.

## RESULTADOS

### Análisis de semillas

Los valores de "porcentaje de plántulas" incluyeron gran cantidad de radículas infectadas de las cuales emergieron picnidios fértiles (Tabla 1). Esto ocasionó ennegrecimiento y necrosis de los ápices radiculares, que posteriormente se extendió hacia toda la radícula. También se observó menor producción de pelos absorbentes, retraso del desarrollo y muerte de las plántulas que fueron severamente afectadas. Esto determi-

**Tabla 1.** Análisis de "semillas" (glomérulos) de acelga y remolacha. (1) Poder germinativo de los glomérulos; (2) Infección causada por *Phoma betae* en los glomérulos; (3) Porcentaje total de plántulas de los utrículos triseminados).

Seeds (clusters) analysis of salt-wort and beet. (1) germination capacity of the clusters; (2) Infection caused by *Phoma betae* on the clusters; (3) Seedlings total percentage (originated from triseminate clusters).

Muestra	1 P.G (%)	2 Infección (%)	3 Plántulas (%)
Acelga Verde anual (San Pedro)	67,0	17,5	83
Acelga (Gorina)	75,0	34,5	86,0
Acelga Anepán (San Juan)	77,0	4,5	73,0
Acelga Verde (San Juan)	57,0	7,5	77,8
Acelga (Balcarce)	63,0	27,0	105,0
Remolacha (San Juan)	61,5	0,5	95,0
Remolacha Detroit (San Pedro)	75,0	17,0	99,0
Remolacha Cruzamiento (San pedro)	75,0	54,0	121,0

nó que los valores reales de emergencia de plántulas fueran sensiblemente inferiores a los indicados para "porcentaje de plántulas". En cuanto a los "porcentajes de infección de glomérulos", se observó menor incidencia del patógeno en las semillas cosechadas en la provincia de San Juan.

ros con cirros rosados. Desarrollaron picnidiosporas hialinas, elipsoidales, unicelulares, de esporio liso, cuyas dimensiones variaron entre 4,50 a 8,25 (6,05)  $\mu\text{m}$  x 3,0 a 6,0 (4,28)  $\mu\text{m}$ . El diámetro de los picnidios fue de 210 a 560 (328)  $\mu\text{m}$ . Estas características coinciden con las descriptas para *Phoma betae* Frank.

**Tabla 2.** Análisis de "semillas" de remolacha cruzamiento (San Pedro) desinfectadas externamente con hipoclorito de sodio al 5%. (1) Tiempo de desinfección; (2) Poder germinativo del glomérulo (semilla); (3) Infección causada por *Phoma betae* en los glomérulos; (4) Emergencia de plántulas a partir de glomérulos triseminados.

Beet "seeds" (cv. Cruzamiento, San Pedro) analysis externally desinfected by sodium hypochlorite (5%). (1) time; (2) germination capacity of the clusters seeds; (3) Infection caused by *Phoma betae* on the clusters; (4) seedlings from triseminate clusters.

1 Tiempo de desinfección (min)	2 P.G (%)	3 Infección (%)	4 Plántulas (%)
15	70	89,0	91
20	88	88,5	120
25	78	87,0	100
0	64	68,0	125

## ETIOLOGIA

El patógeno aislado, tanto de semillas de acelga como de remolacha, desarrolló sobre APG colonias circulares, de superficie rugosa y elevación difusa, color gris oscuro. A partir del quinto-sexto día, se observaron picnidios madu-

## Desinfección de semillas

De los resultados obtenidos se desprende que el tratamiento con hipoclorito de sodio no redujo el porcentaje de la infección (Tabla 2). Por el contrario, se observaron valores superiores al de la muestra testigo. No se apreciaron diferen-

**Tabla 3.** Inoculaciones de semillas de acelga y remolacha con aislamientos de *Phoma betae* de distinta procedencia. (1) (2) (3) expresados en %.

Beet and salt-wort seeds inoculations with *Phoma betae* isolated from different origins. (1) (2) (3) in percentage.

Procedencia del inóculo	Acelga (Anepán)			Remolacha (San Juan)		
	1 P.G.	2 Infección	3 Plántulas	1 P.G.	2 Infección	3 Plántulas
Remolacha "Cruzamiento", (San Pedro)	14	100	15	18	100	22
Acelga (Gorina)	9	100	16	11	100	16
Remolacha Detroit (San Pedro)	20	100	26	25	100	36
Testigo	60	5	59	45	0	75

cias en los porcentajes de germinación ni de emergencia de plántulas entre los distintos tratamientos.

## INOCULACIONES

### Semillas

Los resultados obtenidos mostraron que los valores de poder germinativo y porcentaje de plántulas de acelga y remolacha disminuyeron con respecto al testigo (Tabla 3). Esta disminución fue menos notoria cuando las muestras se inocularon con *Phoma betae* aislada de remolacha "Detroit" de San Pedro. Por el contrario, las muestras más afectadas fueron las inoculadas con el aislamiento procedente de la acelga de Gorina.

### Hojas de acelga

A los 10 días de la inoculación se observó la aparición de lesiones necróticas pequeñas, aisladas, circulares, color castaño claro que no evolucionaron.

### Raíces de remolacha

En los 2 ensayos se produjo un ablandamiento de las raíces en la zona inoculada y deshidratación general iniciada a partir de ese punto. No se distinguieron lesiones definidas. Estos síntomas fueron más notorios en raíces adultas.

Cuando se inyectó el inóculo se observó el desarrollo de un micelio blanco grisáceo sobre la superficie invadida por la suspensión. En esa zona también se observó ablandamiento.

### Suelo

En los ensayos 1 y 2 disminuyó progresivamente el número de plántulas emergidas. Las mismas mostraron síntomas de "damping-off".

La inoculación de las semillas provocó una mayor reducción en la emergencia de plántulas y síntomas más severos que cuando se infectó el suelo.

## DISCUSION

Los análisis de semillas provenientes de la provincia de San Juan (zona seca) acusaron porcentajes de infección más bajos, mientras por el contrario, en las muestras de la provincia de Buenos Aires (zona húmeda) se observó una infección significativa.

Sobre remolacha azucarera Wiesner (1965) menciona la correlación positiva que existe entre la infección de las semillas y las temperaturas y precipitaciones.

Leach, citado por Neergaard (1983) determinó que las lluvias en las primeras etapas del cultivo provocan infección externa que no se transmite a las plántulas. Esto explicaría las distintas conclusiones de los autores que encuentran infección profunda (De Tempe, 1968; Wiesner, 1969) y externa (Gambogi y Byford, 1976). De acuerdo con los resultados del presente ensayo, la infección se localizaría en niveles profundos de las semillas, ya que no se eliminó al tratarlas con hipoclorito. En este caso incluso se incrementaron los valores con respecto al testigo. Esto se debería a la eliminación de contaminantes externos que compiten con *Phoma betae*, lo cual también fue observado por De Tempe (1968).

En nuestros ensayos se observó, además, que la infección se transmitió a las plántulas, comprometiendo su supervivencia. Herber & Ramsey (1948) por el contrario encontraron a *Phoma betae* como patógeno débil de plántulas de la remolacha de uso como hortaliza. Los mismos autores describen el daño más importante sobre raíces almacenadas, principalmente en las más viejas, en cuyas lesiones se distingue micelio blanco-grisáceo, sin desarrollo de picnidios. En el presente ensayo se observaron los mismos síntomas y signo, aunque en menor intensidad. La escasa susceptibilidad que manifestaron las hojas inoculadas coincide con los resultados obtenidos por otros autores en los dos tipos de remolacha (Heberg y Ramsey, 1948; Kerling, 1958).

En las inoculaciones cruzadas sobre semillas de acelga y remolacha se observó dife-

rente agresividad entre los aislamientos de distinta procedencia. Herberg y Ramsey (1948) obtuvieron resultados semejantes al inocular raíces con varios aislamientos. Esto podría deberse a la existencia de grados variables de virulencia en la población de *P. betae*.

Con respecto a la infección del suelo y posterior siembra con semilla sana, los resulta-

dos difirieron con los encontrados por Herberg y Ramsey (1948), quienes no observaron infección en las plántulas inoculadas con este método.

#### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Ing. Agr. H.E. Alippi por la corrección del manuscrito.

#### BIBLIOGRAFIA

- Bugbee, W.M.- The effect of plant age, storage, moisture, and genotype on storage rot evaluation of sugarbeet. *Phytopathology* 69: 414-416 (1979).
- Bugbee, W.M. and D.F. Cole.- The effect of seed infected with *Phoma betae* on rot and sucrose yield of stored sugar beet. *Phytopathology* 71: 357-359 (1981).
- Bugbee, W.M. and El-Nashaar.- A newly recognized symptom of sugar beet rot infection caused by *Phoma betae*. *Plant Disease* 67: 101-102 (1983).
- Byford, W.J.- Factors influencing the prevalence of *Pleospora bjoerlingii* on sugar-beet seed. *Ann. Biol.* 89: 15-19 (1978).
- De Tempe, J.- Some experiments on testing beet for *Phoma betae*. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* 33: 567-572 (1968).
- Gambogi, P. and W.J. Byford.- Some observations on assessing *Phoma betae* infection of sugar-beet seed. *Ann. Appl. Biol.* 82: 31-40 (1976).
- Gaskill, J.O.- Drying after harvest increases storage decay of sugar beet roots. *Phytopathology* 40: 483-486 (1950).
- Herberg, B.C. and G.B. Ramsey.- *Phoma* rot of garden beets. *Phytopathology* 38: 343-347 (1948).
- Kerling, L. De microflora op het blad van *Beta vulgaris*. *Tijdschr. Plziekt* 64: 402-410. *RAM* 38: 436 (1958).
- Leach, L.D.- Seed borne *Phoma* and its relation to the origin of sugar beet seed rots. *Proc. Amer. Soc. Sug. Beet Technol.* 1946: 381-388 (1947).
- Leach, L.D. and J.D. Mac Donald.- Seed borne *Phoma beate* as influenced by area of sugar beet production, seed processing and fungicidal seed treatment. *Journal of The American Society of Sugar Beet Technologists* 19: 4-15 (1976).
- Mc Kay, R.- Sugar beet diseases in Ireland. Dublin. At the Sign of the Three Candles, 77 pp; *RAM* 32: 54 (1952).
- Neergaard, P.- *Seed Pathology* Vol. I: 360 The Mc. Millan Press Ltd. Hong Kong. 839 pp. (1983).
- Newton, W. and J. E. Boshier.- The longevity of *Phoma betae* in garden beet. *Sci. Agr. Ottawa* 26: 305-306 *RAM* 26: 90 (1946).
- Payen, J.- Etude de la resistance a la pourriture des racines de diverses variétés de Betteraves cultivées. Comparaison du pouvoir pathogene de *Phoma betae* et *Botrytis cinerea*. *Bull. Ec. Nat. Sup. Agron. Nancy* 9: 69-72 *RAM* 47: 2315 (1967).
- Singh, R.P. and K. Singh.- Prevalence of *Phoma betae* on seed Crop and in seeds of sugar beet varieties. *Science and Culture* 49: 322-323 *RAM* 61: 6020 (1981).
- Wiesner, K.- The content in beet seeds of the agent of black leg. *Arch. Pflschutz*, 1: 131-154 *RAM* 46: 283 (1965).
- Wiesner, K.- On colonization of Beet seed clusters by *Pleospora bjoerlingii*. *Arch. Pf.. Schutz* 5: 103-109. *RAM* 49: 892 (1969).