

# Aspectos de la conidiogénesis de *Septoria apiicola* Speg. mediante el uso de la microscopía electrónica de transmisión.

Franklin J. Escalona\* y Augusto Farro A.\*\*.

## Resumen

Previo al estudio ultraestructural de *Septoria apiicola* Speg. se realizaron observaciones en el microscopio de luz; de este modo se generalizó el conjunto de estructuras para esta especie fúngica, resolviéndose también el desarrollo enteroblástico de los conidios. La ultraestructura de la conidiogénesis de *S. apiicola* se evidenció en picnidios del del hongo obtenidos de céleri (*Apium graveolens*) infectado bajo condiciones naturales. Las observaciones del desarrollo conidiogénico realizadas con microscopio electrónico, permitieron mostrar una conidiogénesis enteroblástica, donde ninguna de las capas, externa e interna, de la pared del nuevo estado conidial continúan con las respectivas capas de la pared del estado previo en la formación del conidio. Tomando como base el desarrollo conidiogénico, Sutton (1980) clasificó el género *Septoria* Sacc. en el suborden Blastopycnidiineae, caracterizado por tener conidiogénesis holoblástica. No obstante, el desarrollo de los conidios de *Septoria spp* ha demostrado ser heterogéneo. La heterogeneidad en la conidiogénesis, manifestada en especies de *Septoria*, da especial significación a los resultados que puedan ser obtenidos de ultraestructura.

## Abstract

Before doing ultrastructural studies in *Septoria apiicola* Speg., some observations, using the light microscope were carried out. In such a way, both the main structures of the specie as a whole and the enteroblastic development of the conidia were pointed out.

The conidiogenesis was evident in the picnidial stages of the fungus using infected celery (*Apium graveolens*) under natural conditions, as a host. It showed that neither one of the wall layers, external or internal, of the new conidial stage, are a continuation of the previous one.

The inclusions of *Septoria* in the suborder Blastopycnidiinae (Sutton 1980) was due, mainly because of the thinking, it has holoblastic type of conidiogenesis alone. In our findings, however, we concluded that both exist and it was posible, by using ultrastructure techniques with the E.M.

## Introducción

Los avances logrados hasta hoy en la investigación ultraestructural aplicada a la micología, han permitido entender mejor los aspectos referidos a la estructura y organización celular de los hongos, la interacción de estos con sus hospederos y el desarrollo de sus esporas. Además del empleo de otras técnicas modernas, el uso del microscopio electrónico de transmisión (MET) y el de barrido, destacan como herramientas de asistencia en el

estudio de los hongos (Klomp-  
parents, 1990).

La formación de las esporas de los hongos o modos de desarrollo conidial, definidos por Hughes en 1953 y su relación con la clasificación de los Deuteromycetes han estimulado al máximo los estudios ultraestructurales de conidiogénesis (Klomprens, 1990). Sobre el MET es notable como el equipo de uso más generalizado.

La conidiogénesis, estudiada a través de microscopía óptica y MET, es un criterio de valor taxonómico para la clasificación de los hongos; tanto para los que llevan sus conidios en conidio

\* Profesor contratado, Posgrado de Fitopatología.UCLA.

\*\* Profesor Asociado, Posgrado de Fitopatología.UCLA.

foros libres (Hughes, 1953), como para aquellos que los llevan dentro de las estructuras de fructificación (Sutton, 1980).

*Septoria* Sacc., un género picnidial, se caracteriza por tener conidiogénesis holo-blástica con proliferación simpodial o sincrónica (Sutton, 1980). No obstante, para especies de *Septoria* se reconocen tres tipos diferentes de conidiogénesis: simpodial blástica, solitaria blástica y fialídica (Luttrell, 1979); asimismo, en especies de este género se han observado células conidiogénicas proliferando anelídica y percurrentemente, como también especies formando varios tipos de células conidiógenas dentro de un picnidio (Andrianova, 1990).

Los diversos tipos de conidiogénesis descritos en *Septoria*, han sido estudiados mediante microscopía luz (Punithalingam, 1967, 1980 y 1982; Punithalingam and Waterston, 1970; Punithalingam and Holliday, 1972; y Sutton and Waterston, 1966); sin embargo, las características de los picnidios, de las células conidiógenas y de las esporas han dificultado estas observaciones. La utilización del MET ha facilitado la realización de estudios más completos sobre el desarrollo conidiogénico de *Septoria* (Sun-ny, 1977).

Por cuanto los hongos reflejan plasticidad en el de-

sarrollo de sus conidios (Minter, Kirk and Sutton, 1982; 1983a, 1983b; y Sigler, 1989), los criterios expresados por Minter respecto a la formación de conidios tálicos y blásticos y, a la presencia de "fialides" y "anelides" en una sola especie, deberán ser considerados al interpretar el desarrollo conidial de los Deuteromycetes (Minter, 1984).

Toda evidencia referida a ontogenia conidial que pueda ser acumulada, es válida para sustentar a este carácter como criterio moderno de clasificación de hongos imperfectos, y por ende para *Septoria* spp.; en consecuencia, este trabajo tiene como objetivo contribuir con el conocimiento de la conidiogénesis de *Septoria apiicola* Speg. a nivel ultraestructural.

#### Materiales y metodos

Como punto de referencia al estudio en el MET, se realizó microscopía de luz; a los efectos, secciones longitudinales de picnidios inmersos en el mesófilo de la hoja de céleri, y también células conidiógenas y conidios, se montaron en láminas portaobjetos con eritrosina más cubre objeto. Los esquemas de las estructuras fúngicas se dibujaron con la ayuda de cámara lúcida. Las dimensiones de las estructuras fúngicas se determinaron con una escala micrométrica incorpo-

rada en el ocular del microscopio.

Para observar la ultraestructura de la conidiogénesis se utilizaron picnidios de *S. apiicola* ocurridos en célerly (*A. graviolens*) en condiciones de campo.

Material de hojas frescas (trozos de 2 x 2 mm) conteniendo lesiones con picnidios de hongo, fue colocado en 10 ml de agua destilada dentro de tubos de ensayo con tapa, durante 1-2 horas; luego, se agitaron vigorosamente (en un agitador eléctrico) para asegurar la máxima asimilación de agua y la liberación de los conidios. Posteriormente se incubaron en agaragua para la formación de esporas dentro de picnidios vacíos.

El material fue fijado, luego del período de incubación, en glutaraldehído al 5% (buffer fosfato 0,2 M, pH 7.2) a 4 °C durante 4 días; después se lavó con una mezcla de agua destilada y buffer fosfato 0,2 M, pH 7.2 (1:1, V:V). Una post fijación fue efectuada en  $O_3O_4$  al 2%, no amortiguado, a 21 °C durante 2-3 horas; nuevamente se lavó en buffer 0.1 M, pH 7.2. A continuación se deshidrató en una serie de etanol (Sunny, 1977).

La infiltración del material postfijado se hizo, secuencialmente, con óxido de propileno más plástico (Pily/bet 812), y plástico. Luego de la evaporación del exceso de solvente, el material se incluyó en plástico puro vertido en moldes o cápsulas de 11 x 5 x 4 mm. La polimerización del plástico se efectuó a 60 °C, durante 48 horas.

Los coretes gruesos (1  $\mu$ m) y finos (< 600 Å), se obtuvieron con la utilización de un ultramicrotomo (Dupont Sorvall, MT2-B) provisto con cuchilla de diamante.

Para visualizar la orientación del material, los cortes gruesos se montaron en láminas portaobjetos con azul de toluidina y se observaron en el microscopio óptico.

Los cortes finos se montaron en rejillas de cobre previamente lavadas con acetona; se tiñeron, sucesivamente, con acetato de uranilo por 2,5 min y citrato de plomo por 7.5 min. (Serrano y otros, 1981) y, se observaron al MET.

#### Resultados y discusión

El estudio de *S. apiicola* mediante microscopía de luz

evidencia conidiogénesis enteroblástica (Fig. 1), desde cédulas conidiógenas hialinas, discretas, ampuliformes a obpiriformes, determinadas o indeterminadas con proliferación simpodial. Al MET, este modo de desarrollo conidiogénico deja ver que, la especie estudiada no reserva para su nuevo estado conidial ninguna de las capas (externa e interna) de la pared, en continuación con las respectivas capas de la pared del estado previo de la formación del conidio (Fig. 2,D). De esta manera se define, actualmente, al término enteroblástico; en este modo de desarrollo conidial, la pared interna del estado previo, con frecuencia es continua con la pared externa del nuevo estado, proyectándose en este último una nueva pared interna (Minter, 1982 y 1984).

Considerando que los Deuteromycetes pasan, normalmente, por cuatro estados de desarrollo (iniciación, maduración, delimitación y sucesión conidial) durante la producción de sus conidios y, entre producción de esporas sucesivas ocurre una proliferación y regeneración de la cédula conidiógena (Minter, 1984), sería prematuro indicar que la "fialide" observada (Fig. 2, D) está dando lugar al primer conidio (estado de iniciación) o bien, corresponde a un estado de proliferación conidial. Una

cinética de crecimiento podría revelarlo.

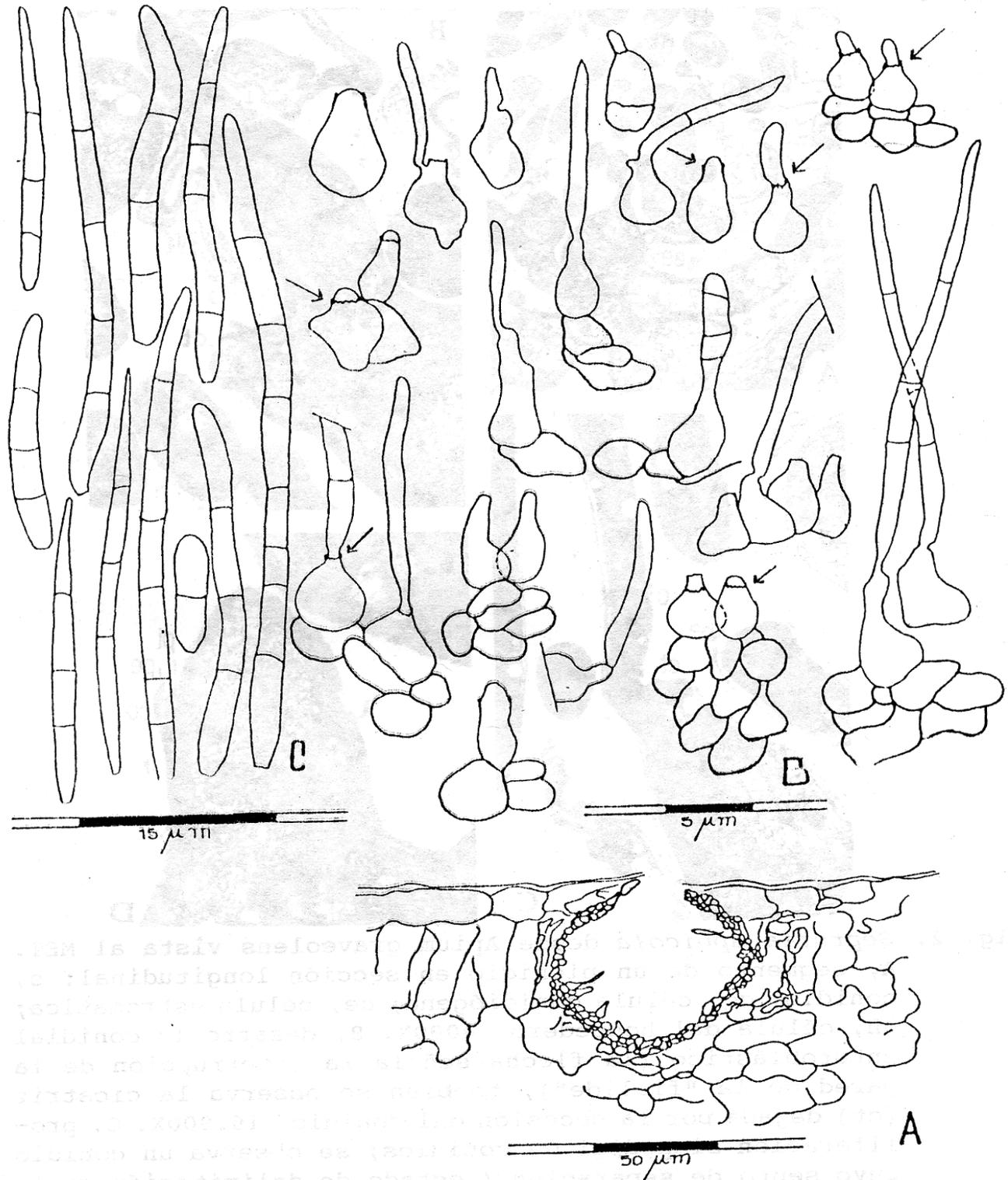
Al MET, la célula conidiógena indeterminada con proliferación simpodial limitada (Fig. 2, B-C) deja una proyección cilíndrica a manera de cicatriz, al ocurrir la sucesión del conidio; esta cicatriz es plana ancha y no engrosada.

#### Agradecimiento

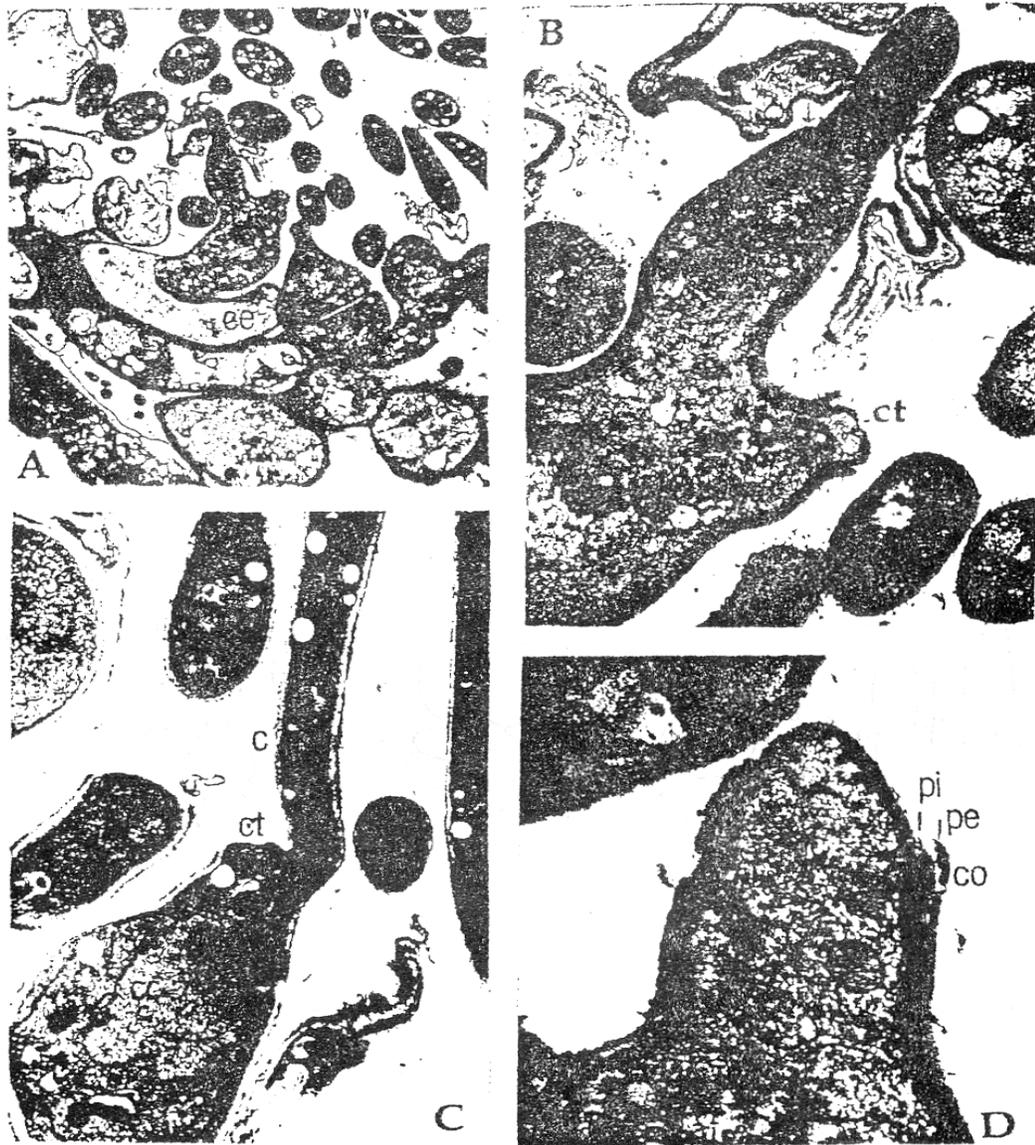
Los autores desean expresar su agradecimiento a los técnicos Yolanda Bartolomé y Ruben Gómez, adscritos a la Unidad de Ultraestructura de la Escuela de Medicina de la UCLA, por su trabajo en el procesamiento de nuestras y fotografiado, respectivamente.

#### Literatura citada

1. Andrianova, T. V. 1990. Peculiarities of the conidiogenous apparatus structure in certain species of the genus *Septoria* Saac. *Ukrayins'kyi Botanichnyi Zhurnal* 47(4):48-53.
2. Hughes, S. J. 1953. Conidiophores, conidia, and classification. *Can. J. Bot.* 31:577-659.
3. Klomparens, K. L. 1990. The development and application of ultrastructural research in mycology. *Mycopathologia* 109:139-148.
4. Luttrell, E. S. 1979. Deuteromycetes and their relationships. B. Kendrick (ed.).



**Fig. 1.** *Septoria apiicola* sobre hojas de *Apium graveolens*, vista al microscopio de luz. A, picnidio: sección longitudinal; B, células conidiógenas y conidios ( la flecha señala el desarrollo enteroblástico de los conidios); C, conidios.



**Fig. 2.** *Septoria appicola* desde *Apium graveolens* vista al MET. A, segmento de un picnidio en sección longitudinal: c, conidio; cc, célula conidiógena; ce, célula estromática; ch, célula del hospedero. 4000X. B, desarrollo conidial enteroblástico (la flecha señala la interrupción de la pared de la "fialide"), también se observa la cicatriz (ct) dejada por la secesión del conidio. 16.800X. C, proliferación simpodial de conidios; se observa un conidio cuyo septo de separación (estado de delimitación conidial) aún no se ha formado. 14.000X. D, formación de un fialoconidio: co, colarrete; pe, pared externa; pi, pared interna; f, "fialide"; lc, locus conidiogénico. 28.000X. Microfotografía de transmisión electrónica tomada en la UDIULTRES-UCLA.

The whole fungus. Vol. I. National Museum of Natural Sciences, Ottawa, Canada and the Kananaskis Foundation. pp.241-264.

5. Minter, D. W., P. M. Kirk y B. C. Sutton. 1982. Holo-blastic phialides. Trans. Br. Mycol. Soc. 79(1):75-93.

6. Minter, D. W. 1984. New concepts in the interpretation of conidiogenesis in deuteromycetes. Microbiological Sciences 1(4):86-89.

7. Punithalingam, E. 1967. *Septoria adanensis*, *S. chrysanthemella*, *S. leucanthemi*, *S. obesa* y *S. socia*. Description of pathogenic fungi and bacteria. N° 136, 137, 138, 139 y 140. Commonw. Mycol. Inst.; Kew Surrey, England.

8. Punithalingam, E. y P. Holliday. 1970. *Septoria helianthi* y *S. passerini*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N° 276 y 277. Commonw Mycol. Inst.; Kew, Surrey, England.

9. Punithalingam, E. y P. Holliday. 1972. *Septoria lactucae* y *S. glycines*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N° 335 y 339. Commonw. Mycol. Inst.; Kew, Surrey, England.

10. Punithalingam, E. 1980. *Septoria cannabis*, *S. carthami* y *S. passifloricola*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N° 668, 669 y 670. Commonw, Mycol. Inst.; Kew, Surrey, England.

11. Punithalingam, E. 1982. *Septoria Cucurbitacearum*.

Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. N° 740. Commonw. Mycol. Inst.; Kew, Surrey, England.

12. Serrano y otros. 1981. Microscopía electrónica y ultraestructura. de técnicas. Instituto de Anatomía Patológica. Universidad de los Andes. Mérida.

13. Singler, L. 1989. Problems in application of the terms "blastic" and "thalic" to modes of conidiogenesis in some onygenaleam fungi. Mico-pathologia. 106:155-161.

14. Sunny H., W. Y. 1977. The conidium ontogeny of *Septoria nodorum* (Berk) Berk. M. S. Thesis. Univ. Minnesota.

15. Sutton, B. C. & J. M. Waterston. 1966. *Leptosphaeria nodorum*, *Septoria apicola*, *S. tritici*. Description of pathogenic fungi and bacteria. N° 86, 88, 89 y 90. Commonw. Mycol. Inst.; Kew, Surrey, England.

16. Sutton, B. C. 1980. The coelomycetes. Fungi imperfecti with picnidia, acervuli and stromata. Commonw. Mycol. Inst.; Kew, Surrey, England.