

## UNA ENFERMEDAD DE LA LECHUGA

PRODUCIDA POR «STEMPHYLIUM BOTRYOSUM» EN LA ARGENTINA

Por MARIA AMALIA R. DE SARASOLA <sup>1</sup> y ABEL A. SARASOLA <sup>2</sup>

En un almácigo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivado en la localidad de City Bell (provincia de Buenos Aires) fué observada a fines de invierno y principios de la primavera de 1956 una enfermedad que rápidamente se extendió a todas las plantas en forma simultánea con el milden (*Bremia lactucae*) para el cual se presentaron condiciones ambientales óptimas. Las características de la misma diferían de las de otras comunes en la zona tales como la bacteriosis (*Pseudomonas marginalis*) y septoriosis (*Septoria lactucae*). Las hojas inferiores de las plantas presentaban abundantes manchas redondeadas que ocasionaban su inutilización para el consumo y, las inmediatamente superiores, quedaban prácticamente desvalorizadas dado su intenso ataque. De las dos variedades allí existentes la denominada Gallega presentaba daños muy superiores a los observados sobre la Col de Nápoles.

Con el fin de averiguar la verdadera etiología de esta enfermedad el primero de los autores realizó los aislamientos de práctica en el laboratorio obteniendo de todas las lesiones un hongo cuya morfología corresponde a la especie *Stemphylium botryosum* Wallr. ya mencionada en otros países como agente de importantes pérdidas en esta

<sup>1</sup> Ayudante Técnica de Fitopatología en la Dirección de Defensa del Agro. Ministerio de Asuntos Agrarios. La Plata.

<sup>2</sup> Ingeniero Agrónomo, técnico en la misma Dirección y Profesor Adjunto de Fitopatología en la Facultad de Agronomía de La Plata. Trabajo realizado en los laboratorios de Fitopatología de ambas instituciones.

hortaliza. La gran difusión de las especies de este género, por lo común consideradas como saprófitos o parásitos poco agresivos, y la falta de un estudio en el país sobre esta enfermedad han estimulado la realización del presente trabajo.

#### ANTECEDENTES

Las referencias relacionadas con esta enfermedad y su agente etiológico tienen origen en la cita para Kentucky (EE. UU.) (1923) de *Macrosporium* sp. (*Stemphylium*) sobre semilla de lechuga. No obstante, el primer estudio que dió a conocer la verdadera relación existente entre un hongo de este género y la lechuga, fué el realizado por Ogilvie y Mulligan (1931) en el Oeste de Inglaterra, quienes describen una enfermedad causada por *M. sarcinula* (*S. botryosum*) en su forma asexual y *Pleospora herbarum* (Pers.) Rabenh. en la sexual, habiendo obtenido resultado positivo en infecciones artificiales.

Pocos años más tarde Dippenaar (1939) halló la forma imperfecta de este mismo patógeno sobre la citada hortaliza en Sud Africa, obteniendo el estado peritécico únicamente en medios de cultivo.

Groves y Skolko (1944) en Canadá aislaron de semillas de lechuga *S. botryosum* y *S. consortiale* (Thüm.) Groves et Skolko.

Es interesante consignar que Hendrix (1947) en las Islas Hawaii describió una enfermedad en este huésped, semejante a la que aquí se trata, debida probablemente a un *Stemphylium*, que en 1945 destruyó alrededor del 75 por ciento de los cultivos efectuados en las vecindades de Waimea.

En las proximidades de Rotterdam (Holanda) Goossens (1951) observó ataques leves de *P. herbarum* en plántulas de lechuga, alcanzando las infecciones, en un solo caso, al 70 por ciento del cultivo. Por su parte Pettinari (1953) describió en Italia un mal similar debido a *S. botryosum*, causando notables daños en las plantas.

Recientemente y por primera vez en América Padhi y Snyder (1954) encuentran esta enfermedad en el distrito de Colma, California (EE. UU.) realizando un acabado estudio sobre la misma, que les permitió establecer la especificidad del parásito para lechuga, habiendo propuesto las nuevas designaciones de *S. botryosum* f. *lactucum* Padhi et Snyder para el estado conídico y *P. herbarum* f. *lactucum* Padhi et Snyder en el caso del peritécico.

Todos estos antecedentes demuestran que se está en presencia de

un patógeno capaz de ocasionar serios inconvenientes en los cultivos hortícolas y justifican la presente exposición acerca de su hallazgo en nuestro país proporcionando, al mismo tiempo, la información necesaria para contribuir a su mejor conocimiento.

#### SINTOMATOLOGÍA

Ataca el follaje de las plantas predominando en las hojas inferiores las cuales se secan quedando a veces pendientes o sobre el terreno (Lámina I *a*). Las superiores tardan más en sufrir daños y éstos son de menor intensidad, pero paulatinamente el cultivo va decayendo hasta perder toda posibilidad de utilización.

Produce manchas foliares de forma redondeada o circular a veces con márgenes irregulares o angulosos, zonadas con áreas concéntricas de color castaño de distinta intensidad, siendo la parte central más clara, algo deprimida y delimitada por una línea oscura (Lám. I *b*). Pueden alcanzar hasta 5-7 mm de diámetro cuando llegan a completar su desarrollo, distribuyéndose sin orden sobre toda la lámina. En algunos casos se hacen confluentes o se disponen sobre nervaduras principales causando la muerte de los tejidos alimentados por las mismas. Excepcionalmente se hienden provocando rajaduras en su superficie necrosada. Las hojas enfermas pueden tornarse cloróticas.

No obstante el ambiente de humedad predominante cuando se realizaron las presentes observaciones no fué posible apreciar ninguna eflorescencia constituida por conidios en las áreas atacadas como mencionan otros autores en distintas partes del mundo, a pesar de haber realizado repetidos raspajes y cortes con ese fin.

#### EL PATÓGENO

Siguiendo los conceptos sobre el género *Stemphylium* vertidos por Wiltshire (1938) y Neergaard (1945) se ha logrado determinar que el parásito que causa esta enfermedad en Argentina es *S. botryosum* Wallr. que constituye el estado imperfecto de *Pleospora herbarum* (Pers.) Rabenh.

*Desarrollo en medios de cultivo.* — Se realizaron numerosos aislamientos en medios artificiales de cultivo obteniéndose constante-

mente *S. botryosum* y con mucha frecuencia acompañado por distintas especies pertenecientes al género *Alternaria*.

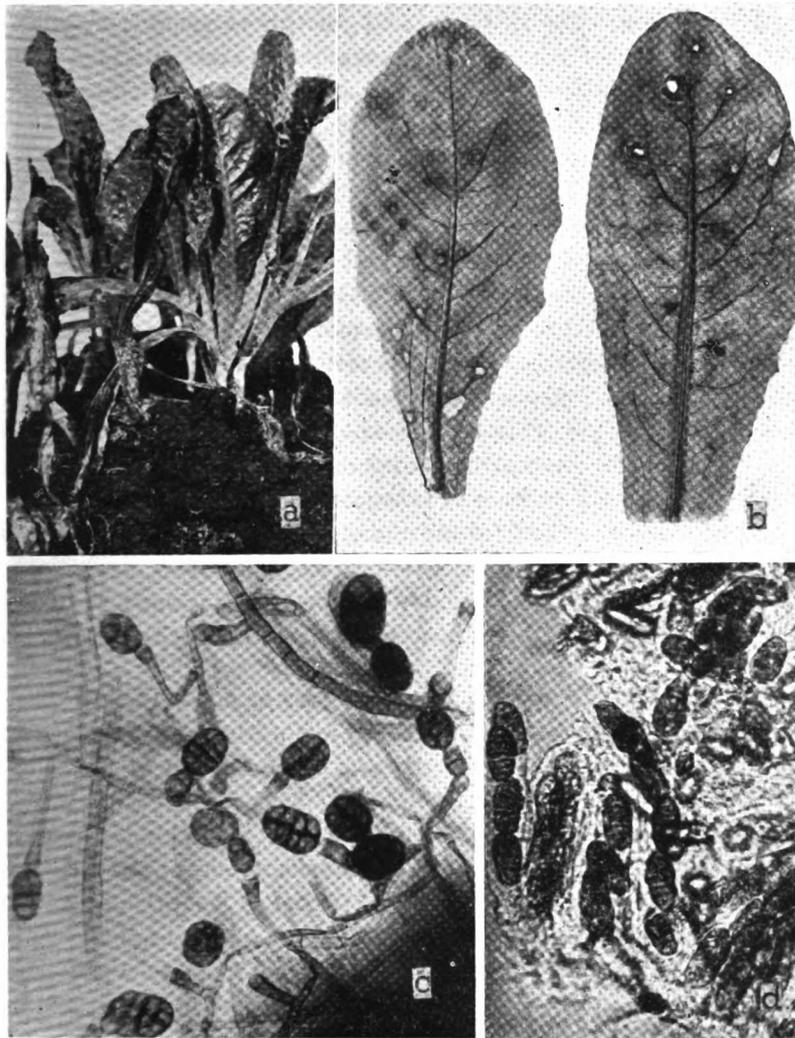
En cajas de Petri con agar agua se obtuvieron colonias muy tenues y escaso desarrollo externo, mientras que con agar papa glucosado las mismas presentaban micelio aéreo al principio blanquecino, después más pigmentado hasta color pardo oscuro. En estos medios se comprobó, a los varios días, la formación de esporos sarciniformes típicos de *S. botryosum* y peritecios dispuestos sin ningún orden. A los 54 días de efectuado el cultivo en agar papa glucosado, a temperatura de laboratorio (20-24°C), se observaron algunos peritecios con ascos y ascosporos maduros de *P. herbarum*, mientras la mayor parte permanecía aún al estado primordial. Los repiques en tubos mantuvieron estas mismas características.

En reislamientos de escarola en agar agua se observó la presencia de peritecios maduros a los 19 días.

*Patogenicidad.* — Empleando un cultivo de cinco semanas, en agar papa glucosado, se efectuó una suspensión de esporos y trozos de micelio en agua con la cual se realizaron inoculaciones artificiales en lechuga de las variedades Criolla de Verano, Romana y Col de Nápoles, escarola crespa (*Cichorium endivia*) y achicoria de cortar y de raíz (*C. intybus*). Se utilizaron cámaras húmedas constituidas por tubos de vidrio grandes con un algodón mojado en su interior los cuales fueron adaptados a las hojas inoculadas y testigos, de plantas sanas existentes en el campo, protegiéndolos con papel blanco para evitar recalentamientos por el sol. A los 8 días se hizo el examen del ensayo comprobando ataques en las 3 variedades de lechuga inoculadas que presentaban en general una clorosis acentuada además de lesiones necróticas. En escarola ocurrió el mismo fenómeno pero las lesiones eran muy pequeñas. La achicoria no denotó síntoma alguno de enfermedad.

Tanto de lechuga como de escarola, previa desinfección exterior, se practicaron reislamientos con resultado positivo de las lesiones necróticas y de las áreas cloróticas que no presentaban a la observación macroscópica tejidos muertos.

El mismo ensayo fué repetido con cultivos de 3 1/2 semanas en las variedades de lechuga citadas, eligiendo plantas sanas en el campo que fueron cubiertas con frascos a propósito, invertidos, luego de tratadas de acuerdo con la técnica descrita en las inoculaciones anteriores. Observados a los 5 días se comprobó la presencia de manchas en casi todos los inoculados. A los 12 días se dió por finalizada



a) Plantas de lechuga atacadas por *Stemphylium botryosum*. Nótese las hojas inferiores secas y caídas; b) Hojas con manchas típicas; c) Conidios y conidióforos del parásito  $\times 323$ ; d) Ascus y ascosporos de *Pleospora herbarum*,  $\times 33$ .



la prueba existiendo una marcada diferencia entre testigos e inoculados determinada por un aspecto clorótico y manchas típicas de la enfermedad en estos últimos. En algunas de estas lesiones pudo observarse la presencia de esporos de *S. botryosum* con sus característicos conidióforos. Es de hacer notar que en las infecciones positivas obtenidas hasta el presente, este hongo esporula escasamente en los casos en que esto ocurre y que el ataque siempre es más apreciable en las hojas inferiores.

También se insistió realizando nuevas inoculaciones sobre escarola de la variedad Hoja Crespa, con cultivos del parásito de 7 semanas, colocando las plantas testigos y tratadas en cámaras húmedas durante 48 horas y manteniéndolas con luz artificial hasta dar por finalizado el ensayo a las dos semanas. Durante el mismo la temperatura fluctuó entre 23 y 30°C. Se observaron manchas en las láminas y pecíolos de las hojas procediéndose a efectuar reaislamientos en los cuales fué identificado nuevamente el patógeno.

Debido a que en ambos huéspedes se notó un aspecto clorótico en las hojas inoculadas y sospechando que tal fenómeno podía ser debido a producción de toxinas, se prepararon filtrados de cultivos de este hongo, de 2 semanas, en solución de Czapek, que fueron probados con estacas de plántulas de tomate con resultado negativo.

**Morfología.** — En su estado asexual (*S. botryosum*) presenta conidióforos generalmente simples, pardos, septados, terminados en un abultamiento más oscuro en su parte inferior y más claro en la superior (Lám. Ic). Estos pueden ocurrir en número variado y dispuestos en forma sucesiva en los conidióforos de más edad. Llevan conidios solitarios por lo común cuadrados o rectangulares con ángulos redondeados, muriformes, constreñidos a nivel del tabique medio y espinulescentes. Este último carácter apareció más pronunciado en los esporos observados sobre lechuga inoculada que en los hallados sobre escarola siendo en medios de cultivo menos notable.

Las medidas fluctuaron de acuerdo con el substrato, como se indica a continuación:

| Substrato                                    | Largo de los esporos en $\mu$ | Ancho de los esporos en $\mu$ |
|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Agar papa glucosado al 2% en cajas de Petri. | 11,8-33,3                     | 9,2-25,9                      |
| Medio completo de cultivo <sup>1</sup> ..... | 11,1-33,3                     | 7,4-20,3                      |
| Lechuga Romana.....                          | 18,5-41,4                     | 11,1-22,2                     |
| Escarola de Hoja Ancha.....                  | 18,5-35,1                     | 11,1-18,5                     |

<sup>1</sup> Fórmula utilizada: Glucosa: 5 g; NO<sub>3</sub>K: 3,5 g; PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K: 1,75 g; SO<sub>4</sub>Mg: 0,75 g; agua destilada: 1 litro; agar: 15 g.

La forma sexual (*P. herbarum*) en agar papa glucosado al 2 por ciento se caracterizó por producir peritecios oscuros con ascos que contenían ascosporos cuyas medidas variaron entre  $16,6-37,0 \times 12,9-16,6 \mu$  (Lám. I d).

*Transmisión por «semilla»* (aquenios). — Se efectuaron ensayos para establecer si este parásito se transmite por la semilla, teniendo en cuenta que resultó nuevo para la zona y que los cultivos en que fué determinado por primera vez se hallaban alejados de otros de lechuga. Para ello se empleó la variedad Gallega tomándose dos porciones, una de las cuales fué infestada con esporos y restos de micelio de cultivos de *S. botryosum* de 4 meses, comprobándose luego, bajo el microscopio que los aquenios llevaban adheridos abundante inóculo antes de sembrarlos. La restante fué cultivada en calidad de testigo. Se utilizaron macetas que fueron esterilizadas, conjuntamente con la tierra, en horno, durante 1 hora. Las mismas luego de sembradas fueron cubiertas por una cámara de tela transparente (nylon) para evitar contaminaciones por el viento o los insectos, efectuando los riegos por inundación.

A los tres días se observaron sobre los cotiledones de algunas de las plántulas nacidas de las semillas infestadas, manchas pequeñas color castaño de las cuales fué reaislado el parásito en más del 50 por ciento de los casos, previa desinfección de las mismas con alcohol durante 10 segundos y bicloruro de mercurio al uno por mil 40 segundos. Las plántulas atacadas permanecieron menos desarrolladas que las sanas siendo, a veces, necesario separar el follaje para poder advertirlas. Las testigos no manifestaron en ningún caso la presencia del patógeno.

*Transmisión por suelo infestado.* — En el mismo terreno en que fué determinada la enfermedad el año anterior se efectuó una nueva siembra en 1957 con otra porción de la semilla no contaminada utilizada en el ensayo de transmisión que se detalla precedentemente. Durante el crecimiento de las plantas ocurrieron condiciones favorables al parásito notándose la presencia de manchas características en muchas de ellas, hecho que indica la posibilidad de que el mismo inverne en el suelo.

#### CONTROL

De acuerdo con la modalidad de *S. botryosum*, para prevenir sus ataques, convendría utilizar: 1° variedades resistentes; 2° terrenos

no infestados, o desinfestados previamente en el caso de haber soportado antes cultivos de lechuga atacada; 3°) emplear siempre semilla procedente de cultivos sanos, o desinfectada con productos apropiados.

Teniendo en cuenta los ensayos publicados por Dippenaar (*op. cit.*) podrían también efectuarse tratamientos preventivos a base de pulverizaciones o espolvoreos con distintos fungicidas comunes.

#### CONCLUSIONES

*Stemphylium botryosum* produce en la Argentina una enfermedad que podría ocasionar considerables pérdidas a los cultivadores de lechuga.

Padhi y Snyder (*op. cit.*) inocularon lechuga, alcaucil, alfalfa, gladiolo, remolacha azucarera, tallos y frutos de tomate, y zanahoria, con *S. botryosum* aislado de lechuga, obteniendo únicamente resultado francamente positivo sobre este huésped; por tal motivo establecen la especificidad del patógeno utilizado, proponiendo la designación de *S. botryosum f. lactucum* en su estado asexual y *Pleospora herbarum f. lactucum* en la sexual. Los autores, por su parte, inocularon lechuga, escarola y achicoria con aislamientos de lechuga, obteniendo éxito en las dos primeras hortalizas, hecho que sugiere la existencia de mayor número de especies susceptibles en condiciones apropiadas. En escarola no pudieron comprobar ataques en la naturaleza a través de numerosas observaciones, en cultivos que desarrollaban en parcelas próximas a otras de lechuga infectada.

Mediante el empleo de agar papa glucosado al 2 por ciento y agar agua pudo observarse, en el primero, un retardo en la maduración de los peritecios como el atribuido a la glucosa por Ellis (1931).

*S. botryosum* no produce toxinas que puedan ponerse en evidencia por la utilización de estacas jóvenes de tomate.

Se observó una influencia de los medios de cultivo empleados comparados con los substratos lechuga y escarola, en la reducción de las dimensiones mínimas de los conidios tal como puede verificarse en el cuadro incluido al hablar de morfología.

La enfermedad se transmite por semilla produciendo infecciones en las hojas cotiledonales desde donde se extiende al follaje a medida que éste va desarrollando. También puede invernar en terrenos que han soportado cultivos atacados. In vitro el causante mantuvo su

capacidad infectiva por lo menos hasta cuatro meses, siendo probable que ello ocurra por mayor tiempo.

**Resumen.** — Este trabajo trata de una enfermedad, aún no estudiada en la Argentina, aparecida en cultivos de lechuga en City Bell, Provincia de Buenos Aires, causada por *Stemphylium botryosum* Wallr. (= *Pleospora herbarum* (Pers.) Rabenh.). Analiza los antecedentes extranjeros, destacando la importancia que puede adquirir en condiciones favorables. El parásito produce manchas de 5-7 milímetros de diámetro, redondeadas o con márgenes irregulares, zonadas, con áreas concéntricas color castaño de distinta intensidad, con el centro más claro. Ataca preferentemente las hojas inferiores mientras las superiores permanecen menos infectadas. El cultivo va decayendo paulatinamente hasta su inutilización.

En agar papa glucosado y en agar agua se observaron las formas asexual y sexual del causante notándose, en este último medio, que los peritecios maduraron en menor tiempo.

Las inoculaciones efectuadas sobre lechuga (*Lactuca sativa*), escarola (*Cichorium endivia*), achicorias de cortar y de raíz (*C. intybus*) fueron positivas solamente en las dos primeras.

*S. botryosum* presenta conidióforos generalmente simples, pardos, septados, terminados en un abultamiento. Llevan conidios solitarios por lo común cuadrados o rectangulares con ángulos redondeados, muriformes, constreñidos a nivel del tabique medio y espinulescentes: miden tomados de lechuga  $18,5-41,4 \times 11,1-22,2 \mu$ . El tamaño de los ascosporos varió entre  $16,6-37,0 \times 12,9-16,6 \mu$ .

Se estableció su transmisión por semilla y por suelos infestados.

En condiciones naturales la variedad Col de Nápoles resultó menos atacada que la Gallega.

Como control se indica, usar variedades resistentes, semilla y suelo no contaminados o desinfectados, y pulverizaciones o espolvoreos preventivos.

**Summary.** — This paper deals with a disease, not yet studied in Argentina, found on lettuce crops at City Bell (Province of Buenos Aires) caused by *Stemphylium botryosum* Wallr. (= *Pleospora herbarum* (Pers.) Rabenh.).

It gives the foreign antecedents pointing out the importance that it may acquire under favorable conditions.

The parasite produces spots having 5-7 millimeters in diameter. They are round or with irregular margins, zoned, with brown of different intensity concentric areas and a clearer center. It generally attacks the lowest leaves while the youngest ones remain less infected. The crop gradually decays to become useless.

Potato dextrose agar and water agar colonies showed the asexual and sexual states and perithecia ripened in a shorter time in the last medium.

Inoculations made on lettuce (*Lactuca sativa*) and endive (*Cichorium endivia*) gave positive results and negative on chicories (*C. intybus*).

*S. botryosum* commonly presents simple, brown, septate conidiophores that end in a swelling. They carry solitary, muriform, espinulescent, commonly square or rectangular conidia with round angles and contracted at the level of the middle septum. On lettuce they measure  $18,5-41,4 \times 11,1-22,2 \mu$ . Ascospore measures vary between  $16,6-37,0 \times 12,9-16,6 \mu$ .

Seed and infested soil transmission were established. Under natural conditions Col de Nápoles variety resulted less attacked than the Gallega one.

Control measures recommended include resistant varieties, not contaminated or desinfested seed and soil, and preventive sprays and dustings.

#### BIBLIOGRAFÍA

- ANÓNIMO. 1923. *Thirty-fifth Annual Report of the Kentucky Agricultural Experiment Station for the year 1922*, 61 pp. (R. A. M. 3 : 194).
- DIPPENAAR, B. J. 1939. *Diseases of lettuce. I. Macrosporium leaf spot*. — *Farming in S. Africa*. 14 (156) : 101-103, 106, 3 figs. (R. A. M. 18 : 496).
- ELLIS, M. 1931. *Some experimental studies on Pleospora herbarum (Pers.) Rabenh.* — *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 16: 102-114.
- GOOSSENS, J. 1951. *Een bladolekkenziekte op jonge Slaplanten veroorzaakt door Pleospora herbarum (Pers.) Rabenh.* — *Tijdschr. PlZiekt.*, 57, 5 : 170-171, 1 fig. (R. A. M. 31 : 164).
- GROVES, J. W. and A. J. SKOLKO. 1944. *Notes on seed-borne fungi I. Stemphylium*. — *Canad. J. Res.*, Sect. C. XXII, 4 : 190-199, 5 pl. (R. A. M. 24 : 42).
- HENDRIX, J. W. 1947. in *Plant pathology, plant physiology, entomology, and vegetable crops*. — *Rep. Hawaii Agric. Exp. Sta.*, 1944-1946, pp. 67-145, 3 figs. (R. A. M. 26 : 535).
- NEERGAARD, P. 1945. *Danish species of Alternaria and Stemphylium. Taxonomy. Parasitism. Economical significance*. 560 pp., Copenhagen and London.
- OMELVIE, L. and B. O. MULLIGAN. 1931. *A leaf spot of lettuce due to Pleospora herbarum*. — *Gard. Chron.*, 89 (2298) : 35, 1 fig. (R. A. M. 10 : 430).
- PADHI, B. and W. C. SNYDER. 1954. *Stemphylium leaf spot of lettuce*. — *Phytopathology* 44 : 175-180.
- PETTINARI, CARLA. 1953. *Stemphylium botryosum Wallr. su foglie di lattuca*. — *Boll. Staz. Pat. Veg. Roma, Ser. 3*, 9 : 31-40, 5 figs.
- WILTSHIRE, S. P. 1933. *The original and modern conceptions of Stemphylium*. — *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 21 : 211-239.