

La «antracnosis» de los sauces cultivados en el Delta del Paraná *

POR LA

ING. AGR. CLOTILDE JAUCH **

INTRODUCCIÓN

La producción nacional de maderas no cubre las necesidades de la industria, así es que se nota una notable escasez de esta materia prima, especialmente en las llamadas maderas blandas. Diversas causas influyen en esta situación, entre las cuales no es de poca importancia el desarrollo de enfermedades, como la «antracnosis» de los sauces, la más grave enfermedad, que ataca a este vegetal, cuyas plantaciones abarcan en el Delta del río Paraná, una superficie aproximada de 50.000 hectáreas, con más de 90 millones de ejemplares ¹. Casi no existe sauzal en la nombrada región, que no esté atacado de «antracnosis».

En nuestro país no se ha hecho ningún estudio detenido con respecto al objeto de este trabajo. Lo único existente son las publicaciones realizadas por el profesor Ing. Agr. Juan B. Marchionatto (9-10-11) ², quien relaciona la enfermedad con *Marssonina nigricans* Ell. et Ev., aunque con ciertas reservas en la determinación específica del hongo.

* Tercer trabajo de adscripción a la Cátedra de Fitopatología, publicado a pedido de la Comisión Examinadora, formada por los profesores titulares Ingrs. Agrs. Juan B. Marchionatto, Lorenzo R. Parodi y Santos Soriano el 30 de octubre de 1951. El trabajo original con las láminas en colores se encuentra archivado en la Biblioteca de la Facultad de Agronomía y Veterinaria.

** Ingeniera Agrónoma. Jefa de Trabajos Prácticos y Docente autorizada de la Cátedra de Fitopatología.

¹ Datos facilitados por el Ing. Agr. Osvaldo Buresch Sagner.

² Los números entre paréntesis corresponden a los de la bibliografía citada al final del trabajo.

En mis investigaciones he llegado a la conclusión que lo que se conoce bajo el nombre vulgar de «antracnosis» de los sauces se refiere, en realidad, a dos enfermedades distintas provocadas por dos diferentes parásitos: *Marssonina Kriegeriana* (Bres.) Magn. y *Marssonina salicicola* (Bres.) Magn.

ANTECEDENTES

En la obra «Rabenhorst's Kryptogamen Flora» (1) se mencionan cuatro especies de *Marssonia*¹: *M. salicis* Trail., *M. obscura* Romell in litt., *M. salicicola* Bres. y *M. Kriegeriana* Bres., que atacan a los sauces.

Reichert (13) cita la «antracnosis» como existente en Egipto sobre hojas de *Salix* sp. y sin dar la sintomatología, la refiere a *Marssonina Kriegeriana* (Bres.) Magn.

Fukushi (5) en el Japón supone que dicha especie sea la causante de los daños en *Salix purpurea* L. var. *angustifolia*, pero ni la describe ni tampoco ofrece ilustración alguna de la misma.

Murray (12) al ocuparse de varias enfermedades de los sauces menciona la «antracnosis» del *Salix babylonica* L. y del *Salix fragilis* L., atribuyéndola a *M. salicicola* (Bres.) Magn. y proporciona una extensa descripción tanto de los síntomas como acerca del hongo causal.

Natgrass (13) trata detalladamente la «antracnosis» de los sauces, en Egipto y en Inglaterra, encontrando que el agente causal de la enfermedad en los sauces del primer país nombrado, concuerda con las características de *M. Kriegeriana* y el del segundo con las de *M. salicicola*.

MATERIAL Y MÉTODO

El material utilizado en esta investigación lo obtuve de sauces enfermos procedentes: *a*) de islas diversas ubicadas en el Delta; *b*) de las plantaciones pertenecientes a la Compañía Tajiber (Campana); *c*) de la Estación Experimental Provincial del Delta; *d*) del Jardín Botánico de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires y *e*) del Lazareto Cuarentenario de Plantas de José C. Paz, actualmente Manuel de Pinazo (F. C. N. G. S. Martín).

He comparado este material con los siguientes ejemplares de herbario: n° 19.235 LPS²: *Marssonina Kriegeriana* (Bres.) Magn. sobre *Salix*

¹ P. Magnus (8) en 1906 pasó el género *Marssonia* Fischer 1874 al de *Marssonina*, pues *Marssonia* había sido usado ya anteriormente como género de la familia de las Gesneriáceas.

² LPS: Herbario del Instituto de Botánica Spegazzini, Eva Perón, República Argentina.

sp. det. Solheim, ex «*Mycoflora Saximontanensis*» Exsiccata n° 487 (15).

n° 19.239 LPS: *Marssonina Kriegeriana* (Bres.) Magn. sobre *Salix exigua* Nutt. det. Solheim, ex «*Mycoflora Saximontanensis*» Exsiccata n° 293 (15).

n° 19.554 LPS: *Marssonina salicicola* (Bres.) Magn. sobre *Salix cinerea*, ex «F. Petrak, *Mycotheca generalis*» Exsiccata n° 109.

n° 19.555 LPS: *Marssonina Kriegeriana* (Bres.) Magn. sobre *Salix viminalis*, ex «F. Petrak, *Mycotheca generalis*» Exsiccata n° 1241.

Asimismo he examinado los especímenes —*Marssonina nigricans* Ell. et Ev.— clasificados por el profesor Ing. Agr. Juan B. Marchionatto, que se conservan bajo los n°s. 112, 1799 y 1933 en la colección de la División de Fitopatología del Instituto de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura de la Nación.

He examinado igualmente los cultivos puros de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola* provenientes del «Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn» (Holanda).

Para estudiar la histología de las hojas enfermas del sauce llorón, sauce-álamo y sauce «híbrido» y de las ramas enfermas del sauce-álamo, he observado al microscopio cortes de material fresco, como también, de material fijado en Carnoy Lebrun ¹ durante media hora, dejado 24 horas en alcohol de 95°, y luego cortado con micrótopo de congelación.

En el montaje de los cortes he utilizado el lacto-fenol, el azul de algodón y el tricolorante de Gueguén.

He realizado los dibujos con la cámara clara de Abbe, utilizando un juego de lentes Zeiss: ocular 10 x y objetivo 40 x.

HUÉSPEDES

En el presente trabajo me ocupo de las dos enfermedades en relación con el sauce-álamo o sauce «blanco» (*Salix alba* L. var. *coerulea* Koch), el sauce «híbrido» y el sauce llorón (*Salix babylonica* L.), que son las especies maderables de *Salix* más difundidas en el Delta.

La identificación botánica del sauce «híbrido» aún no ha sido establecida. Los isleños designan con este nombre a un sauce que «ofrece caracteres que parecen identificar como padres al «sauce blanco» y al criollo o colorado, que es nuestra especie indígena de sauce y se denomina *Salix humboldtiana* Wild» (2).

¹ La fórmula del fijador Carnoy-Lebrun es la siguiente: alcohol absoluto 10 cm³, ácido acético glacial 10 cm³, cloroformo 10 cm³ y bicloruro de mercurio hasta saturación.

TAXONOMÍA

He clasificado los agentes causales de las dos enfermedades de los sauces como *Marssonina Kriegeriana* (Bres.) Magn. y *Marssonina salicicola* (Bres.) Magn. Después de comparar los ejemplares de herbario citados en el capítulo: «Material y método», he llegado a esta conclusión, la cual he corroborado por el cotejo con los cultivos puros, como detallaré más adelante.

Esta es la primera vez que se determina *M. salicicola* en nuestro país.

El profesor Ing. Agr. Juan B. Marchionatto (9-10-11) menciona la especie *Marssonina nigricans* Ell. et Ev., con ciertas reservas en la determinación específica del parásito. Al examinar los especímenes de *M. nigricans*, ya enumerados y que pertenecen a la colección de la División de Fitopatología, comprobé que macro y microscópicamente coinciden con *M. Kriegeriana*.

Las fructificaciones de los dos hongos parásitos corresponden a típicas acérvulas, generalmente redondas. Al llegar a la madurez constan de una masa estromática de hifas, que ocupan las células epidérmicas, originando conidios sobre conidióforos muy cortos y en forma de maza. Miden entre 150 y 650 μ de diámetro.

Los conidios de *M. Kriegeriana* (Lámina n° 2 d) son hialinos, bicelulares, fusiformes y con ambas extremidades redondeadas, bastante curvos, con un tabique transversal, que separa la célula basal de la apical, resultando ésta de mayor tamaño que la anterior. Miden 16 a 18 μ de largo por 4 a 8 μ de ancho.

Los conidios de *M. salicicola* (Lámina n° 2 a-b-c) son hialinos, bicelulares, piriformes, ligeramente curvos y con un tabique transversal. Este separa el conidio en dos células, la basal y la apical, siendo esta última mucho más grande que la primera. Miden de 13 a 17 μ de largo por 4 a 7 μ de ancho. Son más o menos angostos en el punto de inserción y redondos y algo asimétricos cerca de la extremidad opuesta. Contienen por lo común una o más, grandes gotas de aceite.

SINTOMATOLOGÍA DE LAS DOS ENFERMEDADES

A. — SÍNTOMAS MACROSCÓPICOS

Las especies sauce-álamo y sauce llorón son atacadas por *M. salicicola* y el sauce «híbrido» por *M. Kriegeriana*.

En el sauce-álamo los ataques interesan las hojas y las ramas, mientras en el sauce llorón e «híbrido» solamente las hojas. Por esta razón en el sauce-álamo los daños son todavía mayores que en el sauce llorón y en

el «híbrido», pues no tan sólo se produce defoliación, sino también la muerte de las ramas con la consiguiente destrucción parcial de la planta en algunos casos.

Ambos hongos pueden asimismo determinar una marcadísima defoliación, cuando no total.

En las hojas:

M. Kriegeriana produce en la cara adaxial manchas pequeñas, de $\frac{1}{2}$ a 2 mm, de color morado muy oscuro y de bordes irregulares (Lámina n° 1, fig. A). Al confluir varias manchas, el aspecto irregular de las mismas se acentúa todavía más. Aunque esto es lo que más comúnmente sucede, algunas veces se encuentra también una que otra mancha con bordes redondos. En otoño se ven sobresalir pústulas pequeñas, convexas y luego achatadas, que netamente se destacan sobre el fondo morado intenso. Se trata de acérvulas maduras, cuyos conidios salen en forma de exudado blanco plateado.

En el envés de las hojas, en correspondencia con las manchitas del haz, se manifiesta un tinte rosado muy tenue, sobre el cual sobresalen unas pústulas blanquecinas, constituidas por las acérvulas llegadas a la madurez.

M. salicicola determina en la cara adaxial manchas de color violáceo, que tienen más o menos un milímetro de diámetro (Lámina n° 1, fig. B). En su parte central se van aclarando hasta tomar un tono blanco plateado. En esta parte más clara se forman las acérvulas. Los bordes de estas manchas son algo irregulares: una línea violácea intensa los constituye.

En el envés de las hojas y en correspondencia con las manchas del haz, suelen aparecer manchas con su parte central plateada y delimitada por una línea rojizo-violácea. También emergen algunas acérvulas de un color levemente pardusco. En la cara abaxial, sobre las nervaduras (lámina n° 1, fig. C), asimismo suelen notarse manchitas como las que termino de describir.

A ojo desnudo, las acérvulas se notan como diminutos puntos blancos, esparcidos sobre las manchas, o como un único punto, bien visible en el centro de la mancha.

En el caso, bastante raro, de que se manifiesten grandes manchas solitarias, cuyo diámetro oscila alrededor de los 10 mm, se puede ver perfectamente, aun a simple vista, que las acérvulas están ubicadas más o menos concéntricamente.

En los pecíolos y en las ramas.

En las ramitas y en las ramas de sauce-álamo (Lámina n° 1, figs. D, E y F) y en los pecíolos de las hojas del sauce llorón, sauce-álamo y sauce «híbrido», *M. salicicola* produce manchas, cuyo color varía desde el gris hasta el castaño rojizo. En los pecíolos tienen un diámetro que oscila entre $\frac{1}{2}$ y 1 milímetro y en el centro, suelen ostentar una sola gran acérvula intensamente blanca. En las ramitas del año, por el contrario, las lesiones generalmente miden 3 a 5 milímetros. A veces, varias manchas crecen considerablemente fusionándose unas con otras, lo que determina lesiones muy anchas y muy profundas: verdaderos cancos. En otros casos presentan el aspecto de intumescencias, cuyo origen se reconoce con toda facilidad por estar presentes las acérvulas características. Comúnmente las lesiones, al comenzar su desarrollo, muestran un color negro con una o más protuberancias pequeñas en su parte central. Estas protuberancias están relacionadas con las fructificaciones o acérvulas inmaduras, recubiertas todavía por la epidermis, que al abrirse permite ver las acérvulas con la ayuda de una lente de aumento. Estas, llegadas a la madurez, ostentan sus conidios hialinos, que, debido a su extraordinaria abundancia, les confieren un tinte blanco plateado.

Por lo general, las lesiones se hallan preferentemente ubicadas en el punto de inserción de las ramas, pero también se encuentran en correspondencia con las yemas y en los entrenudos (lámina n° 1, figs. D y E). En algunos casos parecen lustrosas, debido a la exudación de goma que las acompaña, lo que se manifiesta preferentemente los días de lluvia, pues el agua, al embeber el exudado gomoso, lo ablanda.

B. — SÍNTOMAS MICROSCÓPICOS

En las ramas.

Al montar los cortes, en lacto-fenol, de ramas enfermas provenientes de sauce-álamo, se destacan netamente, entre las células aparentemente normales, otras células necrosadas, ya aisladas o ya agrupadas, que conservan perfectamente su forma y ofrecen un color pardo, más o menos uniforme en toda su superficie.

Al teñir dichos cortes con azul de algodón, he logrado evidenciar las acérvulas maduras y las jóvenes, las cuales igualmente toman muy bien el color azul. Asimismo he podido comprobar que el micelio, que es intercelular, está ubicado únicamente en las células más cercanas al cuerpo fructífero, es decir a las acérvulas.

Al utilizar el tricolorante de Gueguén he visto confirmada la observa-

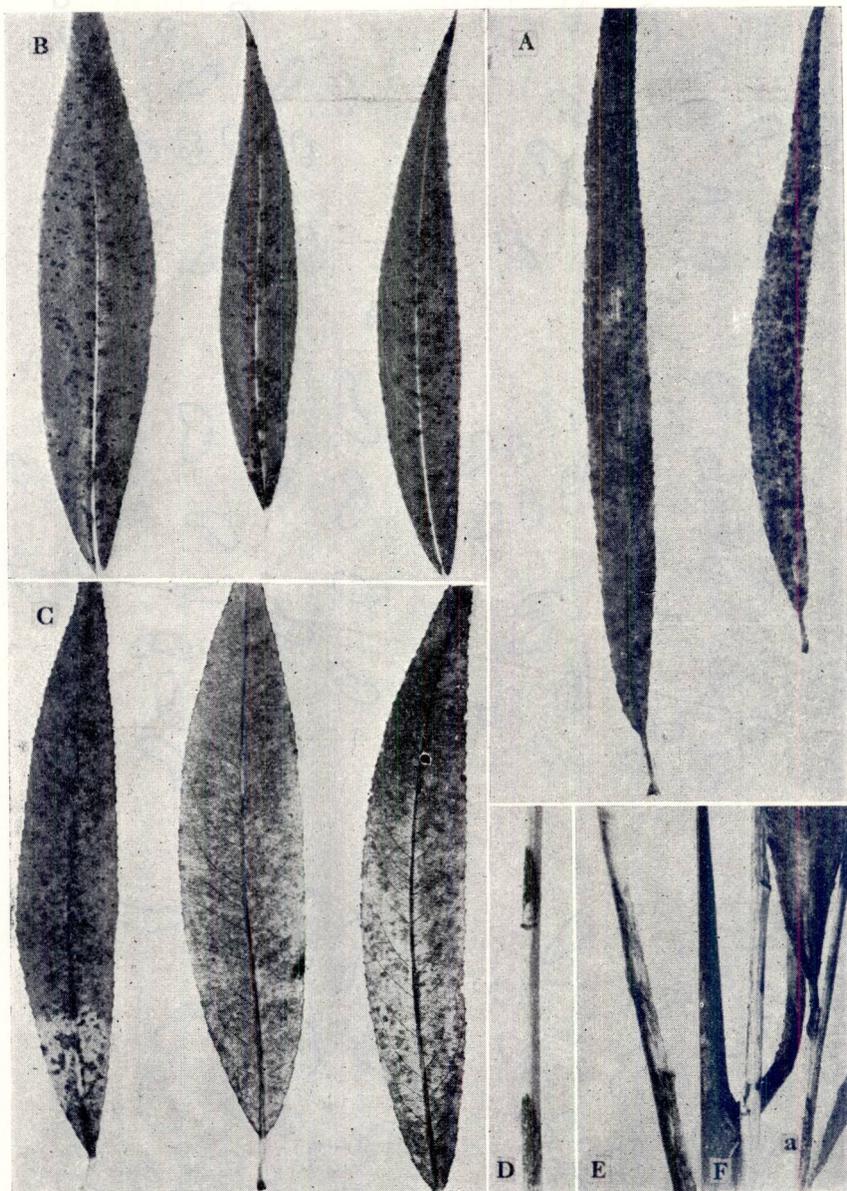


Lámina N° 1. — A - Manchas de *Marssonina Kriegeriana* en el haz de las hojas de sauce «híbrido». Tam. casi nat.; B - Manchas de *Marssonina salicicola* en el haz de las hojas de sauce llorón. Observar que el centro de las manchas es más claro que el borde. Tam. casi nat.; C - Manchas de *M. salicicola* en el envés de las hojas de sauce-álamo. Observar las manchas sobre la nervadura central. Tam. casi nat.; D - E - F - Manchas de *M. salicicola* en ramas de sauce-álamo. a) los puntos negros corresponden a las acérvulas.

(A - B - C - fotografías sacadas por el Laboratorio de Fotografías de la Facultad; D - E - F - originales de la autora).

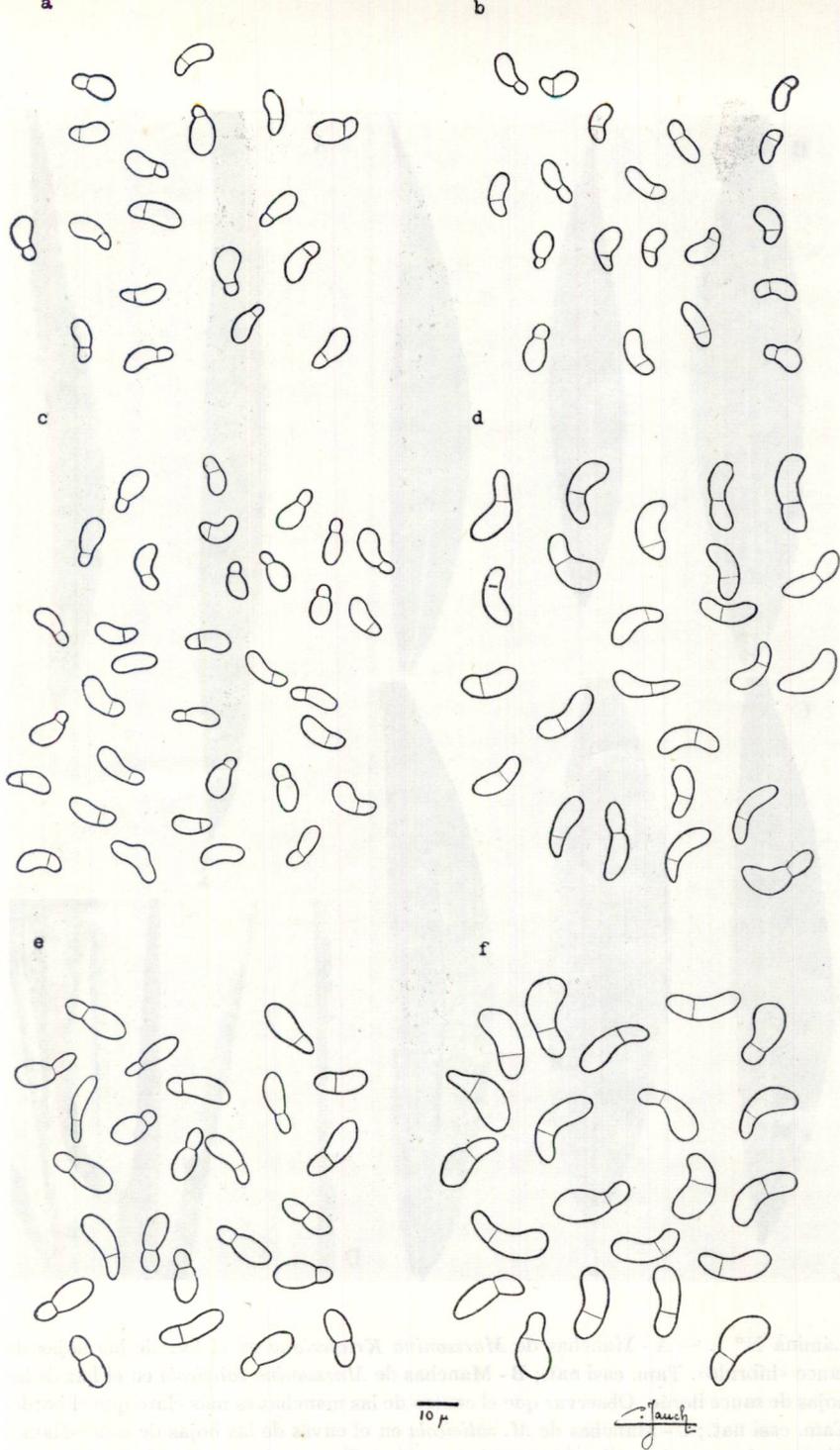


Lámina N° 2. — Conidios de acérvulas maduras (en agua) de: a) *Marssonina salicicola* de hojas de sauce-álamo; b) *Marssonina salicicola* de ramas de sauce-álamo; c) *Marssonina salicicola* de hojas de sauce llorón; d) *Marssonina Kriegeriana* de hojas de sauce «híbrido»; e) *Marssonina salicicola* de un cultivo en agar de papa glucosado a los 20 días; f) *Marssonina Kriegeriana* de un cultivo en agar de papa glucosado a los 20 días. (Dibujos con cámara clara de Abbe).

ción anterior. Además el uso de este colorante determina que la cutícula tome un color rojizo, debido a la presencia de yodo en su composición. Igualmente las células necrosadas se destacan con mayor nitidez.

En las hojas.

En las hojas enfermas pertenecientes al sauce llorón, sauce-álamo y sauce «híbrido», las células aparecen necrosadas en correspondencia con la mancha. No se encuentra micelio ni intracelular ni intercelular. Este sólo se advierte en la cutícula de las células epidérmicas, que rodean las acérvulas.

NOMBRES VULGARES DE LAS DOS ENFERMEDADES

Para diferenciar las dos enfermedades propongo se conserve el nombre vulgar de «antracnosis» para la enfermedad, cuyo agente etiológico es *M. salicicola*, y se adopte el de «mancha morada de la hoja» para la enfermedad debida a *M. Kriegeriana*. Elijo esta denominación por cuanto se trata del carácter macroscópico más evidente, como he descrito en el capítulo anterior.

AISLAMIENTOS Y CULTIVOS

He obtenido en cultivo puro los agentes causales de las dos enfermedades, aislándolos de hojas de sauce llorón y de sauce «híbrido», como así también de hojas y ramas de sauce-álamo. El material utilizado presentaba siempre lesiones típicas. En dichos aislamientos he conseguido dos tipos de colonias.

Al comparar macro y microscópicamente los cultivos puros de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola*, procedentes del «Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn» (Holanda) con las colonias por mí aisladas, he notado que coinciden entre sí. Así es que no sólo por la semejanza en las características macro y microscópicas con los ejemplares de herbario¹, que forman parte de la colección del Instituto de Botánica Spezzini, sino también por estas otras, resalta claramente que los hongos estudiados pertenecen a las especies *M. Kriegeriana* y *M. salicicola*.

En los aislamientos he logrado un resultado satisfactorio, suspendiendo en agua destilada y estéril los conidios de dichas especies patógenas, que con la ayuda de una lente de aumento, sacaba de las acérvulas, mediante una aguja esterilizada. A continuación colocaba la suspensión de los conidios en puntos aislados de una caja de Petri, que contenía agar de

¹ Ver los capítulos: «Material y método» y «Taxonomía».

papa glucosado o el medio sintético (3) siguiente: agar 20 g, glucosa 25 g, l. asparagina 2 g, fosfato monopotásico 1,5 g, extracto de levadura 2 g, sulfato de magnesio 1 g, tricloruro férrico 0,01 g, agua destilada 1000 cm³ ¹.

En los aislamientos el mejor resultado lo obtuve mediante diluciones sucesivas en cajas de Petri, o sea con el conocido corrientemente como «método de las placas» (7), con el cual, entre los 10 y 12 días, veía aparecer en las cajas de Petri colonias blanco-amarillentas, semejantes a colonias de bacterias, del tamaño de una pequeña cabeza de alfiler, las que siguieron creciendo muy lentamente. En la figura A de la lámina n° 3, se perciben tres de estas colonias desarrolladas en agar de papa glucosado. La primera tiene 15 días, la segunda, 30 y la tercera dos meses.

Cuando se trataba de material de sauce, cuyas manchas carecían de acérvulas, procedía a hacer cortes histológicos de las mismas y luego los colocaba en los medios de cultivo anteriormente citados.

Para obtener todos los aislamientos necesarios tuve que realizar numerosas pruebas, debido a las dificultades que se presentan al querer aislar estos parásitos.

Las colonias de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola* se caracterizan por tener un desarrollo sumamente lento, tanto en el comienzo del crecimiento como cuando ya está adelantado.

He logrado seguir perfectamente, desde las primeras fases, el desarrollo de los conidios, los cuales, recién a los cinco días, forman el micelio, que se puede ver en los dibujos de la figura n° 1. Es muy común observar también la formación de clamidosporos y apresorios. Macroscópicamente se aprecian pequeñas colonias blancas, sumamente tenues.

A fin de seguir la germinación de los conidios he utilizado dos métodos: el de las cámaras de Van Tieghem y el de la siembra en cajas de Petri con agar de papa glucosado al 1 % marcando, en el envés de la caja, el sitio exacto donde están ubicadas las suspensiones de los conidios que interesan. Con este último procedimiento obtuve mejor resultado que al utilizar las cámaras de Van Tieghem, en las cuales los conidios fueron colocados en caldo de papa glucosado al 1 %.

Las colonias están a menudo acompañadas por bacterias, de las que no es fácil librarse. El medio de cultivo sintético con extracto de levadura, citado en este capítulo, es el que me dió mejor resultado para evitar la contaminación bacteriana.

He estudiado el desarrollo de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola*, a la temperatura de 24° C., en los diez medios de cultivo siguientes: agar de

¹ Se esteriliza en autoclave a 115° C. durante 15 minutos.

papa glucosado al 1 %; mosto de malta agarizado; agar extracto de malta (Difco); agar extracto de malta según Nobles¹; agar harina de avena; agar nutritivo más 4 por mil de gelatina; Czapek agarizado²; Cohn aga-

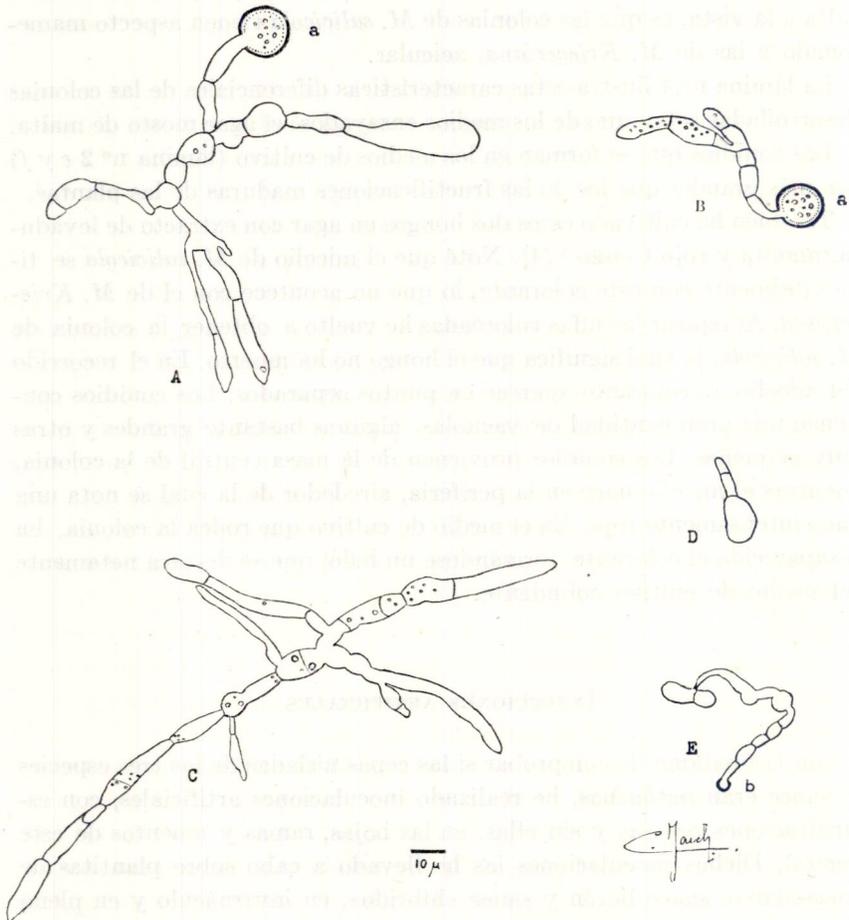


Fig. N° 1. — Conidios de *Marssonina Kriegeriana* (A) y de *Marssonina salicicola* (B, C, D, E) germinados sobre agar de papa glucosado más ácido láctico, colocado en cajas de Petri, a los 5 días de haber sido sembrados. (a) clamidosporos; (b) apresorio. Dibujos con cámara clara de Abbe.

¹ Agar extracto de malta, según Nobles: extracto de malta Difco 12,5 g, bacto-agar Difco 20 g, agua destilada 1000 cm³.

² Agar de Czapek: agar 15 g, nitrato de sodio 3 g, fosfato bipotásico 1 g, sulfato de magnesio 0,5 g, cloruro de potasio 0,5 g, sulfato ferroso 0,01 g, sacarosa 30 g, agua destilada 1000 cm³.

rizado al tartrato de amonio ¹; raíz de olivo agarizado y glucosado al 1 % y el medio sintético, que he detallado más arriba en este mismo capítulo.

He reunido las características que presentan las colonias en el cuadro n° 1. La característica diferencial más evidente, que inmediatamente salta a la vista, es que las colonias de *M. salicicola* tienen aspecto mameonado y las de *M. Kriegeriana*, acicular.

La lámina n° 4 ilustra estas características diferenciales de las colonias desarrolladas sobre uno de los medios ensayados: el agar mosto de malta.

Los conidios que se forman en los medios de cultivo (lámina n° 2 e y f) son más grandes que los de las fructificaciones maduras de las plantas.

También he cultivado estos dos hongos en agar con extracto de levadura, manita y rojo Congo ² (4). Noté que el micelio de *M. salicicola* se tiñe vitalmente con este colorante, lo que no acontece con el de *M. Kriegeriana*. Al repicar las hifas coloreadas he vuelto a obtener la colonia de *M. salicicola*, lo cual significa que el hongo no ha muerto. En el recorrido del micelio, el colorante aparece en puntos separados. Los conidios contienen una gran cantidad de vacuolas, algunas bastante grandes y otras muy pequeñas. Los conidios provienen de la masa central de la colonia, mientras el micelio nace en la periferia, alrededor de la cual se nota una línea intensamente roja. En el medio de cultivo que rodea la colonia, ha desaparecido el colorante, formándose un halo, que se destaca netamente del medio de cultivo colindante.

INFECCIONES ARTIFICIALES

Con la finalidad de comprobar si las cepas aisladas de las tres especies de sauce eran patógenas, he realizado inoculaciones artificiales, con escarificaciones previas y sin ellas, en las hojas, ramas y amentos de este vegetal. Dichas inoculaciones las he llevado a cabo sobre plantitas de sauce-álamo, sauce llorón y sauce «híbrido», en invernáculo y en pleno campo, como así también en laboratorio en ramitas de sauce enraizadas, colocadas en Erlenmeyer, que contenían solución de Knop. He utilizado,

¹ Medio al tartrato de amonio de Cohn: agar 20 g, fosfato monopotásico 5 g, fosfato de calcio 0,5 g, sulfato de magnesio 5 g, tartrato de amonio 10 g, cloruro de potasio 0,5 g, agua destilada 1000 cm³.

² Agar con extracto de levadura, manita y rojo Congo: agar 15 g, manita 10 g, fosfato hipotásico 0,5 g, sulfato de magnesio 0,2 g, cloruro de sodio 0,1 g, carbonato de calcio 3 g, agua de levadura 100 cm³, solución acuosa 1 en 400 de rojo Congo 10 cm³, agua destilada 900 cm³.

CUADRO N.º 1

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS COLONIAS DE MARSSONINA KRIEGERIANA Y DE MARSSONINA SALICICOLA ¹

	<i>Mosto de malta agarizado</i>			<i>Agar de papa glucosado 1 %</i>		
	<i>Color</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Tam. mm.</i>	<i>Color</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Tam. mm.</i>
<i>M. Kriegeriana</i>	Cream-Buff ²	acicular	17	Cream-Buff	acicular	17
<i>M. salicicola</i>	Isabella Color	mamelonado	15	centro: Isabella Color periferia: Cream-Buff	mamelonado	13
	<i>Agar extracto de malta (Difco)</i>			<i>Agar extracto de malta según Nobles</i>		
	<i>Color</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Tam. mm.</i>	<i>Color</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Tam. mm.</i>
<i>M. Kriegeriana</i>	Honey Yellow	acicular	14	Chamois	acicular	6
<i>M. salicicola</i>	Chamois	mamelonado	11	centro: Olive-gray periferia: Chamois	mamelonado	12
	<i>Agar nutritivo más 4 ‰ de gelatina pH = 7</i>			<i>Agar harina de avena</i>		
	<i>Color</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Tam. mm.</i>	<i>Color</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Tam. mm.</i>
<i>M. Kriegeriana</i>	blanquecino	Esférico y con corto micelio envolvente	3	blanquecino	Sólo escaso micelio en bordes de colonia	7
<i>M. salicicola</i>	No hay desarrollo		0	centro: Olive-gray periferia: Chamois	mamelonado	10
	<i>Czapek agarizado</i>			<i>Medio sintético con extracto de levadura</i>		
	<i>Color</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Tam. mm.</i>	<i>Color</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Tam. mm.</i>
<i>M. Kriegeriana</i>	No hay desarrollo		0	Cream-Buff	acicular	13
<i>M. salicicola</i>	blanquecino	Micelio apenas perceptible en la periferia del repicaje	8	Isabella Color	mamelonado	16
	<i>Cohn agarizado al tartrato de amonio</i>			<i>Raíz de olivo agarizado y glucosado al 1 %</i>		
	<i>Color</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Tam. mm.</i>	<i>Color</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Tam. mm.</i>
<i>M. Kriegeriana</i>	No hay desarrollo		0	No hay desarrollo		0
<i>M. salicicola</i>	id		id	id		id

¹ Las colonias se desarrollaron a 24° C.

² Se siguió, para designar el color de las colonias, al tratado de:

Ridgway, R. 1912. Color standards and color nomenclature. Washington, D. C.

como inóculo, suspensiones de conidios en agua destilada y estéril y trocitos de colonia, que envolvía con un algodón húmedo.

En hojas y amentos de las tres especies de sauce, dieron resultado positivo las inoculaciones de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola*.

En ramas de sauce-álamo, dió únicamente resultado positivo la inoculación de *M. salicicola*.

En ramas de los sauces «híbrido» y llorón, ninguna inoculación dió resultado.

Las inoculaciones positivas citadas se lograron también sin escarificar previamente, comprobándose así que no se trata de parásitos de heridas.

En todas las pruebas, sea en las inoculaciones de laboratorio como en las de invernáculo y de campo, he dejado siempre testigos, con y sin escarificaciones, según fuera el caso.

Puesto que se trata de parásitos, que resultan favorecidos por la humedad elevada, he efectuado las inoculaciones, colocando los Erlenmeyer con las ramitas y las hojas bajo una cámara de vidrio, que contenía varios recipientes con agua; en cuanto a las ramitas con hojas y con amentos, sea que pertenecieran a plantas de invernáculo o de campo, las he encerrado cuidadosamente en sobres de papel celofán, en cuyo fondo había colocado un algodón embebido en agua.

Las figuras B, C y D de la lámina n° 3 ilustran algunos de los resultados, que obtuve en dichas inoculaciones artificiales. En la figura B están representadas cuatro hojitas de sauce. Las dos primeras, con ataques muy intensos de *M. Kriegeriana*, muestran respectivamente la confluencia de varias manchas típicas y una mancha aislada, mientras la tercera y la cuarta hojita evidencian claramente el principio del ataque, caracterizado por pequeñas manchas que apenas alcanzan el tamaño de una cabeza de alfiler. Todas las manchas ostentan un color pardo bastante intenso, que en algunos casos llega casi al negro.

La figura C muestra sobre la ramita izquierda (a) una lesión de *M. salicicola*, que se manifiesta en forma de mancha, que rodea el tallito y su color es pardo rojizo. La pequeña rama, que se nota a la derecha (b) es la testigo, o sea la rama que, en ausencia del hongo, fué sometida al mismo tratamiento de la izquierda. El tratamiento consistió primero en colocar las pequeñas ramas en Erlenmeyer con solución de Knop, con lo que resultó más favorecido el desarrollo radicular y el de las hojas; después en instalar en un punto de la ramita izquierda un trocito de colonia constituida por abundantes esporos y por micelio, rodeando el todo con un pequeño algodón mojado. Procedí de idéntica manera con la ramita derecha, aunque naturalmente sin colocar el hongo. La mancha que se ve y mide 7 milímetros se formó en quince días.

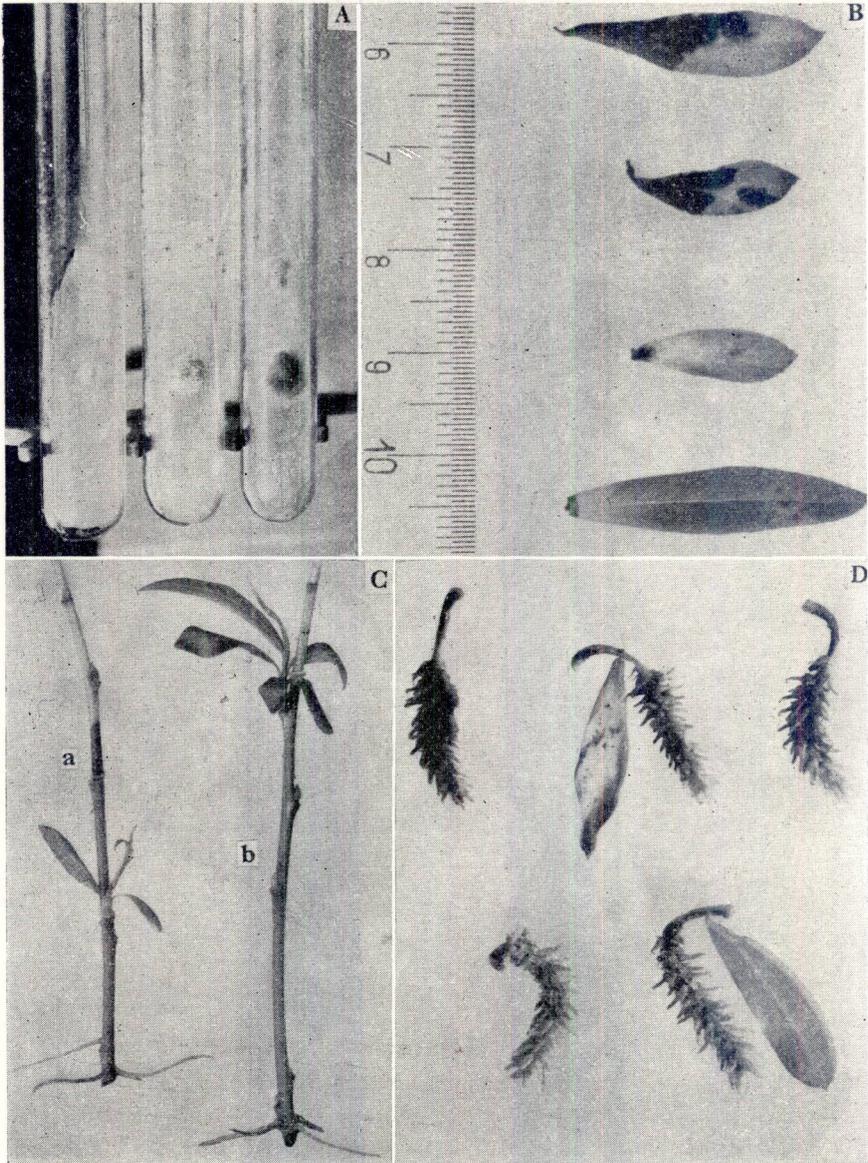


Lámina N° 3. — A - Cultivo de *Marssonina salicicola* en agar de papa glucosado a 24° C.: el primero tiene 15 días, el segundo un mes y el tercero dos meses. x 2/3; B - Hojas de sauce llorón infectadas artificialmente con *Marssonina Kriegeriana*; C - Pequeñas estacas de sauce-álamo: a) infectada artificialmente con *M. salicicola*, b) testigo. Tam. nat.; D - Amentos de sauce llorón: los tres superiores han sido infectados artificialmente con *M. salicicola* y los dos inferiores son los testigos. Tam. nat. (Fotografías originales de la autora).

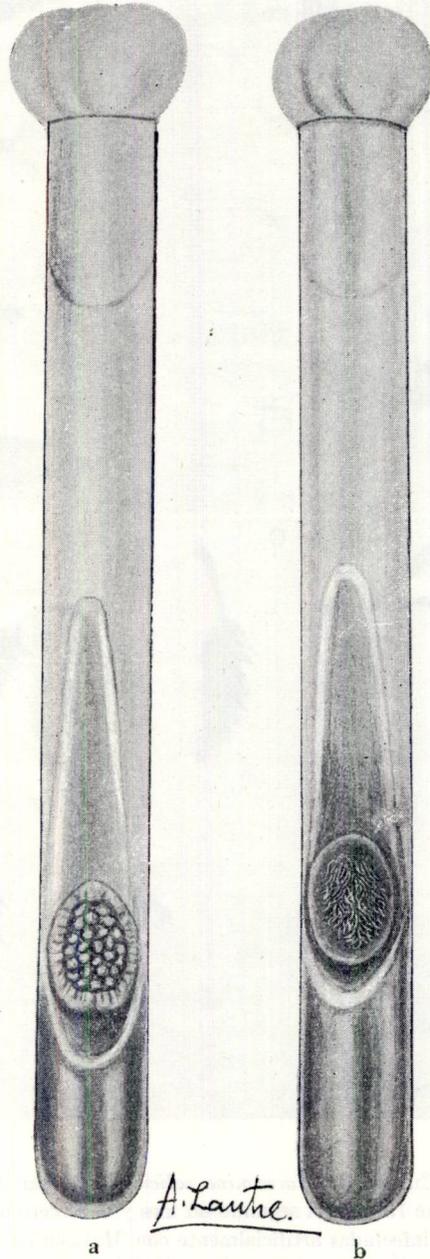


Lámina N° 4. — Cultivos en agar mosto de malta a 24° C., de dos meses, de *Marssonina salicicola* (tubo a) y de *Marssonina Kriegeriana* (tubo b). Observar el aspecto mamelonado, que ofrece la colonia de *M. salicicola* y la forma acicular de la colonia de *M. Kriegeriana*.

En la figura D se distinguen cinco amentos. Los tres superiores, que han sido inoculados con *M. salicicola*, revelan claramente que están atacados, mientras los dos inferiores están sanos: son los testigos. Las manchas aparecen indefinidas sobre los amentos. En esta fotografía se puede asimismo advertir una hoja sana y otra con principio de ataque, constituido por varias manchitas aisladas.

Cumplí con los postulados de Koch, para lo cual una vez comprobada la patogenicidad de *M. Kriegeriana* y la de *M. salicicola*, llevé a cabo los aislamientos correspondientes y la comparación de las cepas reaisladas con la cepa original.

ESTUDIO DE LAS TOXINAS

Hice desarrollar cultivos monospóricos de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola* en dos medios sintéticos: uno es el de Richard, el otro es el que figura en el capítulo «Aislamientos y cultivos», que en lo sucesivo indicaré con el nombre de medio sintético con extracto de levadura.

Elegí estos dos medios para cultivar ambas *Marssonina*, después de haber comprobado que tanto las pequeñas ramas de sauce como las plantitas de tomate, colocadas en ellos, conservan durante varios días un aspecto lozano. Realicé estos ensayos también con tomate, pues este vegetal ha demostrado ser muy sensible a la acción de las toxinas de varios hongos, de acuerdo a los hallazgos de otros investigadores.

Al sembrar estos medios de cultivo con esporos, obtuve un desarrollo más abundante que al usar micelio. He utilizado para estas siembras Er-lenmeyer de 250 cm³ de capacidad, a razón de 75 cm³ de medio en cada uno.

Mientras en el líquido de Richard los dos hongos desarrollan muy poco, en el medio sintético con extracto de levadura crecen vigorosamente y producen numerosas colonias de color grisáceo, cuyo diámetro es de, más o menos, medio centímetro.

Dejé desarrollar *M. Kriegeriana* y *M. salicicola* a la temperatura de 24° C. durante 15 días, un mes, un mes y medio y dos meses. Terminado el tiempo de desarrollo extraía, por decantación, el medio de cultivo, en el que había crecido el hongo, lo filtraba y centrifugaba durante 60 minutos, para asegurarme que no contenía ni esporos ni micelio. Luego lo llevaba al pH inicial, que es 5,2 para los dos medios. Hacía este reajuste de pH, a fin de evitar una interpretación equivocada, en el sentido de estimar que las posibles alteraciones y deformaciones sufridas por las hojas, colocadas en dichos medios de cultivo, fueran debidas a una variación del pH (alcalino o ácido) y no a la acción de la toxina.

Efectué cuatro ensayos para determinar si la edad de la colonia (de 15 días, un mes, un mes y medio y dos meses) influye en la producción de las toxinas.

Cada ensayo constaba de las 7 series de tubos siguientes:

- a) 16 tubos con agua destilada y esterilizada.
- b) id. con el medio de Richard.
- c) id. con el medio sintético con extracto de levadura.
- d) id. con el medio de Richard, en el que había desarrollado *M. Kriegeriana*, y cuyas operaciones de filtraje, centrifugación, ajuste de pH, etc., ya he enunciado.
- e) id. con el medio sintético con extracto de levadura, en el que había desarrollado *M. Kriegeriana*, y cuyas operaciones de filtraje, centrifugación, ajuste de pH, etc., he detallado más arriba.
- f) id. con el medio de Richard, en el que había desarrollado *M. salicicola*, y cuyas operaciones de filtraje, centrifugación, ajuste de pH, etc., he señalado precedentemente.
- g) id. con el medio sintético con extracto de levadura, en el que había desarrollado *M. salicicola*, y cuyas operaciones de filtraje, centrifugación, ajuste de pH, etc., he indicado anteriormente.

En cada serie de estos tubos puse 4 plantitas de tomate, 4 ramitas de sauce-álamo; 4 de sauce llorón y 4 de sauce «híbrido», de manera que en cada tubo había una planta o una ramita.

Hice crecer las plantas de tomate en arena para que al sacarlas de la maceta, no se dañaran los pelos absorbentes.

Durante los ensayos la temperatura osciló entre 20° y 25° C. Los tubos utilizados medían 2 cm de ancho por 15 cm de largo.

En todos los tubos, las ramitas de sauce y las plantitas de tomate presentan el mismo aspecto, o sea de ejemplares perfectamente lozanos. De esto se deduce que *M. Kriegeriana* y *M. salicicola* no producen toxinas ni en el medio de Richard, ni en el medio sintético con extracto de levadura y que la mayor edad del cultivo no facilita la formación de las toxinas.

CICLO BIOLÓGICO DE *M. Kriegeriana* Y DE *M. salicicola*

En otoño he colocado en pleno campo una chapa barrera, que delimitaba una parcela, en la que hice varias divisiones. En éstas ubiqué separadamente hojas y ramas de sauce llorón, sauce «híbrido» y sauce-álamo, que presentaban los síntomas característicos de las dos enfermedades.

Analizadas periódicamente las lesiones, pude comprobar que no hubo formación de fructificaciones sexuales (16), encontrando únicamente acérvulas de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola*. He realizado las últimas observaciones de este material en los meses de verano, de manera que ambos hongos tuvieron el tiempo necesario para completar su ciclo biológico.

Agradecimientos.

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento al señor Ing. Agr. Juan B. Marchionatto, profesor titular de la Cátedra, por las observaciones y críticas hechas durante la realización de este trabajo, al señor Ing. Agr. profesor Juan C. Lindquist, por haberme facilitado en préstamo los ejemplares de herbario pertenecientes al Instituto de Botánica Spegazzini y al señor Ing. Agr. Manuel V. Fernández Valiela, por el material de sauce remitido.

CONCLUSIONES

1. — En el presente trabajo se llega a la conclusión que lo que se conoce en la Argentina con el nombre vulgar de «antracnosis» de los sauces se refiere en realidad, a dos enfermedades distintas provocadas por dos diferentes parásitos: *Marssonina Kriegeriana* (Bres.) Magn. y *Marssonina salicicola* (Bres.) Magn.

2. — Se consigna por primera vez para el país la presencia de *M. salicicola*.

3. — Se comprueba que *M. Kriegeriana* ataca al sauce «híbrido» y *M. salicicola* al sauce-álamo (*Salix alba* L. var. *coerulea* Koch) y al sauce llorón (*Salix babylonica* L.). En el sauce-álamo los ataques interesan las hojas y las ramas, mientras en el sauce llorón e «híbrido» solamente las hojas. Por esta razón en el sauce-álamo los daños son todavía mayores que en el sauce llorón y en el «híbrido», pues no tan sólo se produce defoliación, sino también la muerte de las ramas con la consiguiente destrucción parcial de la planta en algunos casos.

4. — En las hojas y en los amentos de todas las especies de sauce estudiadas (sauce-álamo, sauce llorón y sauce «híbrido») se lograron reproducir experimentalmente los síntomas característicos de las dos enfermedades. En cuanto a las ramas, sólo se consiguieron inoculaciones positivas con *M. salicicola* y únicamente en sauce-álamo, coincidiendo así lo obtenido en las infecciones artificiales con lo que acontece en la naturaleza.

5. — Se verifica que en las hojas, los micelios de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola* se encuentran solamente en la cutícula de las células epi-

dérmicas, que rodean las acérvulas, mientras que, en las ramas, el micelio de *M. salicicola* se halla ubicado únicamente en las células más cercanas a las acérvulas. Además, tanto en las ramas como en las hojas atacadas, se observa necrosis de las células colindantes.

6. — Se experimenta notable dificultad para aislar ambos parásitos en cultivo puro; el mejor resultado se obtiene con el «método de las placas».

7. — Se comprueba que las colonias de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola* tienen un desarrollo sumamente lento, tanto al comienzo del mismo como en todo el crecimiento posterior.

8. — Se llega a la conclusión que el medio más adecuado para el desarrollo de estos hongos es el medio sintético a base de 25 g de glucosa, 2 g de l. asparagina, 1,5 g de fosfato monopotásico, 2 g de extracto de levadura, 1 g de sulfato de magnesio, 0,01 g de tricloruro de hierro y 1.000 cm³ de agua destilada. En este medio crecen con mayor rapidez y exuberancia que en los medios de cultivo siguientes: agar de papa glucosado al 1%; mosto de malta agarizado; agar extracto de malta (Difco); agar extracto de malta según Nobles; agar harina de avena; agar nutritivo más 4 por mil de gelatina y Czapek agarizado.

9. — Se nota que en todos los medios citados anteriormente, las colonias de *M. salicicola* tienen aspecto mamelonado, diferenciándose netamente de las de *M. Kriegeriana*, que presentan una forma acicular.

10. — Se observa que las colonias de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola* están a menudo acompañadas por bacterias, de las que no es fácil librarse. El medio de cultivo sintético, citado al comienzo del apartado 8, es el que dió mejor resultado para evitar el desarrollo bacteriano.

11. — Cabe puntualizar que *M. salicicola* asimila el colorante vital rojo Congo agregado al medio de cultivo, mientras *M. Kriegeriana* no se tiñe vitalmente con este colorante.

12. — Debe destacarse que no se trata de parásitos de heridas, pues se logró reproducir los síntomas en las hojas, ramas y amentos, también sin la previa escarificación de los mismos.

13. — Se determina que no hay producción de toxinas por parte de ambas *Marssonina*, ni en Richard, ni en el medio sintético a base de glucosa, l. asparagina, fosfato monopotásico, extracto de levadura, sulfato de magnesio, tricloruro de hierro y agua destilada, comprobándose asimismo que la mayor edad del cultivo no facilita la formación de toxinas.

RESUMEN

Este trabajo trata de dos graves enfermedades de los sauzales del Delta. Se encara dicho estudio en relación con las especies maderables de

sauce, que se encuentran en el Delta del río Paraná, abarcando una extensión aproximada de 50.000 hectáreas con más de 90 millones de ejemplares. Las especies consideradas son el sauce-álamo (*Salix alba* L. var. *coerulea* Koch), el sauce llorón (*Salix babylonica* L.) y el sauce «híbrido».

Se comprueba que en la Argentina con el mismo nombre vulgar de «antracnosis» figuran dos enfermedades distintas, cuyos agentes causales son *Marssonina Kriegeriana* (Bres.) Magn. y *Marssonina salicicola* (Bres.) Magn.

Con el objeto de diferenciar las dos enfermedades, se propone adoptar el nombre vulgar de «mancha morada de la hoja» para designar la enfermedad, cuyo agente causal es *M. Kriegeriana* y conservar el de «antracnosis» para la enfermedad debida a *M. salicicola*.

Se describen las características microscópicas de los hongos parásitos y la sintomatología macro y microscópica de las dos enfermedades.

En las hojas de todas las especies de sauce estudiadas aparecen las manchas típicas de las dos *Marssonina*, mientras sólo en las ramas del sauce-álamo se aprecian lesiones, a veces verdaderos canchales, producidas por *M. salicicola*. Las lesiones se hallan ubicadas preferentemente en el punto de inserción de las ramas, pero también se encuentran en correspondencia con las yemas y en los entrenudos.

M. Kriegeriana ataca al sauce «híbrido», mientras que *M. salicicola* al sauce llorón y al sauce-álamo.

Se describen los métodos utilizados para obtener en cultivo puro ambos hongos parásitos, siendo el conocido corrientemente como «método de las placas» el que dió mejor resultado.

Se compendian en un cuadro las características principales (color, aspecto, tamaño) de ambas *Marssonina* en diez diferentes medios de cultivo. La característica diferencial más notable es que las colonias de *M. salicicola* tienen aspecto mamelonado y las de *M. Kriegeriana*, acicular.

Al hacerlas desarrollar en agar con extracto de levadura, manita y rojo Congo, se pone de relieve otra característica diferencial de las dos *Marssonina*, consistente en que mientras el micelio de *M. salicicola* se tiñe vitalmente con rojo Congo, no acontece lo mismo con el de *M. Kriegeriana*.

Se obtienen infecciones experimentales mediante suspensiones de esporos en agua destilada y estéril o con pequeños trozos de colonias de *M. Kriegeriana* y de *M. salicicola* en hojas, ramas y amentos, con escarificaciones previas y sin ellas, detallándose la técnica seguida. Las inoculaciones se efectuaron en el laboratorio, sobre hojas y ramas de sauce enraiza-

das y colocadas en líquido de Knop, mientras en invernáculo y en pleno campo, se realizaron sobre plantas.

Se cumple con los postulados de Koch.

Se comprueba que *M. Kriegeriana* y *M. salicicola* no producen toxinas, haciendo desarrollar estos hongos durante 15 días, un mes, un mes y medio y dos meses en dos medios sintéticos, el de Richard y el medio sintético con extracto de levadura ya detallado en el trabajo.

Se hace un ensayo a campo con la finalidad de determinar el ciclo biológico de ambas *Marssonina*, obteniéndose sólo el estado asexual.

SUMMARY

This work deals with the two most serious diseases of the willow plantations in the Parana Delta. In order to distinguish between them it is proposed to adopt «mancha morada de la hoja» (i. e. purple leaf spot) as the name for the disease caused by *Marssonina Kriegeriana* and to reserve the name of «anthracnose» for that caused by *Marssonina salicicola*.

Descriptions are given of the microscopic characters of both parasites and the macro- and microscopic symptomatology of the diseases they cause. The methods adopted for obtaining both fungi in pure culture are given. *M. Kriegeriana* was found only on the leaves of the willow known locally as «híbrido» while *M. salicicola* attacks both leaves and branches of the weeping willow and «sauce-álamo».

The most important characteristics of the two species, including colour, size and appearance on different culture media are summarised. The most notable difference is that colonies of *M. salicicola* have a mammillated aspect while colonies of *M. Kriegeriana* are acicular.

It is shown that neither *M. Kriegeriana* nor *M. salicicola* produces toxin on Richard's medium or on the synthetic yeast extract medium described in the text.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeit behandelt die zwei wichtigeren Krankheiten der Weiden des Delta. Zu deren Unterscheidung wird vorgeschlagen den Namen «mancha morada de la hoja» für die Krankheit deren Agent *Marssonina Kriegeriana* ist, zu adoptieren und den Namen «antracnosis» für die von *Marssonina salicicola* verursachte Krankheit, beizubehalten.

Es werden die mikroskopischen Merkmale der parasitären Pilze und die für ihre Reinkulturen angewandten Methoden beschrieben, sowie die makro- und mikroskopische Symptomatologie der beiden Krankheiten.

Das verschiedene Verhalten der beiden Pilze wird dargelegt, indem

M. Kriegeriana nur die Blätter der Bastardweide angreift, während *M. salicicola* nur an de Trauer- und Pappelweide vorkommt, und zwar auch an den Zweigen.

Auf einer Tafel werden die hauptsächlichsten Kennzeichen (Farbe, Aussehen und Grösse) der beiden *Marssonina* aus zehn verschiedenen Kulturen zusammengestellt. Als bemerkenswertes Unterscheidungsmerkmal wird angegeben, dass die Kolonien von *M. salicicola* ein etwas warzenförmiges Aussehen haben, während die des *M. Kriegeriana* eine stachelförmige Bildung aufweisen.

Es wird in dieser Arbeit nachgewiesen, dass *M. Kriegeriana* und *M. salicicola*, weder an den Richardschen, noch an synthetischen Medien mit Hefeextrakt, Toxine erzeugen.

BIBLIOGRAFIA CITADA

1. ALLESCHER, A., 1903. *Rabenhorst's Kryptogamen Flora* 1. Die Pilze 7: 609.
 2. CORNELL, César, 1947. *El cultivo de los sauces en el Delta*. Almanaque Minist. Agric. Nación, págs. 73-78.
 3. FELDMAN, A. W., N. E. CAROSELLI and F. L. HOWARD, 1950. *Physiology of toxin production by Ceratostomella ulmi*. Phytopath. 40 (4): 341-54 (p. 341).
 4. FRED, E. B. and S. A. WAKSMAN, 1928. *Laboratory manual of general microbiology*. 145 page New York (p. 33).
 5. FUKUSHI, T., 1921. *A willow canker caused by Physalospora Miyabeana n. sp. and its conidial form Gloeosporium*. Ann. Phyt. Soc. Japan 1: 1-12.
 6. GROVE, W. B., 1937. *British stem- and leaf fungi (Coelomycetes)*. Cambridge, page 279-280.
 7. LABROUSSE, F., 1932. *Essais sur la technique bactériologique en pathologie végétale. Application à l'étude d'un certain nombre de maladies*. Ann. Epiphyties 18 (4): 317-339.
 8. MAGNUS, P., 1906. *Notwendige Umänderung des Namens der Pilzgattung Marssonina Fisch.* Hedw. 45: 88-91.
 9. MARCHIONATTO, Juan B., 1924. *Nueva contribución al conocimiento de los hongos parásitos de las plantas cultivadas*. Rev. Fac. Agr. La Plata 15: 7-21. (pág. 14).
 10. ——— 1944. *Manual de las enfermedades de las plantas*. 368 págs. ilus. (pág. 54-55), Buenos Aires.
 11. ——— 1948. *Tratado de fitopatología*. 537 págs. ilus. (pág. 133). Buenos Aires.
 12. MURRAY, B. J., 1926. *Three fungous diseases of Salix in New Zealand and some saprophytic fungi found on the same hosts*. Trans. New Zealand Inst. 56: 58-70.
 13. NATTRASS, R. M., 1930. *A note on two Marssonina diseases on willows*. Min. Agr., Egypt. (Plant Protect. Sect.) Bull. 99: 1-19, 18 pl.
 14. SACCARDO, P. A., 1895. *Sylloge fungorum* 11: 574-575.
 15. SOLHEIM, W. G., 1950. *Mycoflora saximontanensis exsiccata*. Centum V. Univ. Wy. Public. XV, 1: 1-27.
 16. VAN POETEREN, N., 1938. *Verslag over de werkzaamheden van den Plantenziektenkundigen Dienst in het jaar 1936. Verslag over de werkzaamheden van den Plantenziektenkundigen Dienst in het jaar 1937. (Reports on the work of the Phytopathological Service in the years 1936 and 1937)*. Versl. PIZiekt. Dienst Wageningen, 87, 84 pp., 4 pl., 1937; 89, 82 pp., 4 pl., 1938. De R. A. M. 18: 153-154, 1939.
- NOTA. — FERNÁNDEZ VALIELA, M. V., 1951. *Resumen de un estudio sobre el estado sanitario de los álamos del Delta*. Idia n^{ca}. 42-43: 1-3. Esta publicación, inherente también a los sauces, apareció pocos días después que fuera presentado este tercer trabajo de adscripción.