

Patogenicidad de algunas cepas del *Verticillium albo-atrum* Rei. y Berth. (*)

Por Fernando Mujica R., M. Sc.

Ing.º Agr.º Jefe de la Sección Certificación de Papas del Departamento de Sanidad Vegetal.

Variaciones patogénicas y culturales del hongo *Verticillium albo-atrum* Rei. y Berth. agente causal de la Marchitez Verticilosa o Hidromicosis han sido dadas a conocer por diversos autores.

La diferencia, en relación con el tipo original descrito por Reinke y Berthold, de una raza aislada por Klebahn (6) (**) en plantas de dalias, llevó a este investigador a elevar a esta nueva raza a un rango específico, denominándola *Verticillium dahliae* Klebahn. Sin embargo su punto de vista no ha encontrado una aceptación general entre los micólogos, siendo objetado entre otros por Carpenter, Haensler, Chamberlain, Van Deer Meer, Wollenweber y Rudolph. Dichos autores consideran que hay pocas diferencias morfológicas entre la raza de Klebahn y el tipo original del hongo observado por Reinke y Berthold. También han servido de argumento para este juicio la falta de una especialización patogénica definida y el amplio e indiscriminado grupo de susceptores (***) que este hongo afecta. Sin embargo las fallas parciales en algunos experimentos de inocula-

(*) Tesis presentada a la Facultad de la Escuela de Graduados de la Universidad de Cornell (EE. UU.) para el grado de «Master of Sciences in Agriculture» Junio 1941.

(**) Los números entre paréntesis hacen referencia a la Literatura citada.

(***) Susceptor es un nuevo sustantivo usado para designar a la planta susceptible a la enfermedad.

ciones interespecíficas realizadas por varios investigadores entre otros por Haensler (4) Jagger y Stewart (5) y Van Deer Meer (9) dejan pendiente un interrogante en relación con la existencia de razas patogénicas dentro de esta especie.

En un esfuerzo para clarificar nuestros conceimientos acerca de la existencia de especialización patogénica en el *Verticillium albo-atrum*, observando simultáneamente la conducta de diversas cepas de él, el autor del presente trabajo realizó algunas pruebas de la patogenicidad de éstas en plantas de papas. También se realizaron observaciones especiales respecto al efecto de la temperatura en el crecimiento del hongo en cultivo puro. En el cuadro 1 se dan detalles respecto a las 10 cepas usadas y la designación numérica que se les asigna para su identificación ulterior en el texto.

CUADRO I.—Cepas de *Verticillium albo-atrum* usadas.

Origen

Aislada de:

- 1 *Acer pennsylvanicum* L. (Arce)
- 2 *Acer platanoides* L. (Arce)
- 3 *Chrysanthemum* sp.
- 4 *Koelreuteria paniculata*
- 5 *Lonicera* p.
- 6 *Physalis* sp.
- 7 *Platanus* sp.
- 8 *Rosa* sp.
- 9 *Solanum melongena* L. (Berenjena)
- 10 *Ulmus americana* L. (Olmo)

Aislamiento

	Fecha	Autor	Localidad
1	5-X-40.....	Mujica, F.	Ithaca, N. Y.
2	21-IX-37....	Welch, D. S.	Long Island, N. Y.
3	17-X-40.....	Welch, D. S.	Ithaca, N. Y.
4	28-VIII-39...	Welch, D. S.	Pennsylvania
5	13-VIII-39...	Welch, D. S.	Rochester, N. Y.
6	3-X-38.....	Dimock	Ithaca, N. Y.
7	28-VII-40....	Welch, D. S.	Ithaca, N. Y.
8	20-X-40....	Dimock	Ithaca, N. Y.
9	10-II-40.....	Welch, D. S.	Ithaca, N. Y.
10	19-VII-39..	Welch, D. S.	Cortland, N. Y.

1. Efecto de la temperatura en el crecimiento del hongo en cultivo puro.—Las cifras siguientes han sido señaladas por los investigadores que se citan como las temperaturas mínima, óptima y máxima para el crecimiento del hongo en cultivo puro.

Temperatura en grados centígrados.

Autor	Mínima	Óptima	Máxima
Bewley (1).....	4.4	23.3	30
Chandhuri (2),...	10.	22.5	30
Edson (3).....	5.	25.	30
Osmun (7).....	10.	20.5	28

Edson establece que esta conducta de hongo en cultivo, presenta alguna correlación con la distribución geográfica de la enfermedad y con su aparición periódica en el año.

En el presente trabajo, el estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento del hongo fué hecho mediante la exposición de 2 discos pétri de cada cepa en cámaras a 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30° C. de temperatura. Diariamente se tomó medidas y anotaciones del carácter del crecimiento de cada disco como se indica en el cuadro 2. En dicho cuadro los resultados se indican en promedio para el primero y segundo períodos de 10 días de observación. Las curvas del incremento diario en el diámetro de la colonia se dibujan en la figura N.º 1. Según estas observaciones el óptimo para el crecimiento de las diversas cepas fluctúa entre 18 y 24°, el mínimum entre 3 y 6 y el máximo entre 27 y 33°.

El tipo micelial de crecimiento entre 3 y 12° no presentó, en las diversas cepas, ninguna diferenciación pronunciada. Sobre 12° ya se observa una clara diferenciación en los tipos de zonaciones. Esta zonación, que es debida a la formación por el hongo de sus estructuras de receso vegetativo o clamidosporas, es formada rápidamente por algunas cepas tales como la 7 y 9 que son capaces de presentar dichas estructuras en los primeros 10 días de crecimiento.

En las láminas 1 y 2 se exhibe el carácter y tipo de zonación de algunas de estas cepas. El medio de cultivo usado para estas placas comparativas fué el agar ciruela el cual es considerado el mejor para estos propósitos por Van Deer Meer (9). Todas las series de cultivos tenían 15 días en el momento de ser fotografiadas. Las cepas de *Chrysanthemum* y *Physalis* fueron las menos aptas del grupo en la formación de zonaciones.

2. Prueba de patogenicidad en almácigos de papa cultivados en un medio estéril.—Para determinar la relación entre el efecto de la

CUADRO 2.—Magnitud diaria en milímetros del crecimiento de diversas cepas del *Verticillium Albo-Atrum* a diferentes temperaturas

	3°		6°		9°		12°		15°	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1. <i>Acer pennsylvanicum</i> ..	0.06	0.10	0.06	0.10	0.12	0.20	0.12	0.40	0.26	0.60
2. <i>Acer platanoides</i>		0.08	0.16	0.33	0.50	0.50	0.66	0.69	0.88	0.88
3. <i>Chrysanthemum</i>			0.07	0.30	0.21	0.35	0.35	0.50	0.35	0.66
4. <i>Koelreuteria paniculata</i>		0.08	0.10	0.20	0.16	0.27	0.22	0.27	0.33	0.57
5. <i>Lonicera</i> sp.....	0.20	0.22	0.40	0.50	0.61	0.66	0.80	0.92	1.11	1.22
6. <i>Physalis</i> sp.....	0.10	0.15	0.30	0.35	0.37	0.44	0.51	0.55	0.80	0.90
7. <i>Platanus</i> sp.....					0.05	0.15	0.07	0.25	0.16	0.35
8. <i>Rosa</i> sp.....			0.40	0.45	0.50	0.50	0.84	1.00°	1.50	1.55°
9. <i>Solanum melongena</i> ...			0.06	0.10	0.06	0.25	0.26	0.40°	0.40	0.60°°
10. <i>Ulmus americana</i>	0.08	0.15	0.11	0.20	0.20	0.55°	0.55	0.60°	1.22	1.23

	18°		21°		24°		27°		30°	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1. <i>Acer pennsylvanicum</i> ..	0.36	1.35	0.66	1.30	0.86	1.70	1.30	0.45	0.27	0.33
1. <i>Acer platanoides</i>	1.00	1.14	1.60	1.84	1.70	1.53	1.40	1.23		
3. <i>Crysanthemum</i>	0.53	0.33	0.70	0.66	0.60	0.60	0.20	0.10		
4. <i>Koelreuteria paniculata</i>	0.40	0.77	0.60	1.00	0.50	0.80	0.40	0.35	0.20	0.15
5. <i>Lonicera</i> sp.....	1.20	1.35	1.00	0.98	0.91	0.84	0.50	0.40	0.30	0.30
6. <i>Physalis</i> sp.....	1.30	1.50	1.32	1.60	1.10	1.40	0.70	1.00	0.20	0.10
7. <i>Platanus</i> sp.....	0.27	1.60	0.35	0.50	0.30	0.40	0.26	0.25	0.20	0.20
8. <i>Rosa</i> sp.....	1.60	1.71°	1.80	2.20°°	0.66	1.20	0.55	0.44	0.44	0.33
9. <i>Solanum melongena</i> ...	0.94	0.94°°	1.16	1.51	1.33	1.66	1.20	1.03	0.40	0.30
10. <i>Ulmus americana</i>	1.40	1.60	1.62	3.00	1.20	1.80	0.80	1.53	0.68	0.68

NOTA.—Medio de cultivo: papa agar dextrosa.

A Término medio de crecimiento en los primeros 10 días.

B Término medio de crecimiento en los segundos 10 días.

° Zonación tenue.

°° Zonación clara o definida.

temperatura sobre el crecimiento del hongo en cultivo y su conducta patogénica se efectuaron pruebas sobre almácigos de papas.

Las semillas fueron sembradas en medio estéril en frascos Erlenmayer de 150 cc. de capacidad que contenían agar al 2% más 1% de dextrosa. Previamente a la siembra la semilla de papa fué desinfectada mediante una sumersión instantánea en alcohol y después,

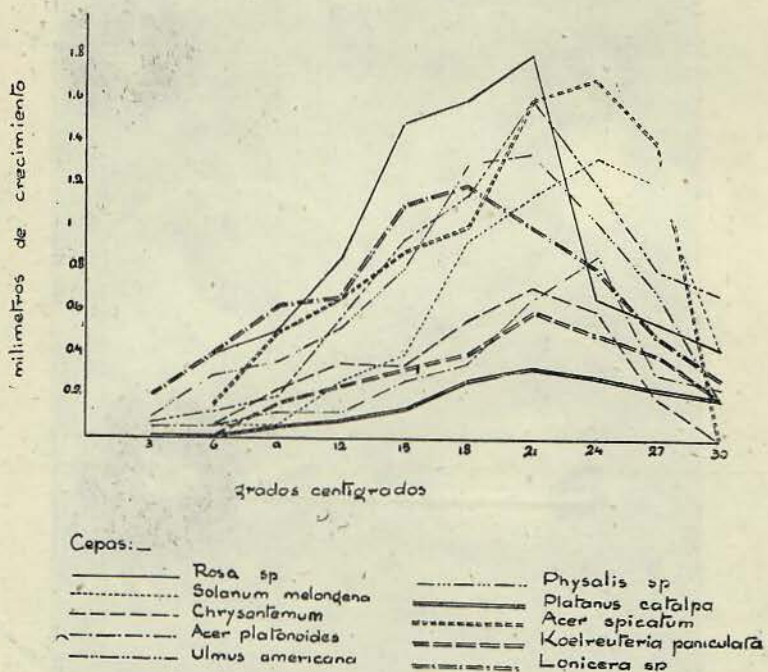


Fig. 1.—Magnitud diaria del crecimiento de diversas cepas de *Verticillium albo-atrum* en agar papa dextrosa en los primeros diez días.

durante 30 minutos en una solución al 25% de cloruro de calcio lavándola finalmente en agua esterilizada. Después de este tratamiento la semilla fué sembrada mediante una técnica sencilla, usando una espátula para distribuir uniformemente las 10 a 15 semillas que se colocaron en cada frasco. La primera actividad visible de la semilla fué observada generalmente 4 días después de sembrada. Las inoculaciones con las diversas cepas fueron hechas en el octavo día mediante la introducción de pequeños trozos de agar con micelio vigoroso del hongo obtenido de cultivos puros. Las plantitas, en el momento de ser inoculado el medio del frasco, tenían 2 a 3 centímetros de altura

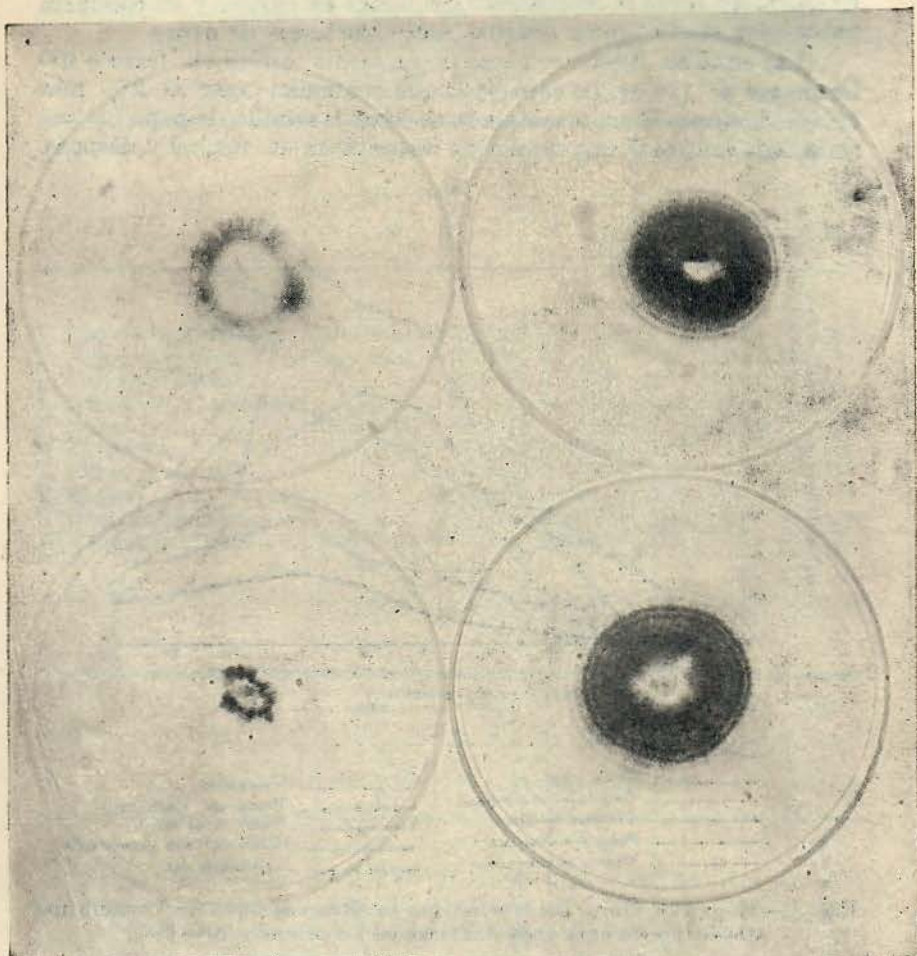


Lámina .—Cultivos de 15 días en agar ciruela de las cepas
A *Rosa* sp. C *Chrysanthemum* sp.

y sólo presentaban sus cotiledones abiertos. Para permitir al hongo establecerse adecuadamente en el nuevo medio, los frascos se dejaron a la temperatura del medio ambiente durante 2 días, siendo llevados posteriormente a los refrigeradores con las temperaturas deseadas.

En una prueba preliminar reducida para seleccionar a las cepas más marcadamente patogénicas para trabajos ulteriores, las de *Acer pennsylvanicum*, *Lonicera* sp., *Physalis* sp. y *Platanus* sp. fueron elimi-

nadas ya que éstas no inducían ningún efecto patógeno en los almá-cigos de papa. En las pruebas posteriores con las restantes se utili-zaron 2 frascos para cada una de las cepas seleccionadas en cada una de las temperaturas 12, 15, 18, 21, 24 y 27° C.

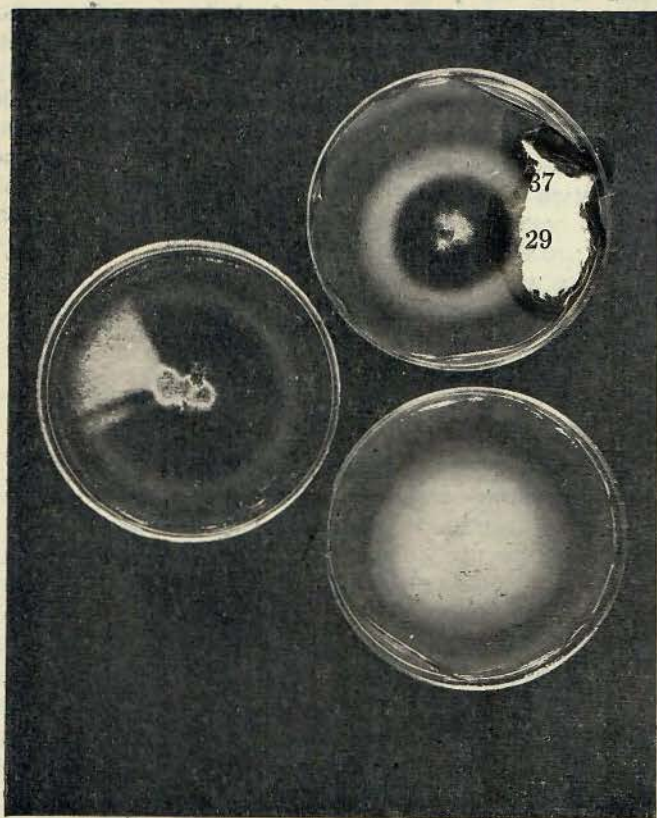


Lámina 2.—Cultivos de 15 días de las cepas, *Koelreuteria paniculata*,
Acer pensylvanicum, *Physalis* sp.

La conducta patogénica de las cepas usadas fué en general muy débil, aunque el crecimiento del hongo cubrió más o menos pronto la superficie del agar, emergiendo los tallos de las plantitas algunas veces a través de la cubierta algodonosa del micelio del hongo.

Dentro del margen óptimo de temperatura, la cepa más virulen-

ta solamente indujo marchitez en el almácigo después de los 23 días. Sin embargo en algunos casos, particularmente en la cepa aislada del *Solanum melongena* una o dos plantitas en cada frasco parecían haber sido estimuladas a un mayor crecimiento con una amarillez notoria de los cotiledones, la cual desapareció después de ser expuesto el frasco 2 días a la luz y a la temperatura del medio ambiente. No obstante tal recobramiento en la mayoría de los casos fué solamente temporal, marchitándose la plantita alrededor de 20 días después, al tiempo que se formaba un pequeño cojín micelial del hongo en el ápice entre ambos cotiledones. Al hacer secciones longitudinales del tallo de tales plantas, el micelio del hongo se reveló a través del tejido vascular. En esta misma cepa, después de 30 días de inoculados se observó una amarillez general sin marchitez en todos los almácigos sometidos a temperaturas entre 12 a 21°. En el cuadro 3 y figura 2 se dan los detalles de estas observaciones.

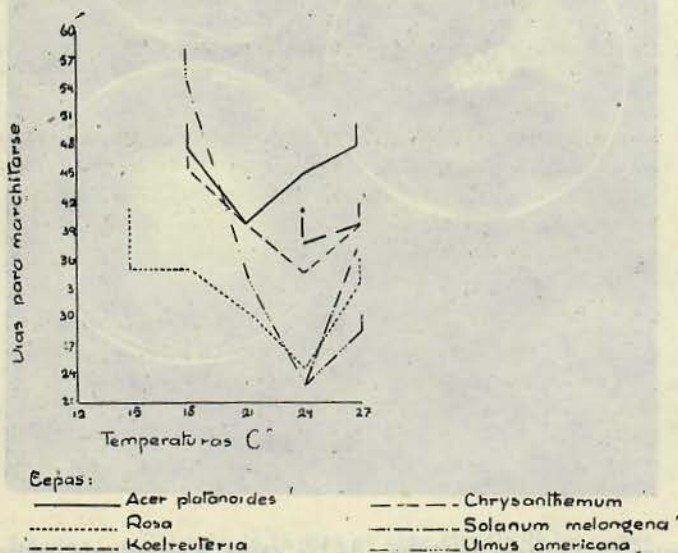


Fig. 2.—Patogenicidad de diversas cepas de *Verticillium albo-atrum* en almácigos de papas mantenidos a diferentes temperaturas.

CUADRO 3.—Días para presentar marchitez de los almácigos de papa inoculados con diversas cepas de *Verticillium albo-atrum*.

Cepas de	Temperatura C°						Observación terminada después de
	12	15	18	21	24	27	
<i>Acer platanoides</i> ...	—	—	48	38	45	48	55 días
<i>Chrysanthemum</i> sp.	—	—	—	—	38	40	40 días
<i>Koeleria paniculata</i>	—	—	46	40	35	40	50 días
<i>Rosa</i> sp	—	35	35	31	25	34	52 días
	*	*	* *	* *			
<i>Solanum melongena</i>	—	—	—	—	23	37	44 días
<i>Ulmus americana</i> ...	—	***	56	35	23	29	58 días

(*) Clorosis sin marchitez.

(**) Una o dos plantas en cada frasco estimuladas a un crecimiento anormal marchitándose posteriormente.

(***) Una o dos plantas en cada frasco desarrollaron un micelio aéreo en el ápice de los cotiledones sin mostrar ningún síntoma de marchitez

3. Estudio de la patogenicidad del hongo en plantas de papa.—

Para estudiar las diferencias de la conducta patogénica de algunas de las 10 cepas del hongo en plantas obtenidas de tubérculos de papa y bajo condiciones de invernadero con aquella observada en almácigos, se hicieron los experimentos siguientes:

a) *Inoculación del tallo por incisión*.—En este experimento se usó dos series de plantas constituidas por las variedades Irish Cobbler y Katahdin. Cada una de estas series fueron divididas en 7 grupos de 15 plantas cada uno para cada cepa. Las plantas fueron inoculadas mediante la colocación de una pequeña cantidad de micelio vigoroso del hongo cultivado en agar, dentro de una profunda incisión en forma de V en el tallo, hecha con un escalpelo esterilizado, siendo enseguida cubierta la herida con vaselina estéril y sobre ésta con una huincha adhesiva especial usada para cubrir injertos. Los 7 grupos en cada variedad fueron distribuidos como sigue:

Grupo 1. Inoculado con la cepa N.º 2	
» 2. » » » » »	4
» 3. » » » » »	8
» 4. » » » » »	9
» 5. » » » » »	10
» 6. Testigo con incisión.	
» 7. Testigo no tratado.	

Los primeros síntomas claros de la enfermedad fueron observados en plantas de los grupos 3 y 4 de la variedad Irish Cobbler 37 días después de inoculadas. Estos síntomas se caracterizaban por una clorosis general acompañada de una coloración purpúrea rojiza de las puntas de las hojuelas y de una «epinastia» o curvamiento sin marchitez aún, de las hojas inferiores de la planta. Después de 40 días, algunas plantas de los grupos 1 y 2 de la variedad mencionada presentaron también síntomas similares.

En la lámina 3, se exhibe una planta mostrando esta típica marchitez fotografiada 40 días después de inoculada.

Después de una semana de los primeros síntomas recién descritos, la marchitez parcial apical y la amarillez de las hojas inferiores eran característica en varias plantas de los grupos mencionados, estando asociado este síntoma con manchas o estrías irregulares de color café oscuro sobre los tallos. Tales manchas cafés siempre tenían relación con una coloración café oscura de los tejidos vasculares interiores del tallo, siendo el hongo reaislado fácilmente de estos puntos en los 4 grupos mencionados.

Sin embargo ni el grupo N.º 5 de la variedad Irish Cobbler ni ninguno de los grupos correspondientes en la variedad Katahdin desarrollaron ningún síntoma interno o externo de enfermedad dentro de los 60 días después de inoculados, cuando se puso término a este experimento. En estos grupos también resultaron infructuosos todos los intentos de reaislar el hongo de la región vascular que rodeaba al punto donde se efectuó la inoculación.

Un recobramiento temporal y parcial se observó durante los períodos más calurosos del día en algunas plantas ligeramente marchitas.

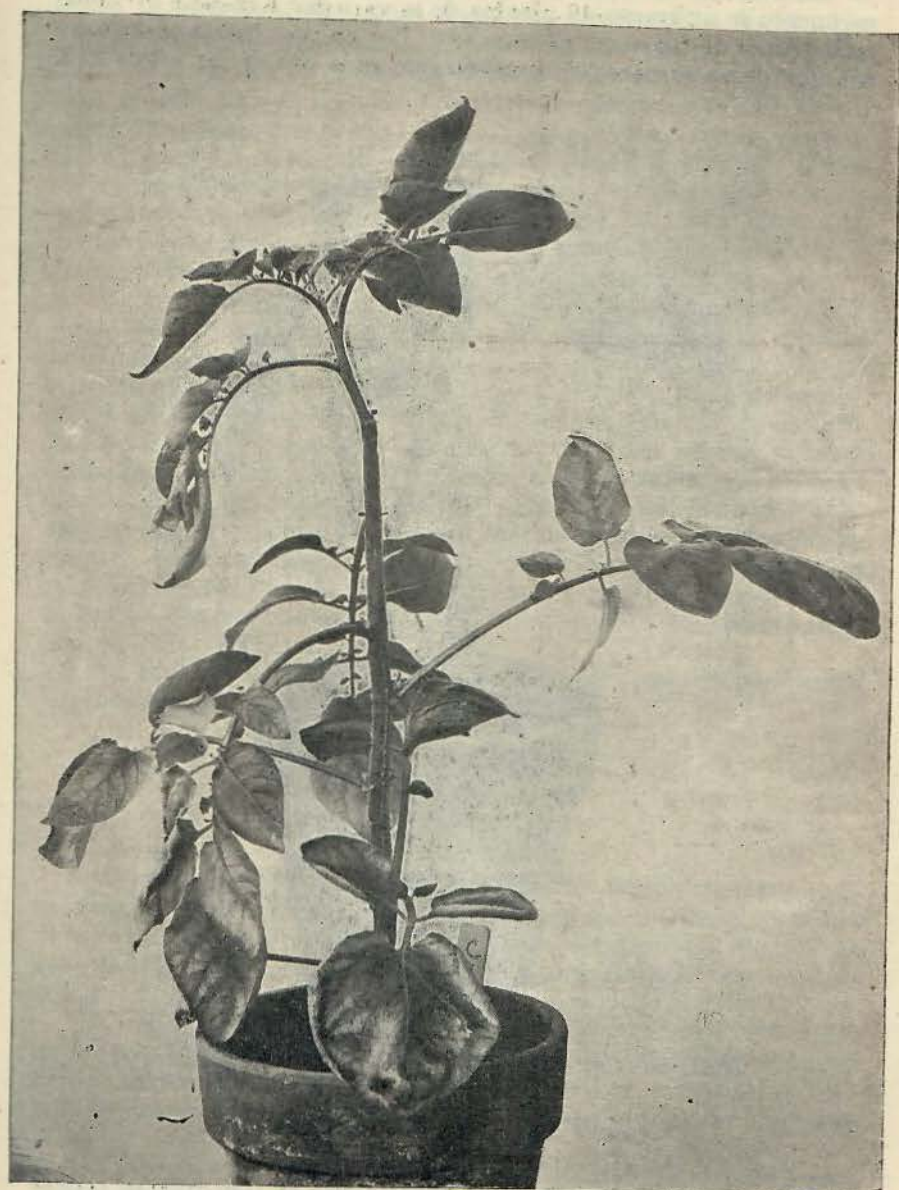
En el cuadro 4 se dan a las cifras y observaciones hechas en este experimento.

CUADRO 4.—Días para presentar marchitez en las series inoculadas por incisión en el tallo.

Grupos N.º	Cepa	Variedad de papa	
		Katahdin	Irish Cobbler
1.	<i>Acer platanoides</i>	—	40
2.	<i>Koeleruteria paniculata</i>	—	40
3.	<i>Rosa sp.</i>	—	37(*)
4.	<i>Solanum melongena</i>	—	37(**)
5.	<i>Ulmus americana</i>	—	—
6.	Testigo (tratado)	—	—
7.	Testigo (no tratado)	—	—

(*) Todas las plantas exhibían síntomas claros de marchitez con estrías notorias en los tallos.

(**) Solamente una planta exhibía un aspecto marchito definido.



Lám. 3.—Primeros síntomas de la Verticilosis en una planta de la variedad Irish Cocker inoculada por incisión en el tallo.

b) *Inyección en el tallo con suspensión de esporas.*—En este experimento se utilizaron 40 plantas de la variedad Katahdin divididas en 8 grupos de 5 maceteros cada uno. Los grupos fueron inoculados con una densa suspensión de esporas de cada una de las cepas 2, 3,



Lám. 4.—Marchitez verticilosa típica.

4, 8, 9 y 10 mediante una aguja hipodérmica de tipo especial recientemente diseñado para este objeto. Cuarenta y cinco días después de inoculadas, cuando estos experimentos fueron terminados, no se observó ninguna reacción visible en las plantas tratadas.

c) *Inoculación del suelo*.—Para este método de inoculación se usó un número igual de plantas Katahdin con la misma distribución y cepas que en el experimento anterior. La inoculación fué hecha mediante la mezcla con tierra esterilizada de un cultivo de 9 días de edad de cada cepa en un medio de trigo preparado en frascos Erlenmayer de acuerdo con la técnica de Drayton. Para este experimento las plantitas fueron cultivadas en maceteros de 8 cm. de diámetro y trasplantadas a los 20 días a maceteros de 13 cm. de diámetro en los cuales se había agregado previamente la tierra inoculada. Dentro de los 45 días, cuando se le puso término a este experimento, no se observó ningún síntoma visible de las plantas.

d) *Inoculación de las raíces por inmersión en suspensión de esporas*.—En este experimento se utilizó un número igual de plantas de la misma variedad con las mismas cepas y distribución que en los experimentos anteriores. Veinticinco días después de plantadas se sacó a las plantas de los maceteros en que habían sido colocadas primitivamente y después de remover el tubérculo semilla y lavar cuidadosamente sus raíces, se sumergió a éstas durante 3 horas en una densa suspensión de esporas del hongo en agua destilada. Después de este tratamiento las plantas fueron replantadas en maceteros con suelo esterilizado y colocadas en condiciones favorables para recobrase. Las pérdidas debidas a este tratamiento sólo fueron de 2,5%. Cincuenta días después de inoculadas no se observó ningún síntoma visible en ningún grupo.

La temperatura del invernadero en todos estos experimentos fluctuó entre 17 a 21°C.

DISCUSION

El corto tiempo en que estos experimentos fueron realizados y la cantidad reducida del material usado, no dan ninguna base adecuada para conclusiones definitivas e inobjectables. Sin embargo al autor de este trabajo los siguientes hechos le han parecido más o menos definidos:

1. La debilidad de la patogenicidad del *Verticillium albo-atrum* en las cepas observadas y también la forma del desarrollo del hongo dentro del mesonero, algunas veces sin provocar marchitez en éste permite considerarlo, en relación con la papa, sólo como un patógeno débil.

2. Las 10 cepas usadas pueden ser clasificadas dentro de 3 grupos de acuerdo con su conducta patogénica en la planta de papa y con el vigor del crecimiento del hongo en cultivo puro.

- a) Claramente patogénicas. Buen vigor en cultivo; *Rosa sp.* y *Solanum melongena*.

b) Débilmente patogénicas. Desarrollo pobre en cultivo, (a excepción de las cepas. *Acer platanoides* y *Ulmus americana*): *Koeleria paniculata*, *Chrysanthemum* sp. *Acer platanoides* y *Ulmus americana*.

c) No patogénicas. Regular crecimiento en el cultivo: *Acer pennsylvanicum*, *Lonicera* sp., *Physalis* sp. y *Platanus* sp.

3. El efecto de la temperatura sobre la virulencia de las diversas cepas que resultaron patogénicas a la papa, estuvo directamente correlacionado con el desarrollo del hongo en cultivo puro.

4. La epinastia de los pecíolos de las hojas y las manchas café obscuras sobre los tallos son uno de los primeros síntomas de la enfermedad y parecen, por los antecedentes que obran en conocimiento del autor, no haber sido mencionados anteriormente en relación con la sintomatología de la Marchitez Verticilosa de la papa.

5. La susceptibilidad al ataque de este hongo es más o menos clara en la variedad Irish Cobbler, pero la variedad Katahdin parece ser inmune a su ataque.

6. Los resultados alcanzados en las inoculaciones dan una firme base a la conclusión de que existe especialización patogénica en el *Verticillium albo-atrum*.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BEWLEY, W. F., «Sleepy disease» of the tomato. Ann. Appl. Biol. 9: 116-134. 3 pl. 1922.
- 2.—CHANDHURI, H., A study of the growth in culture of the *Verticillium albo-atrum*. R. et. B. Ann. Bot. 37: 519-539. 12 fig. 1923.
- 3.—EDSON, H. A., and M. Shapovalow, Temperature relations of certain potato —rot and wilt— producing fungi. Jour. Agr. Res. 18: 511-524. 1920.
- 4.—HAENSLER, C. M., Peach wilt. New Jersey Agr. Exp. Sta. Rept. Dept. Plant Path. 1922-23: 364-366. 2 pl. 1924.
- 5.—JAGGER, J. C., and V. B. Stewart. Some *Verticillium* diseases. Phytopath. 8: 15-19. 1918.
- 6.—KLEBAHN, H., Beiträge zur Kenntnis der Fungi imperferti. L. Eine *Verticillium* Krankheit auf Dahlien. Mycol. Centralbl. 3 (2): 49-66. 15 fig. 1913.
- 7.—OSMUN, A. V., Report of the Department of Botany. Massachusetts Agr. Exp. Sta. 33rd. Ann. Rept. Pub. Doc 31: 19a-22a. 1921.
- 8.—RUDOLPH, B. A., *Verticillium* Hadromycosis. Hilgardia 5: 197-353. 9 fig. 4 pl. 1931.
- 9.—VAN DER MEER, J. H. H., *Verticillium* —wilt of herbaceous and woody plants. Med. Landbouwhooesch. (Wageningen) 28: 1-82. 15 pl. 1925.