



**Universidad Nacional de Quilmes**

**Doctorado en Ciencia y Tecnología**

**“Epidemiología, caracterización y control de  
*Stemphylium vesicarium*, agente causal de  
mancha marrón en perales”**

**Ing. Agr. Tudela Marisa Andrea Aluminé**



**Directora: Dra. Di Masi Susana Noemí**

**Co-directora: Dra. Pose, Graciela Noemí**

**Consejero: Dr. Alejandro Guillermo Pardo**

**Bernal, Buenos Aires, 2023**



El presente trabajo fue llevado a cabo en las instalaciones de la Estación Experimental Alto Valle de INTA, Río Negro, Argentina. El mismo se realizó en el marco de una beca doctoral INTA-CONICET (2017-2023) bajo la dirección de la Dra. Graciela N. Pose y la co-dirección de la Dra. Susana N. Di Masi.

***“Ten muy presente que tu enfoque determina tu realidad”***

M.Y.

***A mi padre, Jorge Alberto Tudela. Te llevo siempre en mi corazón.***



**Mis más sinceros agradecimientos:**

A INTA, CONICET, y a la Universidad Nacional de Quilmes, por hacer posible la ejecución de esta tesis doctoral.

A mis directoras Susana y Graciela, por guiarme por este camino con su sabiduría y experiencia, por su confianza en mí, y por su inestimable aporte científico y humano.

A mi consejero, Alejandro Pardo, por su activa predisposición.

A mi padre, quien me guía desde el cielo.

A mi familia, en especial a mi madre y hermano, quienes me acompañaron durante todo mi camino de formación.

A mis sobrinos, Victoria, Lucía, Francisco y Lourdes, que llenan mi vida de alegría.

A mi amor, Matías, por estar siempre a mi lado.

A mis amigas y compañeras Lola, Caro, Andre, Aye, Jose, gracias por su amistad incondicional.

A mis amigos Sabri, Cleo, Angie, Pablo, Marcos, y Vero. Gracias por ser mi refugio.

A Carolina Temperini, gracias por su amistad y toda su ayuda con metodología y escritura. Gracias por esas charlas lindas en el laboratorio, que amenizaron largas jornadas.

A Mariela Curetti, por su amistad, confianza, por haberme incentivado a seguir el camino de investigación y siempre estar ahí para darme un consejo.

A Gustavo Giménez, por su amistad y asesoramiento estadístico, de aporte muy valioso para el desarrollo de esta tesis.

A Cecilia Lutz, por su predisposición e invaluable aporte científico.

A Alicia Dobra, por estar siempre dispuesta a colaborar conmigo con toda su experiencia.

A la empresa Kleppe, sus ingenieros y personal de campo, por siempre estar comprometidos a colaborar con esta investigación.

A todas aquellas personas que, de alguna forma, contribuyeron con el desarrollo de esta tesis desde un aspecto tanto técnico o de acompañamiento humano: Jonathan Lago, Lucía Mañueco, Andrea Rodríguez, Darío Fernández, Samir Ahmad, Viviana López, Stella Ortiz y Liliana Alonso.

A todos aquellos que siempre estuvieron dispuestos a colaborar con su conocimiento, críticas constructivas y buenos consejos.

# ÍNDICE



## INDICE GENERAL

<b>INDICE GENERAL</b>	<b>13</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>19</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>22</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</b>	<b>27</b>
<b>RESUMEN. Epidemiología, caracterización y control de <i>Stemphylium vesicarium</i>, agente causal de “mancha marrón” en perales</b>	<b>29</b>
<b>ABSTRATC. Epidemiology, characterization and control of <i>Stemphylium vesicarium</i>, the causal agent of brown spot of pear</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>33</b>
<b>Área de estudio</b>	<b>35</b>
Ubicación y características edafo-climáticas del Alto Valle de Río Negro	35
La variabilidad agroclimática en el Alto Valle en las últimas décadas	37
La producción de frutales de pepita en la región	38
<b>Hospedante</b>	<b>39</b>
El cultivo del peral	39
Enfermedades fúngicas comunes en perales de la región	40
<b>El patógeno</b>	<b>43</b>
El género <i>Stemphylium</i>	43
<i>Stemphylium vesicarium</i>	44
<b>La enfermedad</b>	<b>45</b>
Importancia de la mancha marrón del peral en el mundo	45
Sintomatología	46
Ciclo de vida	47
Control	48
Situación de la mancha marrón del peral en la región	49
	13

<b>Bibliografía</b>	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO 2 : CARACTERIZACIÓN DE LA PATOLOGÍA, AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE CAUSAL</b>	<b>59</b>
<b>Introducción</b>	<b>61</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>62</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>62</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>63</b>
Descripción de la patología y colección de aislamientos	63
Obtención de cultivos monospóricos	63
Descripción morfológica y micro morfológica de los aislamientos	65
Identificación molecular	65
Patogenicidad en frutos	67
Crecimiento y esporulación en distintos medios de cultivo	70
<b>Resultados</b>	<b>71</b>
Descripción de la patología y colección de aislamientos	71
Descripción morfológica y micro morfológica de los aislamientos	73
Identificación molecular	75
Patogenicidad en frutos	77
Crecimiento y esporulación en distintos medios de cultivo	79
<b>Discusión</b>	<b>81</b>
<b>Conclusiones Parciales</b>	<b>83</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO 3 : ECO FISIOLÓGÍA DE <i>STEMPHYLIUM VESICARIUM</i></b>	<b>89</b>
<b>Introducción</b>	<b>91</b>
<b>Objetivos Generales</b>	<b>91</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>92</b>
	14

<b>Materiales y métodos</b>	<b>92</b>
Preparación del inóculo	92
Medio de cultivo	93
Inoculación e incubación	93
Determinación de germinación y medición de crecimiento	93
Procesamiento de datos	94
<b>Resultados</b>	<b>95</b>
Aislamiento SF23	95
Aislamiento SF20	97
Aislamiento SF8	99
<b>Discusión</b>	<b>104</b>
<b>Conclusiones Parciales</b>	<b>105</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>106</b>
<b>CAPÍTULO 4 : EPIDEMIOLOGÍA DE <i>STEMPHYLIUM VESICARIUM</i> EN EL ALTO VALLE DE RÍO NEGRO</b>	<b>107</b>
<b>Introducción</b>	<b>109</b>
<b>Objetivos generales</b>	<b>111</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>111</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>111</b>
Condiciones climáticas y desarrollo de la enfermedad	111
Seguimiento del desarrollo y maduración de las estructuras invernantes	113
Las malezas como fuente de inóculo	115
<b>Resultados</b>	<b>120</b>
Condiciones climáticas y desarrollo de la enfermedad	120
Desarrollo y maduración de las estructuras invernantes	125
Estudio de las malezas como fuente de inóculo	128
	15

<b>Discusión</b>	<b>133</b>
<b>Conclusiones parciales</b>	<b>136</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>137</b>
<b>CAPÍTULO 5 : CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA: AGRESIVIDAD DE LOS AISLAMIENTOS, FITOTOXICIDAD Y ZOO TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS FÚNGICOS</b>	<b>141</b>
<b>Introducción</b>	<b>143</b>
<b>Objetivos generales</b>	<b>144</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>145</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>145</b>
Bioensayos en hojas	145
Zootoxicidad sobre larvas de <i>Artemia salina</i>	149
<b>Resultados</b>	<b>151</b>
Bioensayos en hojas	151
Zoo toxicidad sobre larvas de <i>Artemia salina</i>	155
<b>Discusión</b>	<b>158</b>
<b>Conclusiones parciales</b>	<b>160</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>161</b>
<b>CAPÍTULO 6 : SUSCEPTIBILIDAD DE LAS PRINCIPALES VARIEDADES DE PERA CULTIVADAS EN EL ALTO VALLE A LA INFECCIÓN POR <i>STEMPHYLIUM VESICARIUM</i></b>	<b>167</b>
<b>Introducción</b>	<b>169</b>
<b>Objetivos generales</b>	<b>170</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>170</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>170</b>
Susceptibilidad natural de hojas y frutos	170
Susceptibilidad <i>in vitro</i> de los frutos	171
Susceptibilidad <i>in vitro</i> de las hojas	175
	16

<b>Resultados</b>	<b>177</b>
Susceptibilidad natural de hojas y frutos	177
Susceptibilidad de los frutos <i>in vitro</i>	179
Susceptibilidad de las hojas	185
<b>Discusión</b>	<b>187</b>
<b>Conclusiones parciales</b>	<b>189</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>191</b>
<b>CAPÍTULO 7 : DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE <i>STEMPHYLIUM VESICARIUM</i> A DISTINTOS FUNGICIDAS</b>	<b>193</b>
<b>Introducción</b>	<b>195</b>
<b>Objetivo general del capítulo</b>	<b>198</b>
<b>Objetivos específicos</b>	<b>198</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>198</b>
Patógeno	198
Fungicidas	198
Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de <i>S. vesicarium</i>	199
Inhibición <i>in vitro</i> de la germinación de esporas de <i>S. vesicarium</i>	201
Ensayo <i>in vitro</i> sobre frutos	201
Ensayos de control a campo	203
Diseño y análisis estadístico	203
<b>Resultados</b>	<b>204</b>
Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de <i>S. vesicarium</i>	204
Inhibición <i>in vitro</i> de la germinación de esporas de <i>S. vesicarium</i>	206
Ensayo <i>in vitro</i> sobre frutos	208
Ensayos a campo	212
<b>Discusión</b>	<b>213</b>
	17

<b>Conclusiones parciales</b>	<b>217</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>218</b>
<b>CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>221</b>
<b>PUBLICACIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>225</b>
<b>Presentaciones a congresos nacionales e internacionales</b>	<b>225</b>
<b>Publicaciones en revistas con referato internacional</b>	<b>225</b>
<b>Otras publicaciones</b>	<b>226</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>227</b>
Anexo I: Composición de medios de cultivo y soluciones	229
Anexo II: Geles, secuencias de genes y cromatogramas	233
Anexo III: Tablas de resultados	245
Anexo IV: Datos climatológicos	247

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Origen de los aislamientos de <i>S. vesicarium</i> obtenidos de las distintas localidades, variedades de pera, desde hojas o frutos. ....	72
Tabla 2.2: Características morfológicas conidiales según medio de cultivo. ....	74
Tabla 2.3: Información de origen geográfico, cronológico, origen vegetal, y códigos de acceso al GenBank de los aislamientos. ....	77
Tabla 2.4: Patogenicidad de las cepas de <i>S. vesicarium</i> sobre peras D'Anjou. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey. ....	79
Tabla 2.5: Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y producción de esporas de los aislamientos de <i>S. vesicarium</i> SF8, SF20 y SF23. Velocidad media, diámetro alcanzado a los 7 días de incubación y nivel de esporulación alcanzado en los distintos medios. ....	81
Tabla 3.1: Valores de actividad de agua de soluciones acuosas de glicerol a 25 °C.....	92
Tabla 3.2: Efecto de la temperatura y $a_w$ sobre el crecimiento del aislamiento SF23 de <i>S. vesicarium</i> : duración de la fase lag (tiempo transcurrido hasta la determinación de la germinación), y la velocidad media de crecimiento de las colonias. ....	95
Tabla 3.3: Efecto de la temperatura y $a_w$ sobre el crecimiento del aislamiento SF20 de <i>S. vesicarium</i> : duración de la fase lag (tiempo transcurrido hasta la determinación de la germinación, expresado en días), y la velocidad media de crecimiento de las colonias en mm/día.....	98
Tabla 3.4: Efecto de la temperatura y $a_w$ sobre el crecimiento del aislamiento SF8 de <i>S. vesicarium</i> : duración de la fase lag (tiempo transcurrido hasta la determinación de la germinación), y la velocidad media de crecimiento de las colonias. ....	100
Tabla 3.5: Colonias de <i>S. vesicarium</i> a los 12 días de incubación, bajo las distintas condiciones de temperatura y $a_w$ .....	102
Tabla 4.1: Abundancia de pseudotecios en hojas por temporada. ....	125
Tabla 4.2: Frecuencias de aislamiento de <i>S. vesicarium</i> en el muestreo de malezas a campo .....	128
Tabla 4.3: Conidios desarrollados en las hojas de malezas y de perales. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey. ....	130
Tabla 4.4: Pseudotecios desarrollados en hojas de malezas y de perales. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey. ...	131

Tabla 4.5: Patogenicidad sobre hojas de peral del aislamiento SF23 de <i>S. vesicarium</i> y de las cepas re-aisladas desde malezas. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey. ....	132
Tabla 5.1: Agresividad y toxicidad obtenidas para cada aislamiento en los cuatro cultivares de pera, donde A: Agresividad y T: Toxicidad. Los resultados se expresan de acuerdo con la escala establecida, la cual indica que los aislamientos que resultaron (-) y ( $\pm$ ) no son fitotóxicos/agresivos, (+) son levemente fitotóxicos/agresivos, y los (++) son moderadamente fitotóxicos/agresivos. ....	152
Tabla 5.2: Efecto tóxico de los extractos de <i>S. vesicarium</i> sobre larvas de Artemia salina. Clasificación según porcentaje de mortandad: No tóxicos (NT): 0-9%. Levemente tóxico (LT): 10-49%. Tóxico (T): 50-89% de mortandad. Muy tóxico (MT): >90%. ....	156
Tabla 6.1: Datos de incidencia de mancha marrón del peral para frutos y hojas de las variedades Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel durante cuatro temporadas. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey, anidado por temporada. ....	178
Tabla 6.2: Incidencia de la enfermedad (porcentaje de frutos afectados) y severidad (número de manchas por fruto en las cuatro variedades de pera en tres etapas de desarrollo: 1 = fruto joven; 2 = fruto de desarrollo medio; y 3 = fruto maduro. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí en la prueba de Tukey, anidado por repetición del ensayo. ....	182
Tabla 6.3: Severidad de la enfermedad (área media afectada de los frutos) en cuatro variedades de pera y tres momentos de desarrollo: 1 = fruto joven; 2 = fruto de desarrollo medio y 3 = fruto maduro. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey, anidado por variedad. ....	183
Tabla 6.4: Severidad de la enfermedad (diámetro de lesión) generada por la inoculación por herida en cuatro variedades de pera y tres momentos de desarrollo: 1 = fruto joven; 2 = fruto de desarrollo medio y 3 = fruto maduro. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey, anidado por variedad. .	185
Tabla 7.1: Formulación y concentraciones de los fungicidas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) utilizados en los ensayos de crecimiento micelial, germinación de conidios, inoculación de frutos <i>in vitro</i> y pruebas de control a campo. ....	200
Tabla 7.2: Concentración efectiva 50 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de los fungicidas para el crecimiento micelial y germinación de esporas de <i>S. vesicarium</i> . Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey .....	206

Tabla 7.3 : Eficacia de tratamientos preventivos en peras D'Anjou, aplicados 1, 7 y 15 días antes de la inoculación con la cepa SF23 de <i>S. vesicarium</i> . Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey, anidado por tiempo.....	209
Tabla 7.4: Eficacia de tratamientos curativos en peras D'Anjou, aplicados a las 24 horas después de la inoculación con la cepa <i>S. vesicarium</i> SF23. Las medias de severidad seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.....	211
Tabla 7.5: Eficacia de los fungicidas Bellis® y Ziram® aplicados en el campo durante dos temporadas para el control de mancha marrón del peral, en árboles del cv. D'Anjou. Las medias de incidencia seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey, anidado por temporada. ....	212

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Ubicación geográfica del Alto Valle de Río Negro, Argentina. _____	35
Figura 1.2: Principales variedades de pera cultivadas en el Alto Valle de Río Negro: Williams (A), Packham's (B), D'Anjou (C), y Abate Fetel (D). _____	41
Figura 1.3: Sarna del peral en hoja (a) y frutos (b) del cv. Williams. Pequeños frutos del cv. Packham's afectados por tizón (c). _____	43
Figura 1.4: Características microscópicas de <i>S. vesicarium</i> . Conidios de <i>S. vesicarium</i> (A: 100X, B: 1000X); pseudotecios y conidios de <i>S. vesicarium</i> (C: 40X); ascosporas de <i>S. vesicarium</i> que emergen de un pseudotecio maduro (D: 400X). _____	45
Figura 1.5: Síntomas de mancha marrón en perales. Síntomas en hojas y frutos del cv. Abate Fetel (A), caída natural de frutos del cv. Abate Fetel afectados por mancha marrón (B). Síntomas en hojas y frutos el cv. D'Anjou (C) y en frutos del cv. Packham's. _____	47
Figura 1.6: Ciclo de vida de <i>S. vesicarium</i> en el cultivo de peral. _____	48
Figura 2.1: Procedimiento de aislamiento de <i>S. vesicarium</i> desde fruto. Extracción de porciones de tejido de la zona de avance de la podredumbre, por medio de bisturí (A). Siembra de las porciones de tejido en placa con medio PDA (B). _____	64
Figura 2.2: Obtención de cultivo monospórico de <i>S. vesicarium</i> . Espora germinada (A). Colonia obtenida de una única espora (B). _____	64
Figura 2.3: Crecimiento de micelios de <i>S. vesicarium</i> en medio YES luego a las 96 horas. _____	65
Figura 2.4: Producción del inóculo de <i>S. vesicarium</i> en medio PDA con la técnica del montadientes. Placa recién sembrada (A). Placa de 15 días de incubación (B). _____	69
Figura 2.5: Inoculación de peras con inóculo de <i>S. vesicarium</i> utilizando la técnica del montadientes (A) e incubación (B). _____	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 2.6: Síntomas de mancha marrón registrados en frutos de las variedades Williams (A), Packham's (B), Abate Fetel (C) y D'Anjou (D). _____	71
Figura 2.7: Desarrollo de un aislamiento de <i>S. vesicarium</i> a 10 días de incubación, sobre medio PZA (A) y sobre medio V8 (B). _____	74
Figura 2.8: Conidios de <i>S. vesicarium</i> desarrollados en medio PZA, vista en lupa (A) y en microscopio (B). _____	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 2.8: Vista microscópica de un pseudotecio con ascas y ascosporas maduras. _____	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 2.10: Árbol filogenético de 21 cepas de <i>S. vesicarium</i> del Alto Valle de Río Negro, Argentina. _____	76

Figura 2.11 Porcentaje de aislamientos de <i>S. vesicarium</i> obtenidos de hojas y frutos que presentaron patogenicidad leve (lesiones menores a 15 mm de diámetro), moderada (de 15 a 25 mm) y grave (mayor a 25 mm).	78
Figura 2.12: Patogenicidad de las cepas SF24 (A), SL22 (B), y SF23 (C) de <i>S. vesicarium</i> inoculadas sobre peras D'Anjou e incubadas 10 días.	78
Figura 2.13: Crecimiento medio de los aislamientos SF8, SF20, y SF23 de <i>S. vesicarium</i> en los medios de cultivo AA, PDA, APP, PZA y V8 a lo largo de los 7 días de incubación.	80
Figura 3.1: Conidio germinado.	94
Figura 3.2: Velocidad media de crecimiento de la cepa SF23 en las distintas combinaciones de temperatura y $a_w$ evaluadas.	97
Figura 3.3: Velocidad media de crecimiento de la cepa SF20 en las distintas combinaciones de temperatura y $a_w$ evaluadas.	99
Figura 3.4: Velocidad media de crecimiento de la cepa SF8 en las distintas combinaciones de temperatura y $a_w$ evaluadas.	101
Figura 3.5: Velocidades medias de crecimiento, en cm/día para los tres aislamientos en las distintas condiciones de temperatura y $a_w$ .	103
Figura 4.1: Ubicación geográfica de las estaciones de monitoreo 1, 2, 3, y 4, y la estación agrometeorológica.	112
Figura 4.2: Seguimiento del desarrollo de las estructuras invernantes: bolsa con hojas de la variedad D'Anjou con síntomas de mancha marrón del peral, dispuesta en el interfilar.	114
Figura 4.3: Plantas inoculadas a campo con suspensión conidial de <i>S. vesicarium</i> y cubiertas con bolsa plástica por 48 horas.	117
Figura 4.4: Inoculación de hojas muertas de la variedad Packham's con suspensión conidial de <i>S. vesicarium</i> .	118
Figura 4.5: Producción de pseudotecios de <i>S. vesicarium</i> sobre <i>Festuca sp.</i>	119
Figura 4.6: Preparación del material para medición de conidios de <i>S. vesicarium</i> desarrollados en hojas de malezas y perales inoculados.	119
Figura 4.7: Condiciones climáticas de la temporada 2018/2019, número de horas de hoja mojada diarios (HHM), Temperatura media del período húmedo (Tmph, °C), Precipitación diaria (mm), Temperatura media diaria (Tmd, °C) y momento de detección de síntomas.	121
Figura 4.8: Condiciones climáticas de la temporada 2019/2020, número de horas de hoja mojada diarios (HHM), Temperatura media del período húmedo (Tmph, °C), Precipitación	

diaria (mm), Temperatura media diaria (Tmd, °C) y momento de detección de síntomas.	_____	122
Figura 4.9: Condiciones climáticas de la temporada 2020/2021, número de horas de hoja mojada diarios (HHM), Temperatura media del período húmedo (Tmph, °C), Precipitación diaria (mm), Temperatura media diaria (Tmd, °C) y momento de detección de síntomas.	_____	123
Figura 4.10: Condiciones climáticas de la temporada 2020/2021, número de horas de hoja mojada diarios (HHM), Temperatura media del período húmedo (Tmph, °C), Precipitación diaria (mm), Temperatura media diaria (Tmd, °C) y momento de detección de síntomas.	_____	124
Figura 4.11: Análisis de correlación entre la incidencia de mancha marrón del peral en hojas y frutos para el período 2017-2022 y las variables climáticas asociadas.	_____	125
Figura 4.12: Estadios de madurez de los pseudotecios (proporciones) según mes y año.	_____	127
Figura 4.13: Mancha necrótica en <i>Trifolium repens</i> .	_____	129
Figura 5.1: Hojas de peral dispuestas en cámara de flujo laminar, para su secado y posterior inoculación.	_____	145
Figura 5.2: Obtención de extractos crudos de <i>S. vesicarium</i> . Filtraciones.	_____	146
Figura 5.3: Test de agresividad. Inoculación de hojas con suspensión conidial de <i>S. vesicarium</i> .	_____	147
Figura 5.4: Test de fitotoxicidad. Inoculación de hojas de peral con extractos crudos de <i>S. vesicarium</i> .	_____	148
Figura 5.5: Procedimiento de obtención de extractos clorofórmicos. Colonia de <i>S. vesicarium</i> en medio DRYES (A). Extracción con cloroformo (B). Filtrado (C). Reconstitución del residuo (D).	_____	149
Figura 5.6: Agresividad de la suspensión conidial del aislamiento SF23 de <i>S. vesicarium</i> sobre las hojas de las cuatro variedades de pera. _____		<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 5.7: Porcentaje de aislamientos de <i>S. vesicarium</i> no agresivos (- y ±), de agresividad leve (+), y de agresividad moderada (++) en las cuatro variedades analizadas. _____		<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 5.8: Efecto fitotóxico del extracto crudo del aislamiento SF23 de <i>S. vesicarium</i> sobre las hojas de cuatro variedades de pera. _____		<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 5.9: Porcentaje de aislamientos de <i>S. vesicarium</i> que resultaron no fitotóxicos (- y ±), levemente fitotóxicos (+) y moderadamente fitotóxicos (++) en las cuatro variedades de pera. _____		<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

Figura 5.10: Porcentaje de aislamientos que resultaron levemente tóxicos (LT, 10-49% mortandad), tóxicos (T, 50-89% de mortandad) y muy tóxicos (MT, >90% mortandad) sobre larvas de <i>Artemia salina</i> , según el tipo de extracto fúngico. _____	156
Figura 6.1: Inoculación de peras con suspensión conidial de <i>S. vesicarium</i> . Inmersión de fruto en la suspensión (A). inoculación en herida con gota de suspensión (B). _____	172
Figura 6.2: Conteo de número de manchas desarrolladas por <i>S. vesicarium</i> sobre peras. _	173
Figura 6.3: Escala de severidad en función del porcentaje de superficie del fruto afectada por manchas. _____	174
Figura 6.4: Inoculación de hojas por aplicación de suspensión conidial de <i>S. vesicarium</i> con atomizador. _____	176
Figura 6.5: Porcentaje de frutos afectados por mancha marrón del peral según cultivar y temporada. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey. _____	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 6.6: Porcentaje de hojas afectadas por mancha marrón del peral según cultivar y temporada. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey. _____	179
Figura 6.7: Diagrama de cajas para las machas por fruto desarrolladas en las cuatro variedades de pera en los tres estadios de desarrollo del fruto (1 = fruto joven; 2 = fruto de desarrollo medio; y 3 = fruto maduro) en ambas repeticiones del ensayo. _____	1800
Figura 6.8: Manchas desarrolladas en Abate Fetel en las tres edades de fruto, a los 7 días de incubación luego de la inoculación por inmersión en suspensión conidial de la cepa SF23 de <i>S. vesicarium</i> . _____	181
Figura 6.9: Manchas desarrolladas en los cuatro cultivares de pera a los 7 días de incubación luego de la inoculación por inmersión en suspensión conidial de la cepa SF23 de <i>S. vesicarium</i> . _____	181
Figura 6.10: Severidad de la enfermedad (diámetro de la lesión) causada por la inoculación por herida con la cepa SF23 de <i>S. vesicarium</i> de frutos jóvenes (1), de medio desarrollo (2) y maduros (3) de las cuatro variedades. _____	184
Figura 6.11: A) Efecto de la cepa SF23 de <i>S. vesicarium</i> en hojas jóvenes de los cultivares Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel. B) El efecto de la cepa SF23 de <i>S. vesicarium</i> en hojas jóvenes y viejas del cv. D'Anjou. _____	186
Figura 6.12: Patogenicidad de la cepa SF23 de <i>S. vesicarium</i> en hojas de los cuatro cultivares de pera. A. Patogenicidad en hojas jóvenes. B. Patogenicidad en hojas jóvenes y viejas. _____	187

Figura 7.1: Esquema de los ensayos realizados.	202
Figura 7.2: Crecimiento micelial a los 7 días de incubación en las distintas concentraciones de cada fungicida.	205
Figura 7.3: Curvas de dosis-respuesta de los fungicidas Bellis®, Ziram®, Merpan® y Timorex® para el crecimiento micelial de los aislamientos de <i>S. vesicarium</i> .	207
Figura 7.4: Curvas de dosis-respuesta de los fungicidas Bellis®, Ziram®, Merpan® y Timorex® para la germinación de las esporas de los aislamientos de <i>S. vesicarium</i> .	207
Figura 7.5: Severidad (manchas por fruto) en los tratamientos preventivos en peras D'Anjou aplicados 1, 7, y 15 días antes de la inoculación con la cepa SF23 de <i>S. vesicarium</i> , en ambas repeticiones del ensayo.	210
Figura 7.6: Severidad (manchas por fruto) registrada en los tratamientos curativos en peras D'Anjou, aplicados 24 horas después de la inoculación, en ambas repeticiones del ensayo.	211
Figura 7.7: Efecto de la aplicación preventiva de los fungicidas a campo. Incidencia (porcentaje de hojas afectadas) según tratamiento y temporada, siendo temporada 1 (izquierda), y temporada 2 (derecha). Medias con letras diferentes son significativamente diferentes según el test de Tukey, anidado por temporada.	213

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- AA: medio agar agua.
- ADE: agua destilada estéril.
- ANOVA: análisis de la varianza.
- $a_w$ : actividad de agua.
- APP: medio agar y pulpa de pera.
- cm: centímetros.
- $\text{cm}^2$ : centímetro cuadrado.
- conidios  $\text{mL}^{-1}$ : conidios por mililitro.
- cv.: cultivar.
- D.E.: desvío estándar.
- DDPF: días después de plena floración.
- EC50: concentración efectiva que inhibe el 50% del desarrollo.
- Hhm: horas de hoja mojada.
- kg: kilogramos.
- $\text{Kmh}^{-1}$ : kilómetros por hora.
- IM: índice de madurez.
- m: metros.
- Máx.: máximo.
- Mín.: mínimo.
- mL: mililitro.
- mm: milímetro.
- PDA: agar papa dextrosa.
- PZA: medio agar, papa y zanahoria.
- $T_{\text{mph}}$ : temperatura media del período húmero.
- $T_{\text{md}}$ : temperatura media diaria.
- V8: medio agar ocho vegetales.
- °C: grados centígrados.
- $\mu\text{L}$ : microlitro.
- $\mu\text{m}$ : micrómetro.



## RESUMEN. Epidemiología, caracterización y control de *Stemphylium vesicarium*, agente causal de “mancha marrón” en perales

El Valle de Río Negro y Neuquén es la principal región de cultivo de frutales de pepita en Argentina, con una superficie de 18.367 hectáreas dedicadas actualmente a la producción de peras. Las variedades más cultivadas en esta zona son Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel. La mancha marrón del peral, causada por el hongo *Stemphylium vesicarium*, es una enfermedad de reciente detección en la zona del Alto Valle de Río Negro, por lo que no existía hasta el momento información local sobre el comportamiento del patógeno o estrategias de control.

Los objetivos de esta tesis fueron identificar y estudiar el comportamiento del patógeno, su epidemiología, determinar la susceptibilidad de las principales variedades cultivadas en la zona y evaluar medidas para su control.

Se realizaron monitoreos en plantaciones de perales en diferentes ubicaciones del Alto Valle de Río Negro. Se aislaron muestras de tejidos sintomáticos utilizando medio agar papa dextrosa (PDA), y se cumplieron los postulados de Koch para confirmar la relación causal entre el hongo y la enfermedad. Se caracterizó la sintomatología en hojas y frutos, obteniendo un cepario con 150 aislamientos, de los cuales 21 fueron caracterizados morfológica y molecularmente como *Stemphylium vesicarium*.

Se evaluó el crecimiento micelial del hongo y su capacidad de esporulación en distintos medios de cultivo y se realizó un estudio ecofisiológico para determinar la influencia de los parámetros ambientales en el crecimiento. Este estudio consistió en evaluar el crecimiento de los aislamientos a diferentes temperaturas y actividades de agua ( $a_w$ ) en medio PDA. Para el cultivo de los aislamientos se destacó el medio PDA por su velocidad de crecimiento y su fácil acceso, mientras que los medios V8 y AA fueron los más indicados para la producción de conidios. El estudio ecofisiológico indicó que el mayor crecimiento se dio a 25 y 30 °C y en  $a_w$  de 0,99.

Durante tres temporadas, se estudió el comportamiento del patógeno, siguiendo el desarrollo de sus estructuras invernantes y registrando la aparición de síntomas. Se recolectaron hojas con síntomas de mancha marrón a fines de marzo de cada año y se colocaron en bolsas de malla de polipropileno de 70 x 30 cm en el interfilar a partir del 1 de abril. Los muestreos se realizaron de julio a diciembre, contabilizando el número de pseudotecios en cada lámina foliar y extrayendo de 50 a 100 pseudotecios para determinar su madurez según escalas reportadas para hongos ascomicetos. Los pseudotecios se desarrollaron durante el invierno en las hojas de peral de la temporada anterior. Las temperaturas bajas y humedad elevada favorecieron su evolución. La diferenciación de las

ascosporas ocurrió entre los meses de julio y agosto. En el período comprendido entre octubre y noviembre, se registró una cantidad considerable de ascosporas maduras y disponibles para liberarse.

Se evaluó la patogenicidad de los aislamientos en frutos de la variedad D'Anjou, y se seleccionó la cepa más patogénica para llevar a cabo los ensayos de inoculación. Se realizó un estudio de susceptibilidad varietal utilizando hojas y frutos de las principales variedades: Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel. Según los resultados obtenidos, se determinó que las variedades más susceptibles a la infección son Abate Fetel y D'Anjou, mientras que Packham's mostró un comportamiento intermedio y Williams fue la menos susceptible, con valores menores de incidencia y severidad. Además, se evaluaron los frutos y hojas en diferentes etapas de desarrollo para determinar su mayor susceptibilidad, observando que los frutos y hojas jóvenes fueron los más afectados.

Para investigar el control de la enfermedad, se realizaron ensayos *in vitro* para inhibir el crecimiento micelial y la germinación de esporas utilizando cuatro fungicidas, determinando los valores de EC50 para cada uno. Además, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* con estos fungicidas, aplicándolos de manera preventiva y curativa en frutos, para determinar las estrategias más recomendables para su manejo. Este estudio permitió identificar a Bellis® (pyraclostrobin + boscalid), Ziram® (ziram), y Merpan® (captan), como posibles herramientas de manejo de la mancha marrón del peral. Bellis® fue el fungicida más eficaz para prevenir la germinación de esporas y el crecimiento del micelio, demostrando EC50 menores que el resto. Ziram®, fue el segundo mejor fungicida. Los tratamientos preventivos fueron los más efectivos para reducir la incidencia y la severidad de la mancha marrón. Así mismo, se realizaron tratamientos preventivos a campo durante dos temporadas con los fungicidas Bellis® y Ziram®, obteniendo buenos niveles de control de la enfermedad.

Los resultados obtenidos de este trabajo de tesis proporcionan información importante para el manejo de la mancha marrón del peral en Argentina, contribuyendo así a la sustentabilidad de la producción de peras en la región del Alto Valle de Río Negro.

## ABSTRACT. Epidemiology, characterization and control of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear

The Rio Negro and Neuquén Valley is the main apple-producing region in Argentina, with a current cultivated area of 18,367 hectares dedicated to pear production. The main varieties grown in this area include Williams, Packham's, D'Anjou, and Abate Fetel. Brown spot of pear, caused by the fungus *Stemphylium vesicarium*, was recently detected in the Alto Valle de Río Negro region, where there was no local information available about the behavior of the pathogen or control strategies.

The objectives of this thesis were to identify and study the behavior of the pathogen, its epidemiology, determine the susceptibility of the main varieties grown in the region, and evaluate control measures.

Monitoring was conducted in pear orchards at different locations in the Alto Valle de Río Negro. Symptomatic tissue samples were isolated using potato dextrose agar medium, and Koch's postulates were fulfilled to confirm the causal relationship between the fungus and the disease. Symptomatology on leaves and fruits was characterized, resulting in a collection of 150 isolates, from which 21 were morphologically and molecularly characterized as *Stemphylium vesicarium*.

Mycelial growth of the fungus and its sporulation capacity were evaluated in different culture media, and an eco-physiological study was conducted to determine the influence of environmental parameters on growth. This study involved assessing the isolates' growth at different temperatures and water activities ( $a_w$ ) in potato dextrose agar medium. The PDA medium was chosen for isolates' cultivation due to its fast growth rate and easy accessibility, while V8 and AA media were most suitable for conidia production. The eco-physiological study indicated that the highest growth occurred at 25 and 30°C and at an  $a_w$  of 0.99.

Over three seasons, the behavior of the pathogen was studied by monitoring the development of its overwintering structures and recording symptom appearance. Leaves with brown spot symptoms were collected at the end of March each year and placed in polypropylene mesh bags (70 x 30 cm) in the tree interspaces starting from April 1st. Sampling was conducted from July to December, during which the number of pseudothecia on each leaf was counted, and 50 to 100 pseudothecia were extracted to determine their maturity stage based on reported scales for ascomycete fungal pseudothecia development. Pseudothecia developed during the winter on the leaves of the previous season's pear trees. Low temperatures and high humidity favored their evolution. The differentiation

of ascospores occurred between the months of July and August. In the period between October and November, a considerable amount of mature ascospores was recorded and available for release.

The pathogenicity of the isolates on Beurré D'Anjou fruits was evaluated, and the most pathogenic strain was selected for inoculation assays. A varietal susceptibility study was conducted using leaves and fruits of the main varieties, including Williams, Packham's, D'Anjou, and Abate Fetel. The results confirmed that Abate Fetel and D'Anjou were the most susceptible varieties, while Packham's showed intermediate behavior, and Williams was the least susceptible, exhibiting lower incidence and severity values. Additionally, fruits and leaves at different developmental stages were evaluated to determine their highest susceptibility, with young fruits being the most affected.

To investigate disease control, in vitro assays were performed to inhibit mycelial growth and spore germination using four fungicides, determining their respective EC50 values. Furthermore, these fungicides were applied in vitro in preventive and curative treatments to determine the most recommended strategies for disease management. This study enabled the identification of Bellis® (pyraclostrobin + boscalid), Ziram® (ziram), and Merpan® (captan), as potential management tools for brown spot of pear. Bellis® proved to be the most effective fungicide in inhibiting spore germination and mycelial growth, displaying lower EC50 values than the others. Ziram® ranked as the second-best fungicide. Preventive treatments showed the highest efficacy in reducing the incidence and severity of brown spot of pear. Likewise, preventive field treatments were carried out over two seasons using the fungicides Bellis® and Ziram®, achieving effective disease control levels.

The findings from this thesis work provide crucial insights for effectively managing brown spot of pear in Argentina, thus playing a significant role in promoting the sustainability of pear production in the Alto Valle de Río Negro region

## Capítulo 1 : Introducción general





## Área de estudio

### Ubicación y características edafo-climáticas del Alto Valle de Río Negro

Río Negro es una de las veintitrés provincias que componen la República Argentina. Se encuentra ubicada al centro-norte de la región patagónica, limita al noroeste con el río Limay, al norte con el río Colorado, al noreste con la Provincia de Buenos Aires y el golfo San Matías (mar argentino, océano Atlántico), al sur con Chubut y al oeste con Chile, cuya frontera está determinada por la línea de altas cumbres de la cordillera de los Andes (Figura 1.1).

El Alto Valle de Río Negro es la región constituida por los valles irrigados ubicados en el curso inferior del río Neuquén y en el curso superior del río Negro, con una extensión de 65 km junto al río Neuquén y 120 km aguas abajo de la confluencia de los ríos Limay y Neuquén junto al río Negro (Worcel, 2006; INTA, 2009). Este valle fue labrado principalmente por el río Negro en su repliegue hacia su margen sur, generando distintas terrazas y dejando una pendiente longitudinal del 1% o menos. Por lo tanto, la producción se encuentra enmarcada por barrancas o “bardas” hacia el norte y el mismo río hacia el sur. En la Figura 1.1 se puede observar la ubicación geográfica del Alto Valle. La región está conformada por 14 localidades. Al oeste de esta se ubican Campo Grande, Cordero, Cinco Saltos,

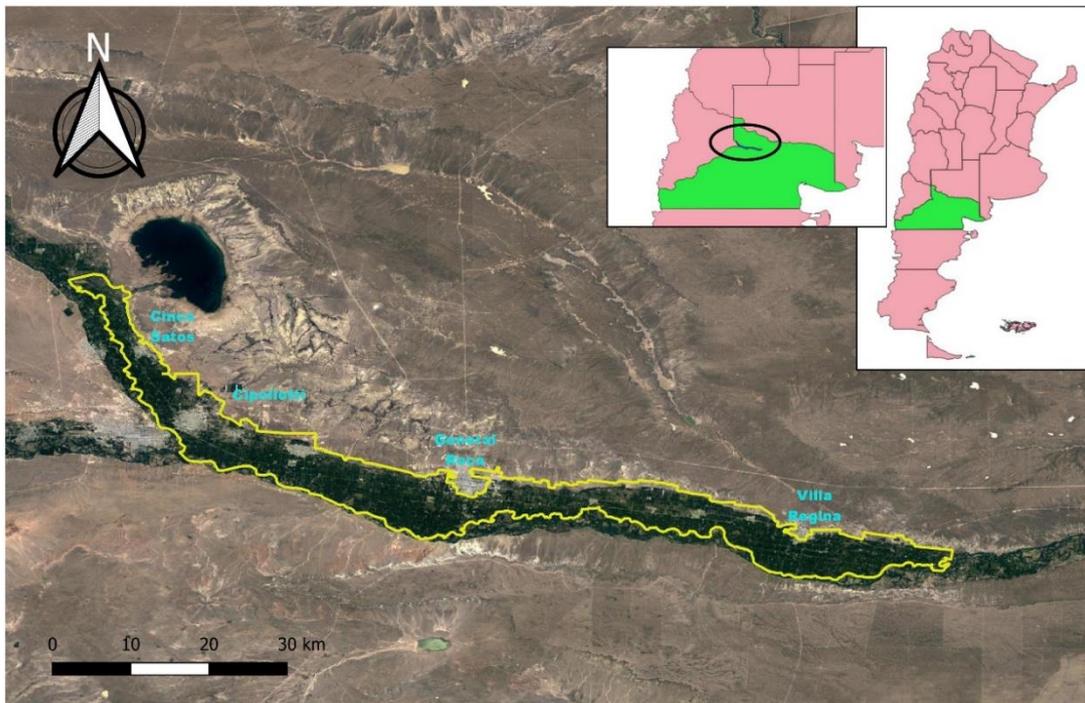


Figura 1.1: Ubicación geográfica del Alto Valle de Río Negro, Argentina

Cipolletti y Fernández Oro, siendo Cipolletti la ciudad donde se concentra la mayor actividad productiva y demás actividades vinculadas. En la zona centro del Alto Valle se ubican las localidades de Allen, General Roca, Cervantes, Mainqué, e Ing. Huergo, siendo General Roca el centro productivo de dichas localidades. Hacia el este de la región del Alto Valle se encuentran las localidades de Gral. E. Godoy, Villa Regina y Chichinales (Rivero, 2011).

Los suelos de la región son típicos de desierto, clasificados como Entisoles y Aridisoles. Se caracterizan por su baja meteorización y son clasificados en suelos de barda, suelos de media barda, suelos de media costa y suelos de costa. Son de origen coluvial, de texturas no muy pesadas, entre arenosos y franco limoso, escasos en materia orgánica, con velocidad de infiltración media a alta y con un perfil profundo, sin gran desarrollo edáfico. Sin embargo, dado que posee una historia de 100 años de cultivo, las características originales han cambiado, encontrándose por ejemplo hoy, en algunas zonas, valores de materia orgánica de 2% o más (Rodríguez & Holzmann, 2017).

De acuerdo con Thornthwaite, la región del Alto Valle se caracteriza por tener un clima de árido a semiárido, meso termal y con lluvias deficientes durante todo el año (Rodríguez, 2009).

La temperatura media anual del aire es de 15 °C. El período más cálido del año comprende los meses de noviembre a febrero, con temperaturas medias mayores a 20 °C. El mes más caluroso es enero con temperaturas medias de 23,6 °C. En el mes de julio la temperatura media es de 6,6°C siendo éste el mes más frío (Rodríguez & Muñoz, 2006). Durante el período primavero-estival las temperaturas máximas diarias sobrepasan los 37 °C. El trimestre más frío es de junio a agosto, con valores medios entre 6,7 °C y 9,1 °C. Julio es el mes más frío con -0,7 °C de temperatura mínima media (Rodríguez, 2009).

Las lluvias presentan una ocurrencia heterogénea y solo ante eventos extremos destacados se han registrado precipitaciones homogéneas en todo el territorio (Rodríguez & Muñoz, 2022). El valor medio anual de lluvia acumulada para el Alto Valle es de 227 mm, con una frecuencia de 51 días con lluvias. El régimen anual de lluvias se caracteriza por concentrar la mayor cantidad de agua acumulada en los meses de febrero, marzo, abril y en primavera en el mes de octubre. La mayor frecuencia de días lluviosos se registra en el mes de mayo y junio (Rodríguez & Muñoz, 2022).

El viento es otro factor meteorológico de mucha importancia en la zona. Se presenta durante todo el año adquiriendo las velocidades más altas durante la primavera. Vientos moderados con velocidades de 18 a 35 Km<sup>h</sup><sup>-1</sup> son frecuentes durante los meses de septiembre a diciembre, en tanto las calmas predominan de marzo a junio. Los vientos fuertes se caracterizan por la presencia de ráfagas de hasta 100 Km<sup>h</sup><sup>-1</sup>. La dirección predominante es del oeste y, en segundo lugar, del sector

sudoeste, a su vez son los vientos de mayor intensidad (Rodríguez, 2009). Dadas estas condiciones, el uso de plantaciones de álamos como cortinas “rompe vientos” es muy frecuente en la zona.

El granizo es otra adversidad climática, que afecta el área con frecuencia e intensidad variable y año tras año (Rodríguez & Holzmann, 2017). Presenta mayor frecuencia en el mes de enero, le siguen en orden de importancia noviembre y diciembre (Rodríguez & Muñoz, 2022).

La caída de nieve es muy poco frecuente, registrándose como eventos notables, por ejemplo, los inviernos de 1982, 2007, 2020 y 2022.

### La variabilidad agroclimática en el Alto Valle en las últimas décadas

El análisis de la serie climática para la serie 1970-2019 realizado por Rodríguez & Muñoz (2022), indica que, en cuanto a las precipitaciones, se observa una gran variabilidad interanual, existiendo registro de años con menos de 100 mm de lluvia acumulada y otros por encima de los 400 mm. El estudio también indica que, en lo que se refiere a magnitud de precipitaciones, no se observa una tendencia de aumento, pero sí hay una tendencia de cambio en la distribución de estas.

El análisis realizado para la serie climática de 50 años en el Alto Valle denota que la frecuencia de lluvias en primavera ha aumentado. La frecuencia media es de 12 días, con una media de 57,3 mm, sin embargo, se han registrado primaveras muy secas, sobre todo durante el periodo comprendido entre 1975 a 1989 con un mínimo de 2,6 mm en 1983. A partir del año 2009 no se han registrado primaveras con frecuencias menores a la media (12 días). Eventos extremos por exceso de lluvias se registraron en 1988, 1992, 1993, 2000, 2001, 2016 y 2018, siendo este último el año de mayor registro de lluvias primaverales, con una media de 135 mm y 26 días de lluvia (Rodríguez & Muñoz, 2022).

En verano, la media de precipitaciones es 55,7 mm y la frecuencia media varía entre 5 y 10 días con lluvias. Los años extremos con más de 14 días de lluvias fueron 1975, 1978, 1984, 2006 y 2016.

Con respecto a las temperaturas, el análisis de las últimas décadas marca una tendencia de aumento en las temperaturas máximas medias. En verano, hay un aumento de días con temperaturas mayores a 38 °C y de días con temperaturas mayores 40 °C (Rodríguez & Muñoz, 2022).

## La producción de frutales de pepita en la región

El cultivo de árboles frutales en el valle de Río Negro y Neuquén se inició alrededor del año 1910, con la construcción del dique Ingeniero Ballester, obra cuyo propósito fue dar nacimiento al sistema integral de riego del Alto Valle del río Negro y del Valle Inferior del río Neuquén (Gittings & Calvo, 2013).

En este periodo se cultivaban numerosas variedades tanto de pera como de manzana, siendo el monte libre el sistema de conducción predominante. El acceso a los mercados dio origen a un manejo de postcosecha, al comienzo muy rudimentario, consistente en el empaque en la misma chacra sin ninguna clasificación y pocos cuidados (Gittings y Calvo, 2013).

Hacia 1930 se instalaron las primeras plantas procesadoras de fruta, favoreciendo al desarrollo agroindustrial en la región del Alto Valle y consolidando su poblamiento (Worcel, 2006). Además, el ritmo de la producción marcaba un importante crecimiento, alrededor del 70% de las peras y manzanas exportadas por Argentina eran provistas por el Alto Valle, ocupando la región el primer puesto en el volumen de producción nacional.

A partir de la década del 70 y 80 los sistemas de conducción de los frutales de pepita comenzaron una nueva etapa, adoptando la forma de espaldera, donde los marcos de plantación se reducen y la entrada en producción se anticipa (Gittings y Calvo, 2013).

De acuerdo con la comparación intercensal, entre los años 1993 y 2005, el crecimiento de la superficie cultivada con perales en la provincia de Río Negro fue del 32%, manteniéndose relativamente constante la composición varietal (Boltshauser & Villarreal, 2007).

En la actualidad, la producción de frutos de pepita representa aproximadamente el 30% del total de la producción nacional de fruta. La provincia de Río Negro concentra el 78% de la producción de frutales de pepita, le siguen en importancia las provincias de Neuquén (con un 12%), y Mendoza (con un 10%).

Actualmente, en Río Negro, la superficie neta cultivada con frutales de pepita es de 30.556 hectáreas, de las cuales el 53,2% corresponde a perales y el 46,8% a manzanos (Senasa, 2019). La superficie implantada con peras es de 16.253 hectáreas y los principales cultivares son Williams Bon Chretien (Williams), Packham's Triumph (Packham's), Beurré D'Anjou (D'Anjou ) y Abate Fetel, los cuales representan el 40,9%, 29%, 14,2% y 4,9% de la producción, respectivamente (Senasa, 2019). El 84% de la superficie cultivada con perales en la provincia de Río Negro se encuentra en la zona del Alto

Valle, le siguen en importancia las zonas de Valle Medio y Río Colorado, con una superficie de 12% y 2,5% respectivamente (Boltshauser y Villarreal, 2007). La superficie cultivada con manzanos en Río Negro es de 14.303 hectáreas, siendo Red Delicious la variedad predominante, representando un 65,4% de la producción de manzana; le siguen en importancia Granny Smith (13,3%), Gala (11,7%), y Cripps Pink (5%).

El principal destino de la producción de la fruta de pepita es la exportación en fresco. En los últimos años, la participación de cada uno de los destinos se ha mantenido relativamente estable. En el caso de la pera, el 72% se dirige al consumo en fresco, siendo un alto porcentaje destinado a la exportación (58%) y el resto se industrializa (28%). Por el contrario, en manzana los porcentajes de industrialización son superiores (40%). El 34% se dirige al mercado interno en fresco, mientras que una porción menor se envía para el consumo en fresco al exterior (25%) (Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas de la Nación, 2016). Los principales destinos de exportación de peras y manzanas son: Brasil, Rusia y EE. UU.

## Hospedante

### El cultivo del peral

El cultivo del peral se inicia en el oeste asiático, en los valles formados por la cadena montañosa Tian Shan en China hace unos 3000 años, aunque escritos de Homero (700 aC) sugieren una posible procedencia europea (Giayetto & Villarreal, 2010).

El peral pertenece a la familia de las rosáceas y al género *Pyrus*, que incluye numerosas especies que se clasifican como “orientales” y “occidentales” (Lalatta, 2000). Las especies más utilizadas en la actualidad son *P. betulifolia*, *P. calleryana*, *P. pyrifolia* y *P. ussuriensis* (orientales), y *P. communis*, *P. communis var. pyraster*, *P. amygdaliformis*, y *P. salicifolia* (occidentales).

La especie más difundida en la región es *P. communis*, conocido también como peral europeo. La planta tiene una larga vida, pudiendo superar los sesenta años si las condiciones son adecuadas (Lalatta, 2000).

*P. communis* posee raíces profundas con el eje central muy desarrollado, la que le permite tener un buen anclaje y ser resistente a la sequía. Su tronco es alto, grueso, de corteza agrietada y gris, las ramas se insertan en un ángulo de 45° con el tronco; son de corteza lisa, primero verde y luego gris-violácea con numerosas lenticelas. Sus hojas son ovales, finamente dentadas o enteras, coriáceas,

glabras, algo lustrosas por el haz y con un pecíolo de igual longitud que la lámina o más corto (Giayetto & Villarreal, 2010).

Las flores son hermafroditas y se encuentran reunidas en un corimbo, tienen 5 pétalos blancos, numerosos estambres y un ovario compuesto por cinco carpelos con dos óvulos cada uno. Si todos estos son fecundados, el fruto contará con 10 semillas (Lalatta, 2000). La fecha media de plena floración (F2) para el Alto Valle es el 24 de septiembre, aunque existen ciertas diferencias entre las distintas variedades. Además, existen fluctuaciones debido a las condiciones climáticas. Por ejemplo, en 1993 el estado F2 se alcanzó el 16 de septiembre mientras que en 2000 se registró el 5 de octubre (Rodríguez & Gastiazoro, 2010).

El fruto es un pomo de forma variable según la variedad, por lo general su epidermis es de color verde cuando es inmaduro y amarillo a la madurez, aunque hay algunas variedades que presentan punteados rojos, zonas rojas o russet. La longitud, grosor y ángulo de inserción del pedúnculo también son características varietales (Lalatta, 2000). Su pulpa es dura, en un inicio ácida y en la madurez pasa a ser blanda y dulce (Giayetto & Villarreal, 2010). El tamaño del fruto es uno de los parámetros de calidad más importantes, condiciona el inicio de la cosecha y define la remuneración económica a obtener (Rodríguez, 2009). En los inicios de la actividad frutícola en el Alto Valle, se cultivaban numerosas variedades, como Bonne Louise d'Avranches, Beurré Giffard, Beurré d'Hardy, Beurré Supefin, Beurré Diel, Clapp's Favourite, Duchesse d'Angouleme, Doyenné d'Hiver, Doyenné du Comice, Figue d'Alencon y Passe Crassane, entre otras (Gittings & Calvo, 2013). A lo largo de los años y de acuerdo con las exigencias de los mercados, la composición de las variedades de pera producidas en la zona fue modificándose, siendo Williams y Packham's las que lograron tener mayor protagonismo (Figura 1.2).

### Enfermedades fúngicas comunes en perales de la región

Históricamente, el desarrollo del cultivo de perales no ha presentado mayores problemas sanitarios relacionados a patógenos fúngicos y oomycetes (Dobra et al., 2007). Sin embargo, durante los últimos años, probablemente por cambios ambientales y de manejo de los montes frutales, se incrementó la incidencia de algunas enfermedades que hasta el momento eran de bajo impacto, y otras han sido reportadas por primera vez; entre ellas, la sarna del peral, las podredumbres por fitóftora, el oídio del peral y los canchros fúngicos (Sosa & Lutz, 2020).



Figura 1.2: Principales variedades de pera cultivadas en el Alto Valle de Río Negro: Williams (A), Packham's (B), D'Anjou (C), y Abate Fetel (D).

**El oídio** (*Podosphaera leucotricha* (Ell. y Ev.) Salmon) afecta a los órganos aéreos jóvenes de la parte aérea del árbol, los que son cubiertos por manchas pulverulentas de color blanco, deteniendo el crecimiento de las zonas afectadas. En peral los síntomas se manifiestan en los frutos, y raramente en los órganos vegetales de la planta (Fernández Valiela, 1979; Cichón et al., 1996; Rossini, 2001). La escasez de precipitaciones es una condición predisponente para la ocurrencia de la enfermedad (Rossini, 2001). En el Alto Valle, *Podosphaera leucotricha* en pera, registra mayor incidencia en montes comerciales de los cultivares Williams, Red Bartlett y D'Anjou. Los mayores daños se observan en la fruta, ya que ocasiona una necrosis superficial o “russet”, reduce el tamaño y produce la pérdida de su valor comercial (Sosa & Lutz, 2020).

**La sarna del peral** (*Venturia pyrina*) produce manchas pardas circulares que luego toman color verde-oliváceo-grisáceo y aspecto aterciopelado y que finalmente necrosan el tejido. Estas manchas pueden aparecer en hojas, flores y frutos (Agrios, 1996; Cichón et al., 1996). En los últimos años, se

observa que la enfermedad aparece con altos niveles de infección, comprometiendo la productividad principalmente en Williams, provocando hasta pérdidas totales de la producción (Sosa & Lutz, 2020).

**La podredumbre de cuello, corona y/o raíces**, causada por *Phytophthora spp.* en pomáceas es una de las enfermedades más importantes y está ampliamente distribuida en el mundo (Erwin & Ribeiro, 1996; Bush, 2002; Bhat et al., 2006; Rivero, 2011). Esta enfermedad causa pérdidas económicas significativas y generalmente provoca la muerte de los árboles afectados (Harris, 1991; Guzmán Lyon, 2003; Causin et al., 2005; Bhat et al., 2006; Rivero, 2011). *Phytophthora cactorum* es la principal especie responsable de las pérdidas económicas en frutales (Harris, 1991; Erwin y Ribeiro 1996; Rossini et al., 1997; Dobra et al., 2008; Sosa & Lutz, 2020). En los últimos años, se observa en el Alto Valle, un incremento de casos de pérdidas económicas por podredumbres por *Phytophthora lacustris* en frutas de pera almacenada (Sosa & Lutz, 2020).

**La agalla de corona**, producida por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (E.F. Smith y Townsend) Conn., es una enfermedad de amplia distribución mundial y muy polífaga, cuyos principales daños son producidos en viveros y plantaciones jóvenes, donde las plantas se infectan a través de las heridas generadas en los trasplantes y laboreos del suelo. El síntoma característico consiste en la formación de tumores en las raíces y cuello, que dificultan la circulación de la savia, lo cual puede causar desde un debilitamiento generalizado hasta la muerte de la planta afectada. En los montes comerciales la importancia de los daños tiene relación directa con la edad de la planta (Rossini & Giayetto, 2010). Las plantas maduras pueden convivir con la enfermedad y no manifestar daños importantes (Dobra et al., 2007). La transmisión del patógeno a cortas distancias es a través del agua de riego o de lluvia, mientras que a largas distancias se produce con material vegetal contaminado. De modo que el método más eficiente de lucha contra esta bacteriosis consiste en emplear plantas libres de *A. tumefaciens* y evitar su contaminación en la plantación definitiva (Rossini & Giayetto, 2010).

**El tizón de las flores** causada por *Pseudomonas syringae pv. syringae* van Hall., puede originar grandes pérdidas en la producción del peral al provocar la muerte de numerosas flores. Entre las variedades más susceptibles de este frutal se encuentran Packham's, Winter Nellis, Bartlett y D' Anjou (Cruz, 1993). En el Alto Valle se la ha observado, hasta el momento, sólo en el cv. Packham's (Cichón et al., 1996). La incidencia de esta enfermedad está muy relacionada con las condiciones meteorológicas. Se desarrollan importantes epifitias en primaveras lluviosas o con alta humedad relativa y bajas temperaturas, pero en años secos no se registran daños (Dobra et al., 2007).



Figura 1.3: Sarna del peral en hoja (A) y frutos (B) del cv. Williams. Pequeños frutos del cv. Packham's afectados por tizón (C).

## El patógeno

### El género *Stemphylium*

*Stemphylium* es un taxón establecido en 1833 (Wallroth, 1883) que incluye especies saprótrofas y patogénicas (polífagas) de plantas (Kirk et al., 2004). Taxonómicamente, se ubica dentro del Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Subphylum Pezizomycotina, Clase Dothideomycetes, Orden Pleosporales y Familia Pleosporaceae. Son hongos dematiáceos que producen conidios muriformes que proliferan de manera percurrente (Simmons 1969, 1985, 1989, 2001).

De manera general se puede afirmar que los representantes de *Stemphylium* crecen rápido, presentan colonias de color blanco, rosado, amarillo, gris, marrón o negro, con características de las colonias aterciopeladas o afieltradas (Vera Bahima, 2020). El modo de proliferación de los conidióforos es percurrente y con la célula conidiógena apical con forma de copa, son de color marrón claro a marrón oscuro, acrógenos, obtusos o agudos en los extremos, oblongos, elipsoidales a subsféricos; de superficie lisa, verrugosa o equinulada. De aspecto muriforme, con septos transversales, verticales u oblicuos, usualmente con constricciones en uno o más de sus septos y con una cicatriz en la base (Wiltshire 1938; Groves & Skolko 1944; Moreau & Moreau 1947; Simmons 1969, 1985, 1989, 2001; Simmons et al., 2004; Obregon 2018).

Muchas especies de *Stemphylium* son patógenas de plantas, humanos y otros animales (Kumar 2007). También, se pueden comportar como saprotrófos y como endófitos asintomáticos (Liu et al., 2015). En humanos se ha reportado que puede causar reacciones alérgicas e infecciones pulmonares (Wu et al., 2004). Son patógenos de varios cultivos agrícolas a lo largo del mundo causando diversos grados de pérdidas (Polfliet, 2002). Sobre plantas, los síntomas que causan generalmente se reportan como: manchas y tizones foliares, atacando diversos cultivos en diferentes lugares del mundo (berenjena en Brasil, cebolla en India y Australia, ajo en Australia, Sudáfrica, Turquía, Korea y España, esparrago en Grecia y Estados Unidos, trébol rojo en Estados Unidos y Canadá, alfalfa, perejil, y espinaca en Estados Unidos, pera en Europa: Italia, España, Holanda, Portugal, Bélgica y Francia, algodón en Brasil, pimiento en Korea, Japón y Argentina, ornamentales como Phlox en Japón, entre otros) (Lacy 1982; Ponti et al., 1988; Cowling & Gilchrist 1982; Ellis & Ellis 1985; Johnson 1987; Gupta & Srivastava 1988; Vilardell 1988; Aveling & Naude 1992; Montesinos & Vilardell 1992; Blancard 1992; Ponti & Laffi 1993; Montesinos et al., 1995a,b; Berg & Leath 1996; Takeuchi & Horie 1997; Mehta et al. 1998, 2000; Cho & Hun 1998; Basallote-Ureba et al., 1999; Suheri & Price 2000; Koike & Henderson 2001; Cho et al., 2001; Llorente & Montesinos 2002; Polfliet 2002; Realise et al. 2002; Van Dijke 2002; Kim et al., 2004; Keisuke & Toyozo 2011; Nasehi et al., 2012; Polat et al., 2012; Koike et al., 2013, Franco 2017; Brahamanage et al., 2018).

### *Stemphylium vesicarium*

El agente causal de la mancha marrón del peral es *Stemphylium vesicarium*, el cual produce conidióforos erectos con un solo conidio terminal (Simmons 1969).

*S. vesicarium* ha sido descrito como saprófito (Ellis 1971; Simmons 1969) y como patógeno en diferentes especies de plantas además de pera, como ajo (Aveling y Naude 1992; Basallote Ureba et al., 1999), cebolla (Shishkoff y Lorbeer 1989), espárragos (Falloon et al., 1987), alfalfa (Lamprecht et al., 1984), tomate (Blancard et al., 2011) y perejil (Koike et al., 2013). El teleomorfo corresponde al Ascomycete *Pleospora allii* (Rabenh.) Ces. & De Not, produce pseudotecios con ascos que contienen ocho ascosporas de color marrón amarillento (Simmons 1985).

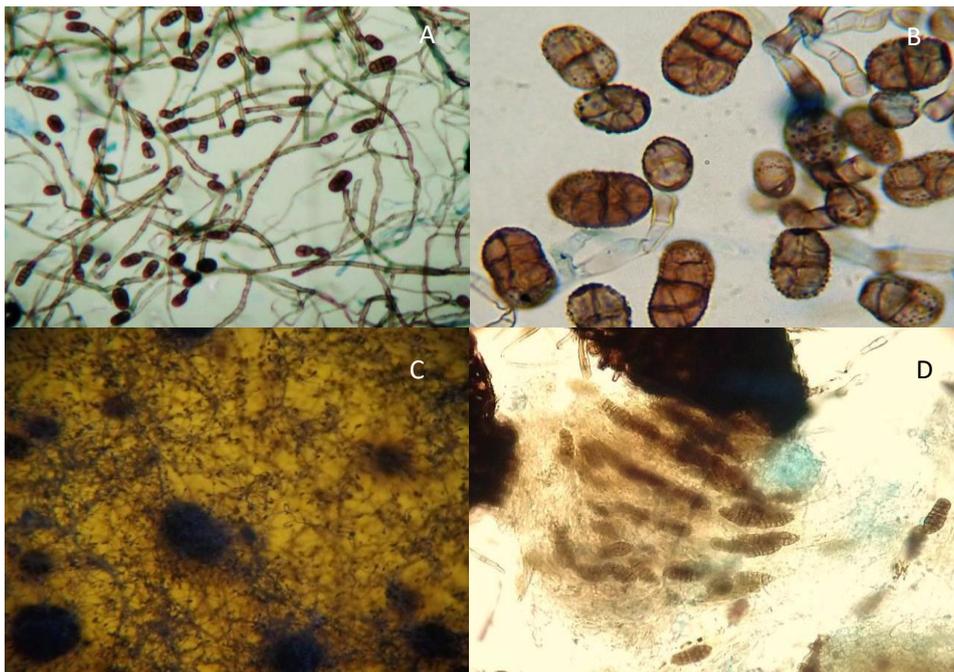


Figura 1.4: Características microscópicas de *S. vesicarium*. Conidios de *S. vesicarium* (A: 100X, B: 1000X); pseudotecios y conidios de *S. vesicarium* (C: 40X); ascosporas de *S. vesicarium* que emergen de un pseudotecio maduro (D: 400X).

## La enfermedad

### Importancia de la mancha marrón del peral en el mundo

La mancha marrón del peral se detectó por primera vez en 1937 en Italia, y en España y Francia a fines de la década de 1980. En los últimos años, la enfermedad se ha extendido a los Países Bajos (Polfliet, 2002; Van Dijke, 2002), Portugal (Llorente y Montesinos, 2002) y Bélgica (P. Creemers, RSF-Research Station of Gorseme, com. Pers.). También ha sido reportada en Japón (Tanahashi et al., 2008) y en Polonia (Glos et al., 2023).

Las áreas más afectadas en Europa incluyen las regiones de Emilia-Romagna y Veneto en Italia, Provenza en el sureste de Francia, Girona y Catalunya en España (Vilardell, 1988; Hernández, 1999; Montesinos y Vilardell, 1992). En Girona apareció a principios de los años 80 y hacia fines de la década del 90 presentó un 30% de la superficie de cultivo gravemente afectada. También existen referencias de ataques en Lérida, Huesca, Navarra, Asturias y en La Rioja, en esta última se ha extendido progresivamente (Hernández, 1999).

## Sintomatología

El hongo causa áreas necróticas extendidas en hojas, brotes y frutos, que no son comercializables (Rossi et al., 2005a,b).

Los síntomas en los frutos jóvenes suelen localizarse en el cáliz, mientras que en los frutos maduros se desarrollan manchas necróticas en la zona ecuatorial. Las lesiones del fruto se expanden en la superficie del fruto y la colonización secundaria por hongos saprofitos como *Alternaria spp.* puede producir la pudrición de la fruta. Los ataques severos a las hojas pueden producir una defoliación prematura (Llorente et al., 2012).

Los síntomas de la enfermedad se observan a fines de la primavera y aumentan progresivamente hasta la cosecha. Las pérdidas de producción tienen un alto impacto económico en varias zonas productoras de peras mediterráneas de Europa y la intensidad de la enfermedad depende de diferentes factores como el nivel de inóculo o las condiciones climáticas, pero la incidencia global de la enfermedad puede estimarse entre el 1 y el 10%, con un impacto comparable a la sarna del manzano en algunas zonas (Montesinos & Vilardell, 1992).

Se han reportado diferencias de susceptibilidad debidas al cultivar y también dadas por la edad del tejido vegetal, donde las hojas jóvenes y los frutos inmaduros son más susceptibles que los maduros (Montesinos et al., 1995a).

Estas diferencias en la susceptibilidad pueden explicarse por la producción de dos toxinas, llamadas SV-I y SV-II, que están involucradas en el desarrollo de la enfermedad y son agentes indispensables para la virulencia y patogenicidad del hongo. Estas toxinas inducen selectivamente la necrosis venosa solo en cultivares susceptibles (Singh et al., 1999, 2000).



Figura 1.5: Síntomas de mancha marrón en perales. Síntomas en hojas y frutos del cv. Abate Fetel (A), caída natural de frutos del cv. Abate Fetel afectados por mancha marrón (B). Síntomas en hojas y frutos el cv. D'Anjou (C) y en frutos del cv. Packham's.

### Ciclo de vida

El patógeno *Stemphylium vesicarium* produce dos tipos de esporas: el teleomorfo produce ascosporas, mientras que el anamorfo produce conidios (Figura 1.6). Las ascosporas se desarrollan sobre los restos de hojas afectadas durante el otoño y maduran durante el invierno (Prados-Ligero et al., 1998), ya que las bajas temperaturas son necesarias para este proceso (Aveling, 1993; Llorente & Montesinos, 2004); en cambio, la maduración depende principalmente de las condiciones de

humedad (Llorente y Montesinos, 2004). La liberación de ascosporas ocurre en asociación con la lluvia (Prados-Ligero et al., 1988; Llorente et al., 2003).

El inicio de infecciones requiere siempre la presencia conjunta de humectación o humedad relativa elevada y de temperaturas suaves (Hernández, 1999). Las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad en cultivares susceptibles son 20-25 °C y humedad de las hojas o frutos, y bajo estas condiciones, un período de humedad de 6 horas es suficiente para iniciar las infecciones (Montesinos et al., 1995b). Las epidemias suelen desarrollarse entre finales de la primavera y finales del verano (Ponti & Laffi, 1993).

Los conidios están presentes en el aire entre la primavera y el otoño y pueden considerarse los principales responsables de las infecciones que ocurren durante la temporada de cultivo (Bugiani et al., 2004; Rossi et al., 2005b). Ha sido reportado que el patógeno afecta a ciertas malezas, generando lesiones inespecíficas y es capaz de producir conidios y ascosporas (Rossi et al., 2005a), de modo que los residuos de perales y malezas en el suelo se consideran una fuente constante de inóculo que pueden causar infecciones en las hojas y frutos durante toda la temporada.

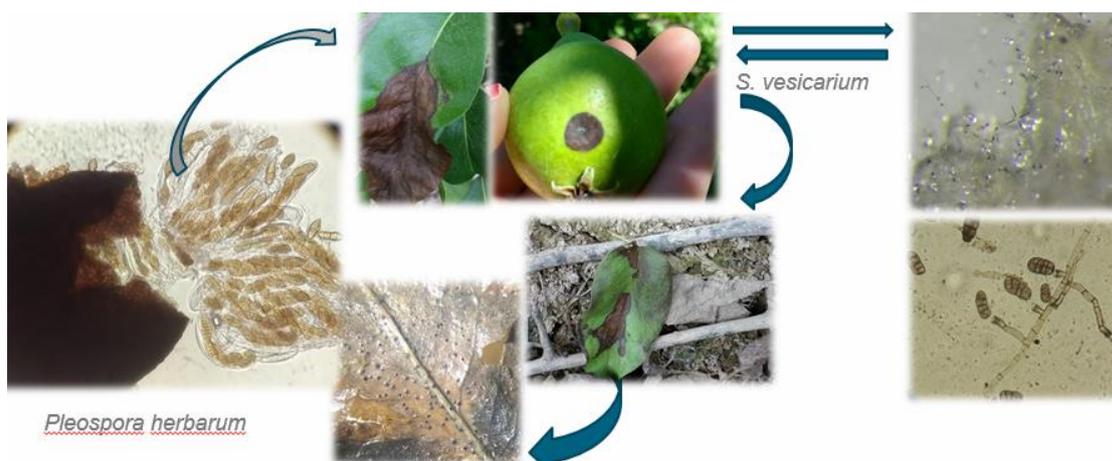


Figura 1.6: Ciclo de vida de *S. vesicarium* en el cultivo de peral.

## Control

En Europa, debido a la elevada presión de la enfermedad y condiciones climáticas predisponentes, se realizan numerosas aplicaciones fitosanitarias, ya sea a calendario fijo o siguiendo el sistema de pronóstico BSPcast (Brown Spot Pear Forecast) (Llorente et al., 2000). Dichas aplicaciones pueden ser combinadas con estrategias de reducción de inóculo como la eliminación de hojarasca durante

el invierno y aplicaciones de agentes de control biológico durante el final del invierno, primavera y verano (Llorente et al., 2012).

### Situación de la mancha marrón del peral en la región

En enero de 2013 se detectó por primera vez la patología conocida como “Mancha marrón del peral”, “Brown spot of pear”, o “BSP” (por sus siglas en inglés) en la zona de Valle Medio, específicamente en la localidad de Coronel Belisle. En esta primera detección se observaron síntomas en hojas y frutos de la variedad D'Anjou (Dobra & García, 2015).

A partir del año 2016 se identificó a la enfermedad afectando a diversos cultivares en la zona del Alto Valle, confirmándose la presencia de las fases sexual y asexual del patógeno (Di Masi, 2017).

## Bibliografía

- Agrios G.N. (1996). Fitopatología. Segunda Edición. Editorial Limusa S.A. México. 820pp.
- Aveling, T.A.S. & Naude, S.P. (1992). First Report of *Stemphylium vesicarium* on garlic in South Africa. Plant Disease 76: 426. <https://doi.org/10.1094/PD-76-0426E>.
- Aveling, T. A. S., & Snyman, H. G. (1993). Infection studies of *Stemphylium vesicarium* on onion leaves. Mycological Research 97: 984–988.
- Basallote-Ureba, M.J., Prados-Ligero, M. & Melero-Vara, J.M. (1999). Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. Plant Pathology 48: 139–145. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00313.x>.
- Berg, C.C. & Leath, K.T. (1996). Responses of red clover cultivars to *Stemphylium* leaf spot. Crop Science 36, 71. <https://doi.org/10.2135/cropsci1996.0011183X003600010012x>.
- Bhat, R.G., Colowit, P.M., Tai, T.H. y Browne, G.T. (2006). Genetic and pathogenic variation in *Phytophthora cactorum* affecting fruit and nut crops in California. Plant Disease 90: 161-169.
- Blancard, D. (1992). Enfermedades Del Tomate. Observar, identificar y luchar.
- Blancard, D., Laterrot, H., Marchoux, G. & Candresse, T. (2011). Enfermedades del tomate: Identificar, conocer, controlar.
- Boltshauser, V. & Villarreal, P. (2007). Área irrigada de la provincia de Río Negro. Caracterización socioeconómica y técnico-productiva. Convenio Secretaría de Fruticultura de Río Negro e INTA EEA Alto Valle. <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-caracterizacion-social-valles-irrigados.pdf>.
- Brahamanage, R.S., Hyde, K.D., Li, X.H., Zhang, W., Liu, M., Jayawardena, R.S., McKenzie, E.H.C. & Yan, J.Y. (2018). Are pathogenic isolates of *Stemphylium* host specific and cosmopolitan? Plant Pathology & Quarantine 8 (2): 153–164. <https://doi.org/10.5943/ppq/8/2/7>.
- Bugiani, R., Giosue, S., Rossi, V. & Spada, G. (2004). I modelli previsionali per la lotta alla maculatura bruna del pero. <http://www.phytomagazine.com>.
- Bush, E.A. (2002). Characterization of *Phytophthora* species in recycled irrigation water at a container nursery in southwestern Virginia. Thesis Master of Science. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia.
- Causin, R., Scopel, C., Grendene, A., & Montecchio, L. (2005). An improved method for detection of *Phytophthora cactorum* (L.C.) Schröeter in infected plant tissues using SCAR markers. Journal of Plant Pathology 87: 25-35 (abstract).

- Cho, H. & Hun, Y.S. (1998). *Stemphylium vesicarium* on garlic and other *Allium spp.* in Korea. Korean Journal of Plant Pathology, 14: 567–570.
- Cho, H.J., Kim, B.S. & Hwang, H.S. (2001). Resistance to gray leaf spot in *Capsicum peppers*. HortScience 36: 752–754.
- Cichón, L. I., Di Masi, S.N., Fernández, D.E., Magdalena, J.C., Rial, E.J. & Rossini, M.N. (1996). Guía ilustrada para el monitoreo de plagas y enfermedades en frutales de pepita. INTA - EEA Alto Valle. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp\\_inta\\_guia\\_ilustrada\\_monitoreo\\_plagas.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp_inta_guia_ilustrada_monitoreo_plagas.pdf)
- Cowling, W.A. & Gilchrist, D.G. (1982). Expression of pathogen virulence and host resistance during infection of alfalfa with *Stemphylium botryosum*. Phytopathology 72: 36–42. CPHF.
- Cruz, A. M. (1993). Tizón de la flor del peral. Descripción de daños y control de la enfermedad. Investigación y Progreso Agropecuario Quilamapu. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/27033>.
- Di Masi, S. (2017). La mancha negra del peral afecta la región. Diario Río Negro. <http://www.rionegro.com.ar/la-mancha-negra-del-peral-afecta-la-region-YG2293441>.
- Dobra, A., Rossini, M., Barnes, N., Sosa, C. (2007). Manejo integrado de enfermedades de los frutales de pepita. En: Árboles frutales: Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento. Sozzi (ed.) 1ª ed. FAUBA, 589-615.
- Dobra, A. C., García, L. (2015). Presencia de mancha negra del peral, *Stemphyllium vesicarium*, en el Valle Medio del Río Negro, Patagonia Argentina. - XXXVIII Congreso Argentino de Horticultura. Bahía Blanca. Buenos Aires. 05-08 de octubre - Página/s: 34(85):73.
- Dobra, A., Sosa, C., & Dussi, C. (2008). Low incidence of fungal and bacterial diseases in the pear production of North Patagonia, Argentina. 10th Internat. Pear Symp. Ed: Webster-Oliveira ISHS. Acta Horticulturae. 800: 907-912.
- Ellis, M.B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Kew. Surrey. England.
- Ellis, M.B. & Ellis, J.P. (1985). Microfungi on Land Plants, MacMillan: New York.
- Erwin, D.C. & Ribeiro O.K. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn, USA. 562 pp.
- Falloon, P.G., Falloon, L.M. & Grogan, R.G. (1987). Etiology and epidemiology of *Stemphylium* leaf spot and purple spot of asparagus in California. Phytopathology 77, 407–13.

- Fernández Valiela, M.V. (1979). Introducción a la Fitopatología. 3raª Edición. INTA. Colección Científica. Vol III. Hongos. Talleres de Artes Gráficas Don Bosco. Ciudad de Buenos Aires. 613pp.
- Franco, M.E., Troncozo, M.I., López, M.S.Y., Lucentini, G., Medina, R., Saparrat, M.C.N., Ronco, L.B. & Balatti, P.A. (2017). A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *Stemphylium lycopersici* representatives which were genetically diverse and differed in their virulence. 983–1000. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1248-z>.
- Giayetto, A. L. & Villarreal, P. (2010). Introducción: Taxonomía y morfología de *Pyrus communis*. En: Pera William´s: Manual para el productor y empacador. Pro Río Negro (Ed.). 13 pp.
- Gittins, C. G. & Calvo, P. C. (2013). La manzana y la pera en el Alto Valle. Revista Fruticultura & Diversificación Nº 72, 6-11 pp. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_fd\\_72\\_fruticultura.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_fd_72_fruticultura.pdf).
- Głós, H., Bryk, H., Michalecka, M., Puławska J. (2023). First report of *Stemphylium vesicarium*, a new pathogen causing brown spot of pear in Poland. Journal of Plant Pathology. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01365-6>.
- Groves, J.W. & Skolko, A.J. (1.944) Notes on seed-borne fungi: *Stemphylium*. Canadian Journal of Research 22c: 190–199. <https://doi.org/10.1139/cjr44c-016>.
- Gupta, R.P. y Srivastava, P.K. (1988). Control of *Stemphylium* blight of onion bulb crop. Indian Phytopathology 41 495–496.
- Guzmán Lyon, G. (2003). Identificación de especies de *Phytophthora* asociadas a *Prunus spp.*, efecto de la saturación del suelo en el desarrollo de la pudrición radical y del cuello causada por *P. cryptogea* en portainjertos para duraznero y evaluación de nuevos fungicidas. Tesis Magíster en Ciencias Vegetales, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Dirección de Investigación y Postgrado, Programa de postgrado en Ciencias de la Agricultura. 63 pp.
- Harris, D.C. (1991). The *Phytophthora* diseases of apple. Review article. Journal of Horticultural Science 66:513-544.
- Hernández, E. B. (1999). Mancha negra en peral. Cuaderno de Campo, Sanidad Vegetal, 13, 35–39.
- INTA (2009). La fruticultura en las provincias de Río Negro y Neuquén. <https://inta.gob.ar/documentos/fruticultura-en-los-valles-de-rio-negro-y-neuquen>.

- Johnson, D.A. (1987). First report in Washington State of the teleomorph of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of purple spot of asparagus. *Plant Disease*. 71:192.
- Keisuke, T. & Toyozo, S. (2011). Fruit rot of sweet pepper caused by *Stemphylium lycopersici* in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 77, 342–344. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0337-7>.
- Kim, B.S, Yu, S.H., Cho, H.J. & Hwang, H.S. (2004). Gray leaf spot in peppers caused by *Stemphylium solani* and *S. lycopersici*. *The Plant Pathology Journal* 20, 85–91. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2004.20.2.085>.
- Kirk, P., Cannon, P., David, J. & Stalpers, J. (2004). *Dictionary of the Fungi*.
- Koike, S.T. & Henderson, D.M. (2001). Leaf spot disease of spinach in California caused by *Stemphylium botryosum*. *Plant Disease* 85, 126–130.
- Koike, S.T., Van Berkum, P., Wolf, J., O’Neill, N. & Daugovish, O. (2013). *Stemphylium* leaf spot of parsley in California caused by *Stemphylium vesicarium*. *Plant Disease* 97 315–322. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-12-0611-re>.
- Kumar, P. (2007). Genetics of resistance to *Stemphylium* leaf blight of lentil (*Lens culinaris*) in the croos barimasur-4 x CDC Milestone.68 p.
- Lacy, M.L. (1982). Purple spot: a new disease of young asparagus spears caused by *Stemphylium vesicarium*. *Plant Disease* 66 1198–1200.
- Lalatta, F. (2000). *Guía completa del cultivo de las peras*. Barcelona, España, Editorial De Vecchi.
- Lamprecht, S.C., Baxter, A. & Thompson, A.H. (1984). *Stemphylium vesicarium* on *Medicago spp.* in South Africa. *Phytophylactica* 16, 73–75.
- Liu, Y., Marmann, A., Abdel-Aziz, M.S., Wang, C.Y., Müller. W.E.G., Lin, W.H., Mándi. A., Kurtán, T., Daletos, G. & Proksch, P. (2015). Tetrahydroanthraquinone derivatives from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*. *European Journal of Organic Chemistry* 2015 2646–2653. <https://doi:10.1002/ejoc.201500079>.
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2002). Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology* 92: 99–104.
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2004). Development and Field Evaluation of a Model to Estimate the Maturity of Pseudothecia of *Pleospora allii* on Pear. *Plant Disease*. 88. 215-219. 10.1094/PDIS.2004.88.2.215

- Llorente, I. & Montesinos, E. (2006). Brown spot of pear: An emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease*, 90(11), 1368–1375. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1368>
- Llorente, I., Moragrega, C., Ruz, L., & Montesinos, E. (2012). An update on control of brown spot of pear. *Trees - Structure and Function*, 26(1), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0607-1>.
- Llorente, I., Vilardell, P., Bugiani, R., Gherardi, I. & Montesinos, E. (2000). Evaluation of BSPcast disease warning system in reduced fungicide use programs for management of brown spot of pear. *Plant Disease* 84, 631-637. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.631>.
- Llorente I., Vilardell P., Moragrega C., Bonaterra A. & Montesinos E. (2003). Biology, epidemiology and integrated control of *Stemphylium vesicarium* on pear, an emerging disease of economic impact in Europe. VIII International Congress of Plant Pathology, Christ Church: New Zealand.
- Mehta, Y.R., Agron, I. & Postal, C. (1998). Severe outbreak of *Stemphylium* leaf light, a new disease of cotton in Brazil. *Plant Disease* 82 333–336.
- Mehta, Y.R., Brogin, R.L., Paraná-iapar I.A. & Postal, C. (2000). Phytotoxicity of a culture filtrate produced by *Stemphylium solani* of cotton. *Plant Disease* 84 838–842.
- Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas de la Nación (2016). Informes de Cadenas de Valor: Frutícola - Manzana y Pera. 1–58. <http://economia.gob.ar>.
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., & Vilardell, P. (1995a). Susceptibility of selected European pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age. In *Plant Disease* (Vol. 79, Issue 5, pp. 471–473). <https://doi.org/10.1094/PD-79-0471>
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P., Bonaterra, A., Ponti, I., Bugiani, R., Cavanni, P., & Brunelli, A. (1995b). Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. *Phytopathology* 85:586-592.
- Montesinos, E. & Vilardell, P. (1992). Evaluation of FAST as a forecasting system for scheduling fungicide sprays for control of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Plant Disease* Vol. 76, Issue 12, p. 1221. <https://doi.org/10.1094/pd-76-1221>
- Moreau, C. & Moreau, M. (1947). Sur les genres *Alternaria* et *Stemphylium*. *Bull Trimestr Soc Mycol France* 63 58–71.

- Nasehi, A., Kadir, J.B., Abidin, M.A.Z., Wong, M.Y. & Ashtiani, F.A. (2012). First report of gray leaf spot on pepper caused by *Stemphylium solani* in Malaysia. *Plant Disease* 96 1227–1227. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0262-PDN>.
- Obregon, V. (2018). Mancha gris de la hoja del Tomate. Manual técnico en tomate y pimiento. Syngenta, p 47.
- Polat, Z., Besirli, G., Sönmez, İ. & Yavuz, B. (2012) First report of *Stemphylium* leaf blight of garlic (*Allium sativum*) caused by *Stemphylium vesicarium* in Turkey. *New Disease Reports* (2012) 25, 29.
- Polfliet, M. (2002). Infection of *Stemphylium* increases every year. *Fruittelt Den Haag* 92: 16–17.
- Ponti, I.; Cavanni, P. & Bugiani, R. (1988). Maculatura bruna del pero. *Informato. Agrario*. 44(28): 55–59.8.
- Ponti, I. & Laffi, F. (1993). *Malattie crittogamiche delle piante da frutto*, Edizioni L'Informato. Agrario: Verona, Italy.
- Prados-Ligero, A. M.; González-Andújar, J. L.; Melero-Vara, J. M., & Basallote-Ureba, M. J. (1998). Development of *Pleospora allii* on garlic debris infected by *Stemphylium vesicarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 104(9), 861–870. <https://doi.org/10.1023/A:1008619604684>.
- Realise, D., Castagne, P., Coupard, H., Kaluzny-Pinon, L., Reynier, C., Waligora, C., & Zambujo, C. (2002). En France: l'année 2002 se fait la poire belle. *Arboriculture Fruitière* Re 565, 25–42.
- Rivero, V. (2011). *Phytophthora cactorum*: caracterización, epidemiología e incidencia en la productividad y en la calidad de frutos de peral cv. Williams. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Comahue – Universidad de Bologna.
- Rodríguez, A. B. (2009). Raleo sobre el tamaño del fruto de peral (*Pyrus comunis*) cv Williams durante sus distintas fases de desarrollo. Tesis de Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba.
- Rodríguez, A. B. & Gastiazoro, J. (2010). Capítulo 4: Fenología y polinización. En: *Pera William's: Manual para el productor y empacador*. Pro Río Negro (Ed.). 27 p.
- Rodríguez, A. B. & Holzmann, R. (2017). Características edafoclimáticas los valles irrigados de la Norpatagonia. Artículo de divulgación. <https://inta.gob.ar/documentos/caracteristicas-edafoclimaticas-los-valles-irrigados-de-la-norpatagonia>.

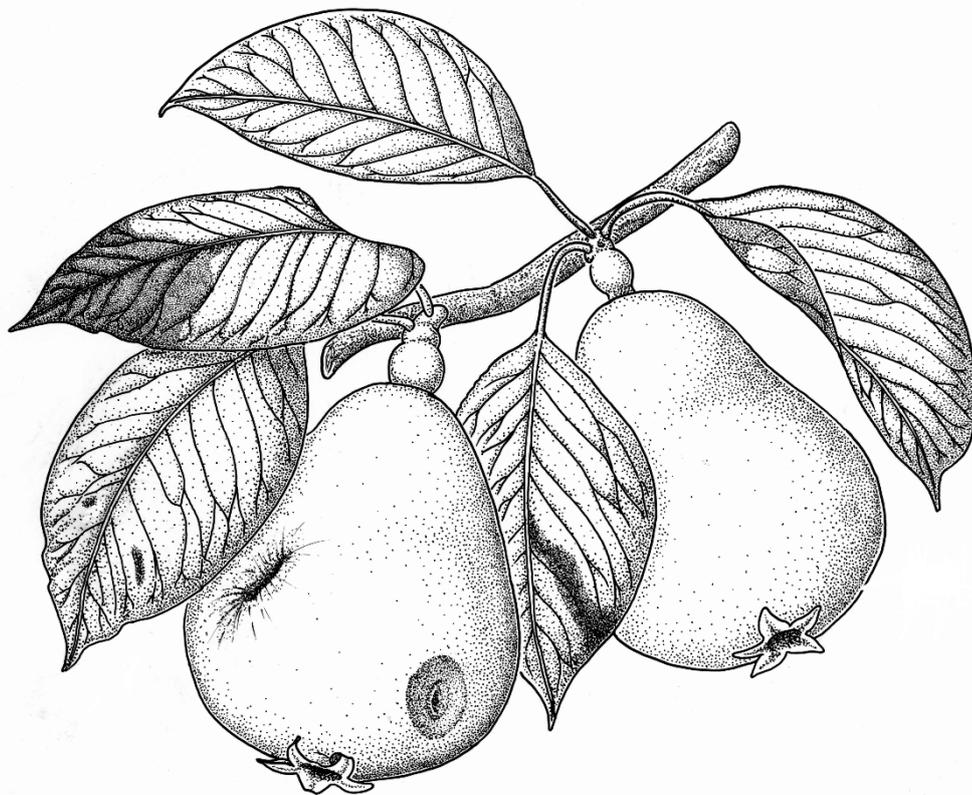
- Rodríguez, A. B. & Muñoz, A. R. (2006). Síntesis agrometeorológica para el período 1990-2004. EEA Alto Valle. Boletín de divulgación técnica N.º 53. EEA Alto Valle. CR Patagonia Norte. General Roca, Argentina. 38 pp.
- Rodríguez, A. B. & Muñoz, A. R. (2022). Variabilidad agroclimática en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Análisis de los últimos 50 años. INTA Ediciones. Centro Regional Patagonia Norte.
- Rossi, V., Patteri, E., Giosué, S., & Bugiani, R. (2005a). Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology*, 111(4), 361–370. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-5273-3>
- Rossi, V., Bugiani, R., Giosué, S., & Natali, P. (2005b). Patterns of airborne conidia of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot disease of pears, in relation to weather conditions. *Aerobiologia*, 21(3–4), 203–216. <https://doi.org/10.1007/s10453-005-9002-y>.
- Rossini, M.N. (2001). Oídios de frutales de clima templado. En: Oídios. Stadnik, M.J. y M.C. Rivera (Eds.). Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna. pp. 335-360.
- Rossini, M.N. (2007). Relevamiento e incidencia de virosis en frutales de pepita en el Alto Valle de Río Negro. Tesis para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela para Graduados. 122 pp.
- Rossini, M., Dobra, A., & Di Masi, S. (1997). Las podredumbres radicales y del cuello en manzanos y perales en Alto Valle de Río Negro y Neuquén. *RIA Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 28: 73-79.
- Rossini, M. N. & Giayetto, A. L. (2010). Enfermedades y su manejo en el cultivo (Capítulo 9). En: *Pera William's: Manual para el productor y empacador*. Pro-Río Negro (Ed.). 100 p.
- Senasa (2019). Anuario estadístico 2019. Centro regional Patagonia Norte. ISSN 2545-8124. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anuario\\_estadistico\\_2019\\_crpn\\_senasa.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anuario_estadistico_2019_crpn_senasa.pdf)
- Shishkoff, N. and Lorbeer, J.W., (1989). Etiology of *Stemphylium* Leaf Blight of Onion. *Phytopathology*. 79. 10.1094/Phyto-79-301. <https://doi.org/10.1094/Phyto-79-301>.
- Simmons, E.G. (1969). Perfect states of *Stemphylium*. *Mycologia* 61 1–26.
- Simmons, E.G. (1985). Perfect states of *Stemphylium* II. *Mycologia* 38 284–293.
- Simmons, E.G. (1989). Perfect states of *Stemphylium* III. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 49 305–307.

- Simmons, E.G. (2001). Perfect states of *Stemphylium* IV. Harvard Papers in Botany 6 199–208.
- Simmons, E.G., Road, T. & Simmons, C.E.G. (2004). Novel dematiaceous hyphomycetes. Studies in Mycology 50 109–118.
- Singh, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H., & Kohmoto, K. (1999). Purification and biological characterization of host-specific SV-toxins from *Stemphylium vesicarium* causing brown spot of European pear. Phytopathology, 89(10), 947–953. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.10.947>.
- Singh, P., Park, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H. & Kohmoto K. (2000). Effects of host-selective SV-toxin from *Stemphylium vesicarium*, the cause of brown spot of European pear plants, on ultrastructure of leaf cells. J Phytopathol 148:87–93.
- Sosa, M. C. & Lutz, M. C. (2020). Minireview Enfermedades del peral (*Pyrus communis*) en montes comerciales de la Norpatagonia Argentina. <http://aafitopatologos.com.ar/wp/wp-content/uploads/2014/11/Boletin-N6-Agosto-2020.pdf>.
- Suheri, H. & Price, T. V. (2000). *Stemphylium* leaf blight of garlic (*Allium sativum*) in Australia. Australasian Plant Pathology 29 192–199. <https://doi.org/doi:10.1071/AP00034>.
- Takeuchi, J. & Horie, H. (1997). Occurrence of leaf spot of drummond phlox caused by *Stemphylium botryosum*. Proceedings of the Kanto Tosan. Plant Protection Society 44, 171–173.
- Tanahashi, M., Minoguchi, C., Yokoyama, K., & Otani, H. (2008). The first report of brown spot of European pear caused by *Stemphylium* sp. in Niigata prefecture Japan. Japanese Journal of Phytopathology, 74,183.
- Van Dijke, J.F. (2002). Incidence of pear fruit spot can increase explosively. Fruitteelt Den Haag 92: 8–9.
- Vera Bahima, J. (2020). Hongos causantes de la mancha gris de la hoja en *Lycopersicon esculentum* Mill., su variabilidad y el rol de la resistencia sistémica adquirida (RSA) en la reducción de su incidencia. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- Vilardell, P. (1988). *Stemphylium vesicarium* en plantaciones de peral. Fruticultura profesional 18, 51–55.
- Wallroth, C.F.W. (1833). Flora Cryptogamica Germaniae: pars posterior continens Algas et Fungos. Nürnberg (Norimbergae, Sumtibus JL Schragii). Compendium Flora Germanicae

Sectio II, Plantae cryptogamicae S. cellulosa scripserunt Math. Jos. Bluff et Carol. Ant. Fingerhath.

- Wiltshire, S.P. (1938). The original and modern conceptions of *Stemphylium*. Transactions of the British Mycological Society 21 211–239. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(38\)80024-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(38)80024-3).
- Worcel, G. (2006). Diagnóstico regional del Alto Valle de Río Negro. Proyecto FAO TCP/ARG/3002. [http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/programas/fao\\_sagpya/3002/DiagRegionalAV.pdf](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/programas/fao_sagpya/3002/DiagRegionalAV.pdf).
- Wu, P.C., Tsai, J.C., Li, F.C., Lung, S.C. & Su, H.J. (2004). Increased levels of ambient fungal spores in Taiwan are associated with dust events from China. Atmospheric Environment 38 4879–4886. <https://doi.org/10.1016/J.ATMOENV.2004.05.039>.

## Capítulo 2 : Caracterización de la patología, aislamiento, identificación y caracterización del agente causal





## Introducción

En enero de 2013 se produjo la primera detección de mancha marrón del peral en Argentina, en la zona de Valle Medio, afectando hojas y frutos del cultivar (cv.) D'Anjou (Dobra & García, 2015). A partir del año 2016 se identificó a la enfermedad en diversos establecimientos productivos y afectando distintos cultivares en la zona del Alto Valle (Di Masi, 2017; Temperini et al., 2022; Tudela & Di Masi, 2022).

La región del Alto Valle es la principal zona exportadora de peras del hemisferio sur (CAFI, 2022). Dada la importancia del cultivo, la aparición de esta enfermedad, que en otras zonas del mundo causa pérdidas económicas considerables, representa un riesgo potencial para la producción local.

La mancha marrón del peral afecta a los órganos verdes de la planta, siendo particularmente dañina para los frutos, sobre los que origina el desarrollo de podredumbres más o menos graves. Los daños se producen como resultado de infecciones a través de aperturas naturales de la planta como estomas y lenticelas (Hernández, 1999). Inicialmente, las manchas de los frutos jóvenes son circulares, marrones y varían de 1 a 2 mm de diámetro, y pueden estar rodeadas por un halo rojo; en frutos maduros las manchas aumentan de tamaño (Llorente & Montesinos, 2006). Los síntomas en frutos jóvenes suelen localizarse en el cáliz, mientras que en frutos maduros se desarrollan manchas necróticas en la zona ecuatorial (Llorente et al., 2012). Los síntomas en hojas consisten en manchas necróticas, de color marrón oscuro y de forma inicialmente circular, que van progresando en forma de cuña y pueden llegar a ocupar casi toda la hoja, lo cual puede provocar defoliaciones prematuras; y en casos graves, pueden aparecer manchas de iguales características afectando a brotes no lignificados (Hernández, 1999).

Normalmente, las especies de *Stemphylium* se identifican mediante su morfología conidial (forma, tamaño, color, tabicación y ornamentación de la superficie) y características del conidióforo (longitud y diámetro de sus células apicales hinchadas) (Kurose et al., 2015). Sin embargo, muchas de estas características se superponen entre las especies y varían de acuerdo con las condiciones de cultivo, particularmente la temperatura y composición del medio (Hosen et al., 2009; Leach & Aragaki 1970; Kurose et al., 2015). Por el contrario, los análisis de secuencias de ADN son mucho más confiables para la identificación y clasificación de especies ya que dichas secuencias generalmente no son alteradas por el medio ambiente (Moralejo et al., 2008; Kurose et al., 2015). Muchos autores sugieren realizar la identificación mediante un enfoque multilocus, empleando ITS y EF-1 $\alpha$  para verificar las relaciones taxonómicas entre aislamientos del género *Stemphylium* (Inderbitzin et al.,

2009; Köhl et al., 2009b; Kurose et al., 2015; Moslemi et al., 2017). Sin embargo, por sí solo el gen EF-1 $\alpha$  proporciona una muy buena resolución taxonómica de los aislamientos *S. vesicarium* (Temperini et al., 2022).

Para realizar ensayos in vitro se debe disponer de medios de cultivo donde crezca de manera adecuada y sea capaz de producir abundante cantidad de esporas. Según la bibliografía, el medio de cultivo agar V8, es muy utilizado para la producción de inóculo *S. vesicarium*, donde se incuba por 14-15 días a una temperatura de 20-25 °C y con un fotoperíodo de 12 horas (Llorente & Montesinos, 2002; Llorente & Montesinos, 2004; Rossi et al., 2005; Alberoni et al., 2005; Rossi & Pattori, 2009; Alberoni et al., 2010; Kurose et al., 2015; Tanahashi et al., 2017; Cappai et al., 2018).

## Objetivo general

Caracterizar la sintomatología asociada a la mancha marrón del peral en la zona del Alto Valle de Río Negro, Argentina. Identificar morfológica y molecularmente al agente causal. Seleccionar un medio de cultivo que permita su adecuado crecimiento y esporulación.

## Objetivos específicos

1. Aislar el microorganismo *Stemphylium vesicarium* desde hojas y frutos afectados por la enfermedad, y constituir un cepario para su almacenamiento en el Laboratorio de Fitopatología de INTA.
2. Caracterizar la patología ocasionada por *Stemphylium vesicarium* en base a los síntomas en hojas y frutos observados a campo.
3. Identificar al agente causal de la enfermedad a nivel especie por técnicas morfológicas y moleculares.
4. Caracterizar la patogenicidad de un conjunto de cepas locales sobre frutos del cultivar D'Anjou.
5. Evaluar el crecimiento y la esporulación de *Stemphylium vesicarium* en diferentes medios de cultivo.

## Materiales y métodos

### Descripción de la patología y colección de aislamientos

En el período 2016-2020 se realizaron monitoreos en establecimientos productivos y se colectaron muestras de frutos y hojas con síntomas de la enfermedad, provenientes de distintos puntos del Alto Valle de Río Negro (localidades de Belisle, Villa Regina, Ingeniero Huergo, General Roca, Cipolletti y Campo Grande). Por cada localidad, variedad, y temporada, se colectaron 10 hojas y 10 frutos sintomáticos de las variedades Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel, en caso de registrar síntomas. El material fue trasladado al laboratorio de Fitopatología de la EEA Alto Valle de INTA, donde se registraron los síntomas y se dispuso el material para los aislamientos.

Los frutos sintomáticos se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto, luego se enjuagaron con agua destilada estéril (ADE). Mediante un corte con bisturí estéril se tomaron trozos de tejido de la zona de avance y se sembraron en placa de Petri de 9 cm de diámetro con medio agar papa dextrosa (PDA, Anexo I) según Belisario et al., 2002 (Figura 2.1).

Para el aislamiento desde tejido foliar, las hojas se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, se enjuagaron 3 veces con ADE. Luego se cortaron trozos de lámina foliar de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> y estos se desinfectaron nuevamente por inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5% por un minuto, seguido de 3 enjuagues con ADE (adaptado de Rossi et al., 2005). Los trozos se sembraron en placas de 9 cm de diámetro con PDA.

### Obtención de cultivos monospóricos

Los aislamientos fueron cultivados en placas de Petri con medio agar agua (AA, Anexo I), e incubados por 15 días a 24 °C.

Transcurrido el periodo de incubación, las placas se transportaron a la cámara de flujo laminar, las superficies de las placas se frotaron suavemente con un haza luego de añadir 9 mL de ADE y una gota de Tween 20.

Sin ajustar concentración, se tomaron 40 µl de cada suspensión y se esparcieron con una varilla de vidrio sobre la superficie de una placa de Petri con medio AA. Las placas se incubaron por 24 horas,

a 24 °C, en oscuridad. De cada placa se extrajo un único conidio germinado y se cultivó en una placa de Petri con medio PDA (Figura 2.2).

Los aislamientos fueron nombrados con número acompañado de dos letras, S indicando el género *Stemphylium* y F o L, indicando si fue obtenido desde fruto u hoja respectivamente.

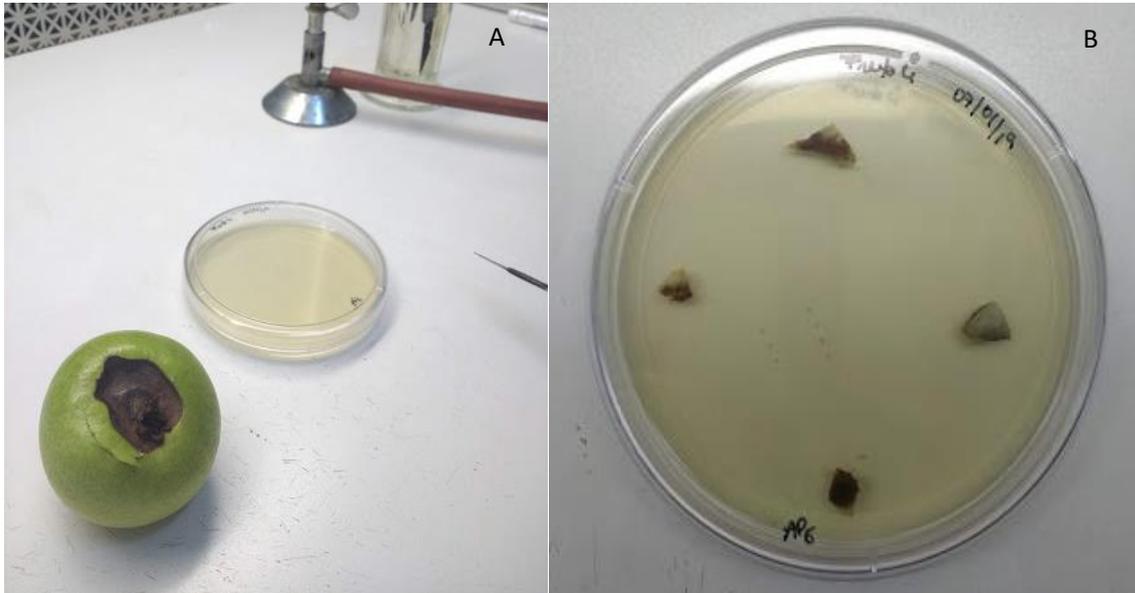


Figura 2.2: Procedimiento de aislamiento de *S. vesicarium* desde fruto. Extracción de porciones de tejido de la zona de avance de la podredumbre, por medio de bisturí (A). Siembra de las porciones de tejido en placa con medio PDA (B).

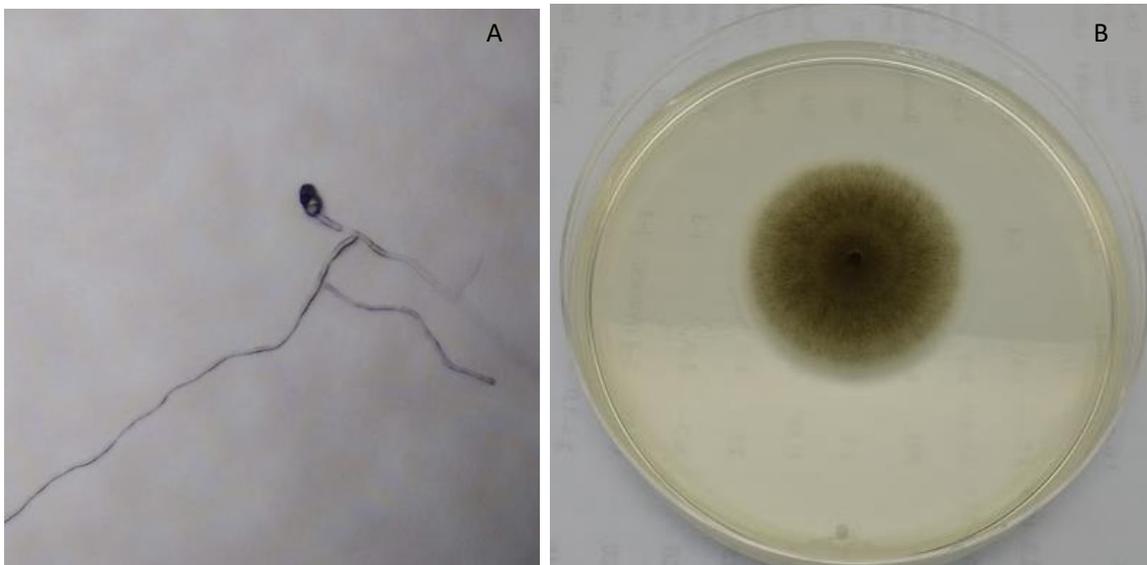


Figura 2.2: Obtención de cultivo monospórico de *S. vesicarium*. Espora germinada (A). Colonia obtenida de una única espore (B).

## Descripción morfológica y micro morfológica de los aislamientos

Se eligieron al azar 21 aislamientos monospóricos, se cultivaron en placas de Petri de 9 cm con V8 y PZA (Anexo I).

Los cultivos fueron incubados durante 25-30 días a una temperatura de 15-25 °C bajo luz azul fluorescente para inducir la esporulación, de acuerdo con la metodología utilizada por Kurose et al., 2015. Luego de este período se conservaron a 5 °C, en heladera.

Se registraron las características macroscópicas de las colonias, considerando el crecimiento, topografía, pigmentación, y textura. Se midieron observaron 50 conidios de cada aislamiento, registrando el largo y ancho, número de septos transversales y longitudinales, número de constricciones, forma, textura, y forma del ápice. Para la caracterización de los conidios se utilizó un microscopio óptico (Motic BA210) utilizando un aumento total de 400X.

## Identificación molecular

### Colección de cepas para extracción de ADN

Los 21 aislamientos monospóricos que fueron caracterizados morfológicamente se cultivaron en PDA durante 7 días a 25 °C. A partir de ellos se tomaron asépticamente fragmentos de micelio y se inocularon en viales conteniendo 5 mL de caldo YES. Los viales se incubaron a 25 °C durante 48 a 96 horas hasta la observación de una capa de micelio sin esporas (Figura 2.3).



Figura 2.3: Crecimiento de micelios de *S. vesicarium* en medio YES luego a las 96 horas.

## Extracción de ADN total y cuantificación de los extractos

A partir de la colección obtenida, se extrajeron los micelios de las 21 cepas, bajo cámara de flujo laminar, llevándolos a sequedad con papel de filtro Whatman N° 1. Se particionaron en muestras de 0,1 g. en tubos Eppendorf estériles de 1,5 mL de capacidad y se congelaron a -20 °C. Los micelios congelados se molieron utilizando nitrógeno líquido y pilones plásticos estériles.

La extracción de ADN se realizó con el DNeasy Plant Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Intl). El ADN total se cuantificó con el fluorímetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Intl.). La calidad de las moléculas extraídas se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % conteniendo Gel Red. La corrida electroforética se realizó con un buffer TBE 0,5X (Tris base, ácido bórico y EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético) (Sambrook et al., 1989) a 70V, por aproximadamente 30 minutos. Las bandas fueron observadas bajo luz UV de un lector de geles Maestro Gen SMU-01 por determinación de la fluorescencia emitida por el agente intercalante en las moléculas de ADN.

## Amplificación y secuenciación

Para obtener resolución a nivel de especie, mediante amplificación por PCR, se obtuvieron fragmentos parciales del gen del factor de elongación de traducción 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) y se secuenciaron para identificar los aislamientos.

Las amplificaciones por PCR para el gen EF-1 $\alpha$  se realizaron utilizando los cebadores EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG y EF1-986R: TACTTGAAGGAACCCTTACC (Carbone y Khon, 1999). Las reacciones contenían un volumen total de 40  $\mu$ l con 20 ng de ADN molde, tampón de PCR 1X, 0,5  $\mu$ M de cada cebador (GBT Oligos, Buenos Aires), 0,2 mM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 1%, DMSO y 0,5 U de Tag polimerasa (Thermo Fischer Scientific, Invitrogen Argentina SA). En el caso del control negativo se adiciono agua en lugar de ADN.

Los tubos de reacción se colocaron en un termociclador (Multigene Gradient Labnet International Cycler). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 8 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, temperatura de hibridación a 48 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto, con un paso final de extensión a 72 °C durante 5 minutos.

Para la visualización de los amplicones obtenidos, se sembraron 10 µl de cada producto de reacción con 5 µl de un buffer de carga 6X (sacarosa y azul de bromofenol) (Sambrook et al., 1989) sobre un gel de agarosa al 1% conteniendo Gel Red. En paralelo se sembró el control negativo y un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb). La corrida electroforética se realizó con buffer TBE 0,5X a 90V por aproximadamente 60 minutos. Las bandas fueron observadas bajo luz UV del lector de geles.

La purificación y secuenciación de fragmentos amplificados se realizó a través del servicio que ofrece la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias fueron comparadas con secuencias de ADN fúngico de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando una búsqueda de BLAST para identificar las especies. Posteriormente las secuencias fueron almacenadas en la página del NCBI.

### Análisis filogenético

Se procedió a los análisis filogenéticos de las secuencias de cada uno de los aislamientos bajo estudio con el paquete de programas MEGA 7 (Kumar y col., 2018). Para ello, secuencias de referencia identificadas a través de la búsqueda de Blast, fueron obtenidas de GenBank. La secuencia de *Cercospora beticola*, cepa CPC 18813, se usó como grupo externo para enraizar el árbol. Las secuencias de nucleótidos de los aislamientos se alinearon junto con las secuencias de referencia utilizando el algoritmo Muscle (Edgar 2004), y cuando fue necesario se ajustaron manualmente.

El estudio filogenético se realizó utilizando los análisis de máxima verosimilitud con los parámetros de Kimura 2 utilizando el modelo de distribución Gamma y el tratamiento de los “gaps”, y los “missing data” como delección parcial (Greco et al., 2015). Los valores de “Bootstrap” se generaron con 1000 réplicas y se consideraron significativos cuando eran superiores al 85%. El alineamiento EF-1α constó de aproximadamente 257 posiciones de nucleótidos.

### Patogenicidad en frutos

En este experimento se evaluó la capacidad de 21 aislamientos de *Stemphylium vesicarium* para producir infección en frutos del cultivar de peral D'Anjou, utilizando la técnica de inoculación del montadientes. A modo de control, se utilizaron frutos del cv. de manzana Red Delicious.

## Material vegetal

Se utilizaron peras (*Pyrus communis*) de la variedad D'Anjou y manzanas (*Malus domestica*) de la variedad Red Delicious, las cuales fueron obtenidos de árboles frutales en buen estado nutricional y sanitario, desde una parcela perteneciente a la estación experimental agropecuaria de INTA Alto Valle. Los frutos se cosecharon y se trasladaron al laboratorio de Fitopatología, se desinfectaron por inmersión durante un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y se enjuagaron con ADE.

## Producción del inóculo

Para la preparación del inóculo se utilizó la técnica del montadientes (Andersen y col., 2002). Se emplearon los 21 aislamientos monospóricos previamente identificados morfológica y molecularmente. Desde colonias de 7 días de crecimiento, se tomaron discos de 5 mm de diámetro desde sus bordes, y se dispusieron en placas de Petri de 9 cm conteniendo PDA, colocando 4 discos de un mismo aislamiento por placa. Los montadientes fueron partidos en mitades y autoclavados 5 veces en agua destilada y una en caldo papa dextrosa. Una vez estériles fueron colocados de a pares, equidistantemente del disco colocado previamente en las placas. Se incubaron por 15 días a 25 °C, periodo en que las cepas los colonizaron (Figura 2.4).

## Inoculaciones

Los frutos se inocularon introduciendo los montadientes a una profundidad aproximada de 8 mm. Se utilizaron 3 peras y 3 manzanas por aislamiento. Cada fruto fue inoculado con 2 montadientes, uno con inóculo y el otro sin inóculo (control). Luego los frutos fueron colocados individualmente en bolsas plásticas transparentes y se incubaron durante 15 días a 25 °C (Figura 2.5).

## Determinación de la patogenicidad

Concluido el periodo de incubación se determinó la severidad, considerando el promedio de los diámetros transversales de cada podredumbre. Las lesiones se clasificaron según su diámetro según

la siguiente escala propia: lesiones leves (menores a 15 mm de diámetro), medias (de 15 a 25 mm de diámetro), y graves (más de 25 mm de diámetro).

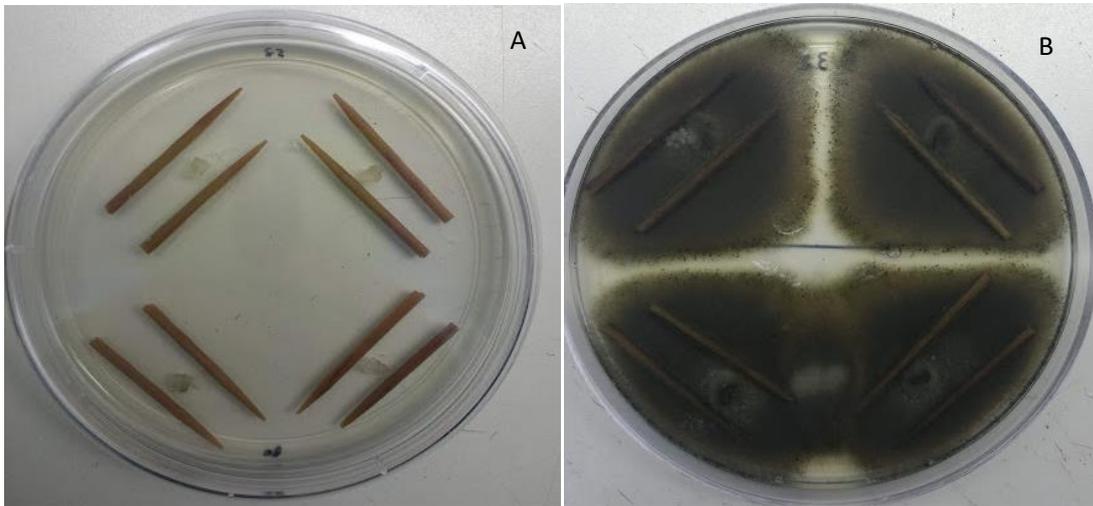


Figura 2.4: Producción del inóculo de *S. vesicarium* en medio PDA con la técnica del montadientes. Placa recién sembrada (A). Placa de 15 días de incubación (B).



Figura 2.5: Inoculación de peras con inóculo de *S. vesicarium* utilizando la técnica del montadientes (A) e incubación (B).

### Diseño del experimento y análisis

Se empleó un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por aislamiento.

El ensayo se realizó por dos veces. Se seleccionó un modelo lineal con variable respuesta diámetro de podredumbre y como variable predictora cepa. Luego de verificar la normalidad y homocedasticidad de los datos, se realizó un análisis de la varianza y un test de Tukey para la comparación de medias.

### Crecimiento y esporulación en distintos medios de cultivo

De los aislamientos de *S. vesicarium de alta* patogenicidad caracterizados en el experimento anterior, se seleccionaron al azar 3 de ellos, SF23, SF20, y SF5, y se cultivaron en los siguientes medios: PDA, V8, PZA, AA y APP (Anexo I). Todos los medios fueron esterilizados en autoclave durante veinte minutos a una atmósfera, y posteriormente se extendieron en las placas de Petri de 9 cm de diámetro. En el centro de cada placa, se depositó un disco de cinco mm de diámetro tomado de la periferia de una colonia desarrollada en PDA por siete días. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente (20-25°C) y con luz natural (fotoperíodo aproximado de 11-12 horas). Se emplearon 3 repeticiones por medio de cultivo y aislamiento, y el crecimiento se determinó tomando dos medidas del diámetro perpendiculares entre sí por placa, durante 7 días. Se determinó la velocidad de crecimiento en mm/día para cada réplica. Para la determinación de la esporulación, las placas se mantuvieron en incubación por 15 días. Luego, en cámara de flujo laminar, sus superficies se frotaron suavemente con un asa luego de añadir 9 mL de ADE y una gota de Tween 20. La suspensión fue filtrada a través de una gasa y homogeneizada. Se tomaron alícuotas de 15 ul y se realizó el conteo de conidios mediante la cámara de Neubauer.

Para cuantificar cantidad de conidios, se estableció la siguiente escala cuantitativa, poco abundante: entre 1 y  $10^2$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; abundantes:  $10^3$  a  $10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ; muy abundante:  $10^5$  o más conidios  $\text{mL}^{-1}$ .

### Análisis

Para analizar el crecimiento se ajustó un modelo lineal con variable respuesta diámetro de colonia a los 7 días, y como variable predictora medio de cultivo. Se realizó un análisis de la varianza y un test de Tukey de comparación de medias ( $\alpha=0,05$ ). Se empleó la versión 4.1.3 de R.

## Resultados

### Descripción de la patología y colección de aislamientos

Los síntomas registrados en frutos, provenientes de los distintos sitios muestreados, consistieron en manchas más o menos circulares, de color marrón oscuro a negro, de consistencia dura, un poco deprimida, de tamaño variable y en ocasiones rodeadas de un halo rojizo. La podredumbre presentó consistencia seca, penetrando en la pulpa en forma de cuña. En general, el tamaño de las manchas osciló entre 5 y 41 mm de diámetro, con un valor medio de 21,54 mm. La mayor proporción de frutos (61,5%) presentó las lesiones ubicadas en la zona ecuatorial, y el 38,5% restante en la zona calicinal. En las variedades Packham's y Williams, el diámetro de lesión osciló entre 5 y 15 mm, mientras que en D'Anjou y Abate Fetel el diámetro osciló entre 10 y 41 mm. Los síntomas en las hojas comenzaron como manchas circulares, de coloración marrón oscura intensa, y progresivamente se expandieron hacia los bordes, entre las nervaduras formando, por lo general, una mancha en forma de "V". Se observó que las hojas afectadas sufren una caída prematura. Solo se registraron estos síntomas en las variedades D'Anjou y Abate Fetel. Los síntomas, tanto en hojas como en frutos, coinciden con los descritos de las zonas productivas de pera europeas (Hernández 1999; Llorente & Montesinos 2006).



Figura 2.6: Síntomas de mancha marrón registrados en frutos de las variedades Williams (A), Packham's (B), Abate Fetel (C) y D'Anjou (D).

Para las muestras de Belisle, se identificó al patógeno afectando frutos de la variedad Packham's y D'Anjou, mientras que para las muestras de Villa Regina los aislamientos fueron negativos para el patógeno en cuestión. Se aisló el patógeno desde frutos de las variedades Packham's, D'Anjou y Abate Fetel provenientes de Ingeniero Huergo. En General Roca se detectó al patógeno afectando en gran medida a las variedades D'Anjou y Abate Fetel, tanto en hojas como en frutos, y en menor medida a frutos Packham's. Las muestras de pera Williams provenientes de Cipolletti resultaron positivas para el patógeno, así como las muestras de Packham's de la localidad de Campo Grande. Se obtuvieron en total 150 aislamientos, incluyendo aislamientos a partir de frutos y hojas (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Origen de los aislamientos de *S. vesicarium* obtenidos de las distintas localidades, variedades de pera, desde hojas o frutos.

<b>Localidad</b>	<b>Variedad</b>	<b>Frutos</b>	<b>Hojas</b>
<b>Belisle</b>	D'Anjou	4	0
	Abate Fetel	0	0
	Packham's	2	0
	Williams	0	0
<b>Villa Regina</b>	D'Anjou	0	0
	Abate Fetel	0	0
	Packham's	0	0
	Williams	0	0
<b>Ingeniero Huergo</b>	D'Anjou	15	12
	Abate Fetel	15	13
	Packham's	10	0
	Williams	0	0
<b>General Roca</b>	D'Anjou	25	15
	Abate Fetel	20	14
	Packham's	0	0
	Williams	0	0
<b>Cipolletti</b>	D'Anjou	0	0
	Abate Fetel	0	0
	Packham's	0	0
	Williams	2	0

<b>Campo Grande</b>	D'Anjou	0	0
	Abate Fetel	0	0
	Packham's	3	0
	Williams	0	0
<b>Aislamientos totales</b>		<b>96</b>	<b>54</b>

### Descripción morfológica y micro morfológica de los aislamientos

El crecimiento en los medios V8 y PZA de los 21 aislamientos mostró características morfológicas consistentes con *S. vesicarium* (Simmons, 1969; 1985, 1989, 2001).

Las colonias en medio de cultivo V8 presentaron color marrón claro a grisáceo con abundante micelio aéreo blanco, de textura algodonosa. Sus márgenes se observaron incoloros y regulares.

En el medio PZA, las colonias fueron blanquecinas o incoloras, con escaso micelio aéreo. Solo en el centro de la colonia mostraron características similares al medio V8 (Figura 2.7).

En ambos medios, las colonias cubrieron todo el diámetro de una placa de Petri de 90 mm después de tres semanas de incubación a una temperatura de 15-25 °C bajo luz azul fluorescente.

En la Tabla 2.2 se detallan las medidas obtenidas para los conidios según el medio de cultivo.

Los conidios se desarrollaron solitarios, presentaron forma ovoide a oblonga, redondeada en el ápice, con 1-6 septos transversales y 0-4 septos longitudinales, de color marrón, con ornamentación de pared verrucosa (Figura 2.8).

Los conidióforos fueron cilíndricos, sin ramificaciones, proliferantes, de color marrón claro, con las células apicales aplastadas de un color marrón más oscuro.

En ambos medios, todos los aislamientos desarrollaron pseudotecios en abundancia, que maduraron luego de 6 a 9 meses de incubación (los primeros 25-30 días a una temperatura de 15-25 °C y luego a 5 °C en heladera).

Los pseudotecios presentaron, por lo general, forma redondeada u ovalada, color marrón oscuro a negruzco un diámetro de 1-2 mm, siendo fácilmente observables a simple vista. Las ascas hialinas, de 140-160 µm de largo por 25-35 µm de ancho, contenían 8 ascosporas oblongas o elipsoidales de color amarillento a marrón, según su estado de madurez, cada una de 32-35 µm de largo por 10-12 µm de ancho, presentando hasta 6 septos transversales y múltiples septos longitudinales (Figura 2.9).

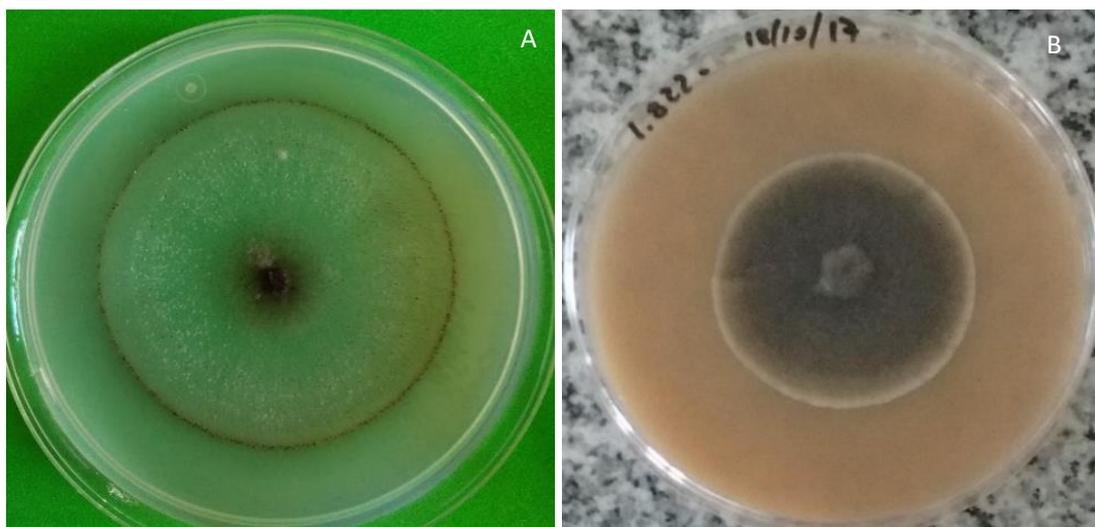


Figura 2.7: Desarrollo de un aislamiento de *S. vesicarium* a 10 días de incubación, sobre medio PZA (A) y sobre medio V8 (B).

Tabla 2.2: Características morfológicas conidiales según medio de cultivo.

Medio de cultivo	Características morfológicas	Media $\pm$ D.E.
PZA	Largo del conidio ( $\mu\text{m}$ )	23,33 $\pm$ 4,03
	Ancho conidio ( $\mu\text{m}$ )	13,44 $\pm$ 2,13
	Relación largo/ancho	1,76 $\pm$ 0,29
	Nº septos transversales	2,67 $\pm$ 0,81
	Nº septos longitudinales	1,00 $\pm$ 0,37
	Constricciones	0,80 $\pm$ 0,44
V8	Largo del conidio ( $\mu\text{m}$ )	22,89 $\pm$ 4,04
	Ancho conidio ( $\mu\text{m}$ )	12,87 $\pm$ 4,15
	Relación largo/ancho	1,85 $\pm$ 0,41
	Nº septos transversales	2,59 $\pm$ 0,77
	Nº septos longitudinales	0,91 $\pm$ 0,52
	Constricciones	0,80 $\pm$ 0,53

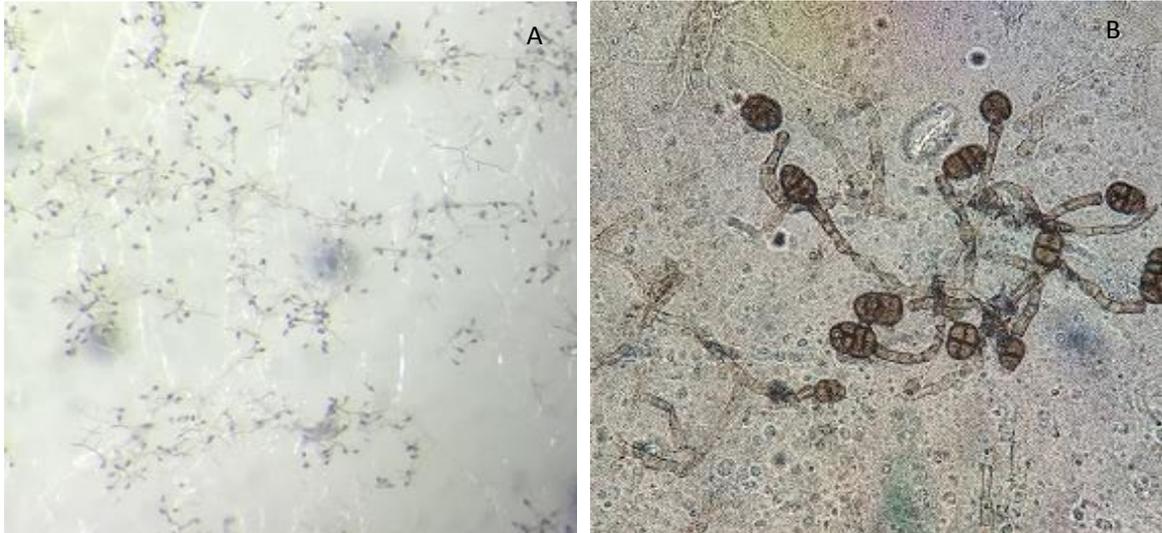


Figura 2.8: Conidios de *S. vesicarium* desarrollados en medio PZA, vista en lupa (A) y en microscopio (B).

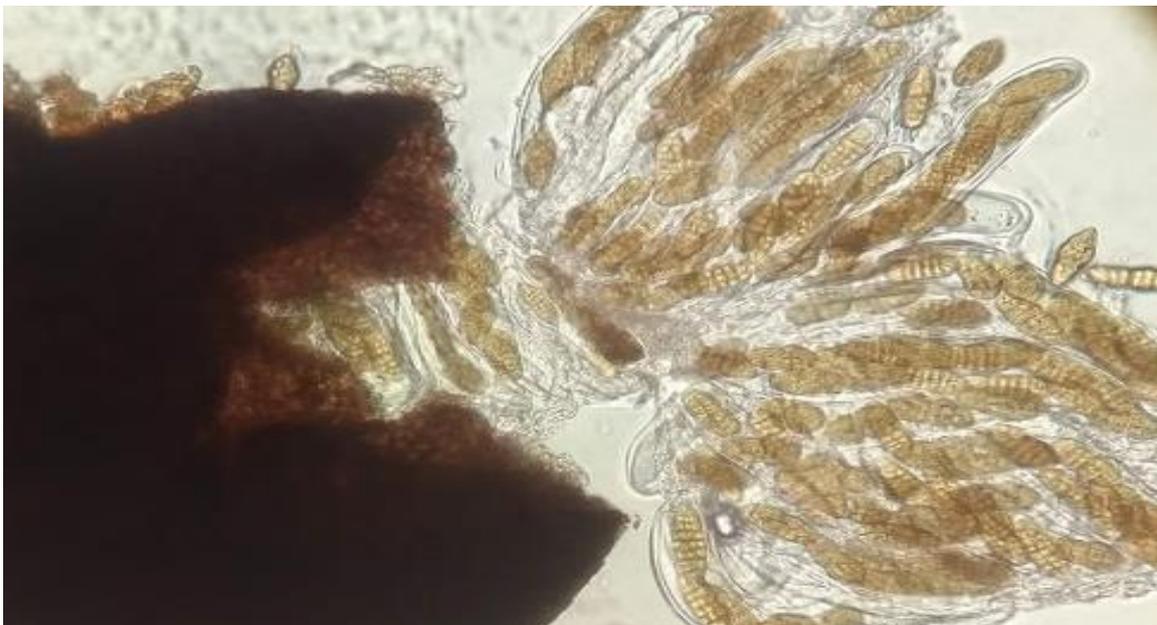


Figura 2.9: Vista microscópica de un pseudotecio con ascas y ascosporas maduras.

### Identificación molecular

Las secuencias obtenidas se agruparon en un clado terminal fuertemente respaldado por un alto valor de “Bootstrap” que contenía las referencias de cepas de *S. vesicarium*, incluida la cepa depositada por Simmons (1969) y secuenciada por Inderbitzin et al. (2005) (EGS 37-067) y los aislamientos depositados por Moslemi et al. (2017) (BRIP: 65181) y por Woudenberg et al. (2017)

(CBS 191.86). El análisis filogenético basado en el fragmento del gen EF-1 $\alpha$  resultó en la confirmación molecular de todos los aislados como *S. vesicarium* (Figura 2.10). Los geles, secuencias de genes y cromatogramas se pueden observar en el Anexo II.

Debido al concepto de un solo nombre (McNeill et al., 2012), todos los aislamientos en estudio en este trabajo se denominan, según el estado anamorfo, como *S. vesicarium*. En la Tabla 2.3 se detallan los números de acceso de GenBank y la información sobre el origen de los aislamientos analizados.

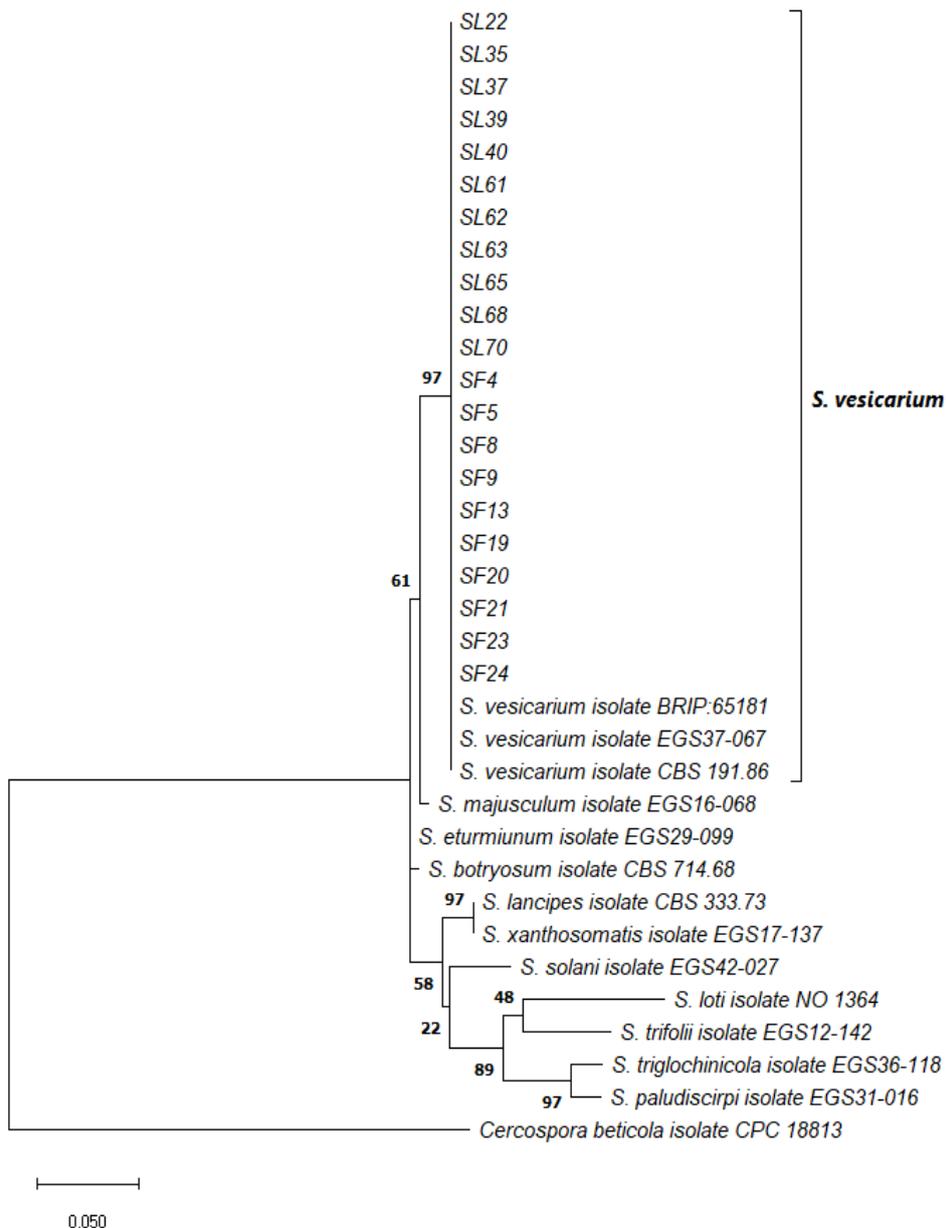


Figura 2.10: Árbol filogenético de 21 cepas de *S. vesicarium* del Alto Valle de Río Negro, Argentina.

Tabla 2.3: Información de origen geográfico, cronológico, origen vegetal, y códigos de acceso al GenBank de los aislamientos.

Aislamiento	Sitio de muestreo		Fecha de muestreo	Fuente de muestreo	Código de acceso de GenBank
	Latitud	Longitud			
<b>SF4</b>	-39.03503	-67.69505	18/03/2016	Fruto D'Anjou	MK424777
<b>SF5</b>	-39.03503	-67.69505	18/03/2016	Fruto D'Anjou	MK424778
<b>SF8</b>	-39,26783	-65.90949	28/03/2016	Fruto D'Anjou	MK424779
<b>SF9</b>	-39,26783	-65.90949	28/03/2016	Fruto D'Anjou	MK424780
<b>SF13</b>	-39.03503	-67.69505	05/01/2017	Fruto D'Anjou	MK424781
<b>SF19</b>	-39.03503	-67.69505	14/03/2017	Fruto D'Anjou	MK424782
<b>SF20</b>	-39.03503	-67.69505	14/03/2017	Fruto D'Anjou	MK424783
<b>SF21</b>	-39.03503	-67.69505	14/03/2017	Fruto D'Anjou	MK424784
<b>SF23</b>	-39.03503	-67.69505	31/05/2017	Fruto D'Anjou	MK424786
<b>SF24</b>	-39.03503	-67.69505	01/06/2017	Fruto D'Anjou	MK424787
<b>SL22</b>	-39.03503	-67.69505	23/03/2017	Hoja D'Anjou	MK424785
<b>SL35</b>	-39.06778	-67.60424	04/05/2018	Hoja D'Anjou	MW032465
<b>SL37</b>	-39.06778	-67.60424	22/11/2018	Hoja D'Anjou	MW032466
<b>SL39</b>	-39.06778	-67.60424	22/11/2018	Hoja D'Anjou	MW032467
<b>SL40</b>	-39.06778	-67.60424	22/11/2018	Hoja D'Anjou	MW032468
<b>SL61</b>	-39.06778	-67.60424	20/12/2018	Hoja D'Anjou	MW032469
<b>SL62</b>	-39.06778	-67.60424	20/12/2018	Hoja D'Anjou	MW032470
<b>SL63</b>	-39.06778	-67.60424	20/12/2018	Hoja D'Anjou	MW032471
<b>SL65</b>	-39.06778	-67.60424	20/12/2018	Hoja D'Anjou	MW032472
<b>SL68</b>	-39.06778	-67.60424	19/12/2018	Hoja D'Anjou	MW032473
<b>SL70</b>	-39.06778	-67.60424	19/12/2018	Hoja D'Anjou	MW032474

### Patogenicidad en frutos

Todos los aislamientos ocasionaron podredumbre sobre las peras D'Anjou, pero ninguno produjo síntomas sobre manzana. En los controles (frutos con montadientes sin inóculo), no se observó desarrollo de la enfermedad. El diámetro medio de podredumbre originado por el conjunto de aislamientos, a los quince días de incubación, fue de 23,73 mm. El tamaño medio de lesión originado por los aislamientos de fruto fue de 24,92mm y por los de hoja fue de 22,65 mm. De acuerdo con la

clasificación de la patogenicidad según el diámetro de lesión establecida, de los 10 aislamientos de hoja empleados, 2 presentaron patogenicidad leve (lesión menor a 15 mm de diámetro), 3 moderada (de 15 a 25 mm) y 6 graves (más de 25 mm). Por otro lado, de los 11 aislamientos de fruto, 1 presentó patogenicidad leve, 4 moderada, y 5 grave (Figura 2.11).

El modelo obtenido para el diámetro de lesión presentó un ajuste adecuado, con un  $R^2$  de 89%. Las variables repetición y origen del aislamiento no presentaron un aporte significativo, por lo que no se incluyeron en el análisis. La prueba ANOVA indicó que los aislamientos presentaron diferencias en cuanto a su patogenicidad, y según el test de Tukey, la cepa más patogénica fue la 23SF (Figura 2.12 C), con un valor medio de lesión de 39,4 mm. Por otro lado, los aislamientos menos patogénicos fueron 65 SL y 24 SF, con valores medios de 5,3 y 6,1 mm de diámetro de lesión respectivamente (Tabla 2.4).

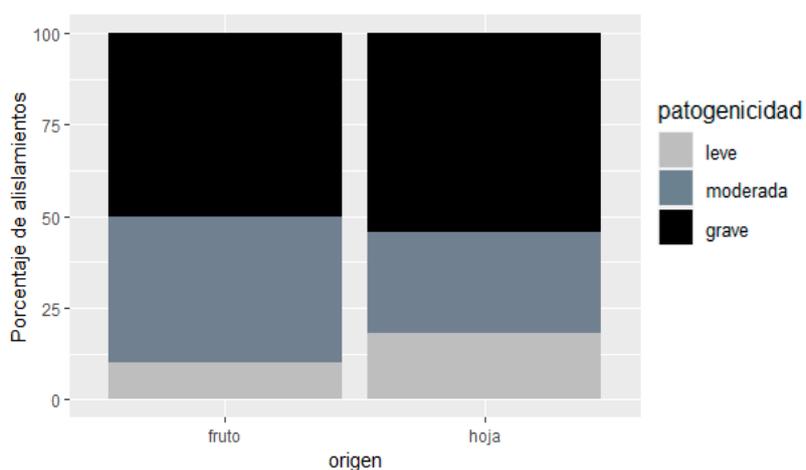


Figura 2.11 Porcentaje de aislamientos de *S. vesicarium* obtenidos de hojas y frutos que presentaron patogenicidad leve (lesiones menores a 15 mm de diámetro), moderada (de 15 a 25 mm) y grave (mayor a 25 mm).



Figura 2.12: Patogenicidad de las cepas SF24 (A), SL22 (B), y SF23 (C) de *S. vesicarium* inoculadas sobre peras D'Anjou e incubadas 10 días.

Tabla 2.4: Patogenicidad de las cepas de *S. vesicarium* sobre peras D'Anjou. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

<b>Cepa</b>	<b>Origen</b>	<b>Media ± DE</b>	<b>Patogenicidad</b>	<b>Grupo</b>
<b>65 SL</b>	hoja	5,29 ± 1,23	Leve	<b>a</b>
<b>24 SF</b>	fruto	6,21 ± 1,81	Leve	<b>ab</b>
<b>61 SL</b>	hoja	14,89 ± 8,08	Leve	<b>bc</b>
<b>19 SF</b>	fruto	17,10 ± 9,80	Moderada	<b>cd</b>
<b>22 SL</b>	hoja	17,11 ± 9,84	Moderada	<b>cd</b>
<b>5 SF</b>	fruto	17,85 ± 10,39	Moderada	<b>cde</b>
<b>62 SL</b>	hoja	18,10 ± 10,59	Moderada	<b>cde</b>
<b>9 SF</b>	fruto	19,23 ± 11,48	Moderada	<b>cde</b>
<b>39 SL</b>	hoja	20,29 ± 12,34	Moderada	<b>cde</b>
<b>4 SF</b>	fruto	24,41 ± 15,68	Moderada	<b>cdef</b>
<b>8 SF</b>	fruto	25,56 ± 16,63	Grave	<b>cdef</b>
<b>37 SL</b>	hoja	25,69 ± 16,74	Grave	<b>cdef</b>
<b>35 SL</b>	hoja	25,81 ± 16,84	Grave	<b>cdef</b>
<b>13 SF</b>	fruto	26,29 ± 17,24	Grave	<b>cdef</b>
<b>40 SL</b>	hoja	26,84 ± 17,69	Grave	<b>cdef</b>
<b>20 SF</b>	fruto	26,84 ± 17,68	Grave	<b>cdef</b>
<b>70 SL</b>	hoja	27,77 ± 18,46	Grave	<b>cdef</b>
<b>63 SL</b>	hoja	29,96 ± 20,30	Grave	<b>def</b>
<b>21 SF</b>	fruto	31,02 ± 21,18	Grave	<b>def</b>
<b>68 SL</b>	hoja	31,96 ± 21,98	Grave	<b>ef</b>
<b>23 SF</b>	fruto	39,4 ± 28,31	Grave	<b>f</b>

### Crecimiento y esporulación en distintos medios de cultivo

Los tres aislamientos fueron capaces de crecer sobre los diferentes medios analizados. El análisis de los datos indicó que el medio de cultivo tuvo un aporte significativo, por lo que dicho factor se incluyó

en el modelo, mientras que la identidad de los aislamientos no se incluyó ya que su aporte no fue significativo.

El test de Tukey señaló al medio AA como de menor diámetro, seguido por PZA y V8. Los medios que mostraron mayor diámetro de colonia fueron PDA y el medio similar al sustrato original (APP), sin diferencias significativas entre ellos.

La Figura 2.13 muestra el crecimiento medio diario de los aislamientos en cada medio de cultivo.

Con respecto a la producción de esporas, en los medio V8 y AA fue muy abundante, con concentraciones medias de  $10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y  $10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  respectivamente.

En el medio PZA fue abundante, con medias de  $10^3$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que en los medios PDA y APP resultó poco abundante, con concentraciones de  $10^2$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ .

En la Tabla 2.5 pueden observarse los valores medios de velocidad de crecimiento y cantidad de esporas producidas por medio de cultivo.

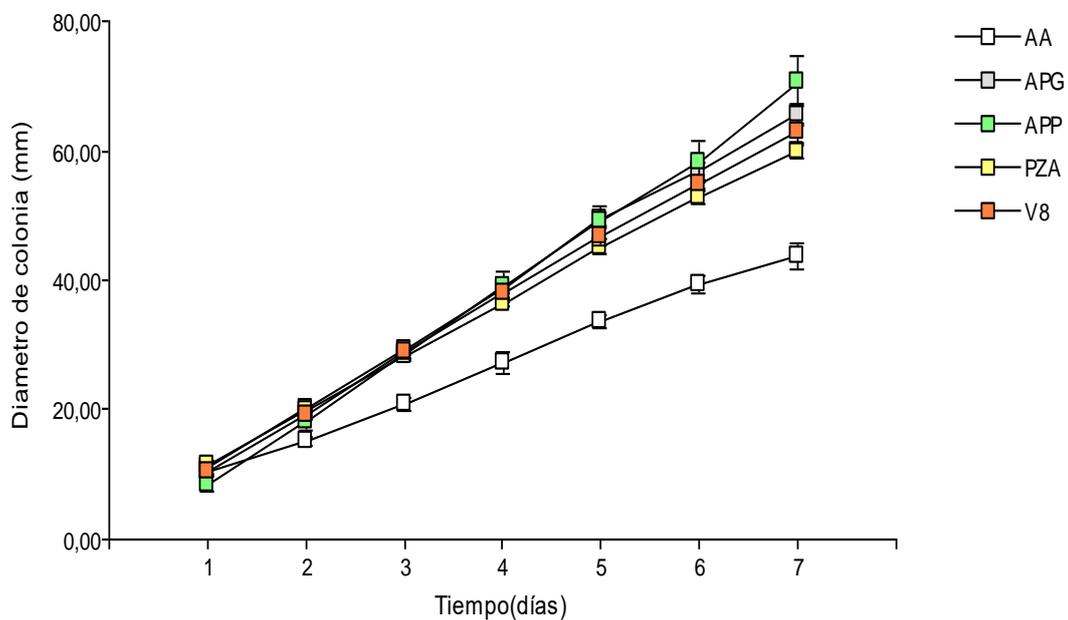


Figura 2.13: Crecimiento medio de los aislamientos SF8, SF20, y SF23 de *S. vesicarium* en los medios de cultivo AA, PDA, APP, PZA y V8 a lo largo de los 7 días de incubación.

Tabla 2.5: Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y producción de esporas de los aislamientos de *S. vesicarium* SF8, SF20 y SF23. Velocidad media, diámetro alcanzado a los 7 días de incubación y nivel de esporulación alcanzado en los distintos medios.

Medio	Aislamiento	Velocidad (mm/día)	Diámetro a los 7	Concentración
		media $\pm$ D.E.	días	media (conidios
			media $\pm$ D.E.	mL <sup>-1</sup> )
AA	SF8	7,33 $\pm$ 1,16	45,00 $\pm$ 0,00	10 <sup>5</sup>
	SF20	7,42 $\pm$ 1,63	41,00 $\pm$ 1,00	10 <sup>5</sup>
	SF23	7,15 $\pm$ 1,19	45,00 $\pm$ 1,00	10 <sup>5</sup>
PZA	SF8	9,29 $\pm$ 0,80	59,00 $\pm$ 1,00	10 <sup>3</sup>
	SF20	9,55 $\pm$ 1,12	60,00 $\pm$ 0,00	10 <sup>3</sup>
	SF23	9,50 $\pm$ 0,91	60,50 $\pm$ 0,50	10 <sup>3</sup>
PDA	SF8	9,62 $\pm$ 0,33	63,50 $\pm$ 0,50	10 <sup>2</sup>
	SF20	10,03 $\pm$ 0,85	67,00 $\pm$ 0,00	10 <sup>2</sup>
	SF23	10,06 $\pm$ 0,54	66,33 $\pm$ 0,58	10 <sup>2</sup>
APP	SF8	9,52 $\pm$ 1,03	75,00 $\pm$ 1,00	10 <sup>2</sup>
	SF20	9,48 $\pm$ 0,82	70,67 $\pm$ 0,58	10 <sup>2</sup>
	SF23	9,40 $\pm$ 0,44	66,33 $\pm$ 1,53	10 <sup>2</sup>
V8	SF8	9,46 $\pm$ 0,45	61,00 $\pm$ 0,00	10 <sup>6</sup>
	SF20	9,36 $\pm$ 0,49	63,33 $\pm$ 0,58	10 <sup>6</sup>
	SF23	9,60 $\pm$ 0,47	64,00 $\pm$ 1,00	10 <sup>6</sup>

## Discusión

En este primer capítulo se realizó una caracterización de los síntomas asociados a las distintas variedades de pera en distintas localidades de la región del Valle de Río Negro, Argentina. Los síntomas registrados en los frutos, a partir de los muestreos realizados en las distintas temporadas, reflejan variabilidad en cuanto a la severidad de los síntomas a nivel de fruto de las cuatro variedades analizadas. Además, los síntomas en hojas también mostraron variabilidad, ya que solo fueron registrados en las variedades D'Anjou y Abate Fetel. Esta influencia varietal en la susceptibilidad a la mancha marrón fue reportada por Montesinos et al. (1995) para cultivares europeos.

La caracterización morfológica y molecular de los aislamientos fue necesaria a fin de lograr una identificación taxonómica fiable. La morfología de los conidios maduros (forma, tamaño, tabicación y relación largo:ancho) muestran que corresponden a *S. vesicarium* según la descripción realizada por Simmons (2001) y coinciden también con la descripción de aislamientos obtenidos de lesiones de frutos y hojas de peral y de muestras de aire de perales en España, Francia y los Países Bajos (Puig et al., 2015). Además, estas características también coincidieron con las descritas para los aislamientos de *S. vesicarium* (EGS 37–067), que se utilizaron en el examen taxonómico de aislamientos japoneses (Kurose et al., 2015), cepa BRIP: 65181 (Moslemi et al., 2017) y la cepa CBS 191.86 (Woudenberg et al., 2017). Todas las cepas en este estudio se agruparon en el mismo clado que contiene a los *S. vesicarium* EGS 37–067 (Tipo), BRIP: 65181 y CBS 191.86 con un alto valor de “Bootstrap” (97). Por lo tanto, los análisis morfológicos y moleculares identificaron a los aislamientos en este estudio como *S. vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons (teleomorfo: *P. herbarum* [Pers.] Rabenh, syn. *P. allii* [Rabenh.] Ces. & De Not.).

En las pruebas de patogenicidad sobre frutos del cv. D'Anjou se observaron diferencias entre los aislamientos, siendo algunos más patogénicos que otros. El origen tisular de los aislamientos, hoja y fruto no tuvo influencia sobre la patogenicidad. Esto coincide con los resultados obtenidos por Köhl et al. (2009a), quienes encontraron patrones de patogenicidad similares sobre hojas de peral inoculadas con aislamientos de *S. vesicarium* obtenidos desde hojas y frutos de peral, pero si encontraron diferencias con aislamientos obtenidos de otros huéspedes, como cebolla y espárrago. En la comparación del crecimiento y esporulación en distintos medios de cultivo, los aislamientos demostraron mayor producción de conidios en V8, el cual ha sido el más utilizado para producir inóculo de este patógeno (Llorente & Montesinos, 2002; Llorente & Montesinos, 2004; Rossi et al., 2005; Rossi & Patteri, 2009; Alberoni et al., 2010; Kurose et al., 2015; Tanahashi et al., 2017; Cappai et al., 2018). Sin embargo, el medio AA también podría ser utilizado, ya que tuvo una abundante producción de esporas. Como ventajas, se puede señalar que el AA es de fácil acceso y económico. El medio APP, en el cual la velocidad de crecimiento fue buena, tiene el inconveniente de que requiere una elaboración compleja. La velocidad de crecimiento (mm/día) para la mayoría de los aislamientos fue más alta en los medios PDA, V8, PZA y APP, no existiendo diferencias significativas entre ellos. Por lo tanto, el cultivo de los aislamientos podría hacerse en cualquiera de ellos.

## Conclusiones Parciales

El presente trabajo conforma uno de los primeros estudios sobre *Stemphylium* como patógeno de perales en Argentina.

Se logró una colección de 150 aislamientos, incluyendo cepas de hojas y frutos.

Se obtuvieron 21 aislamientos monospóricos a los cuales se los logró caracterizar en base a características morfológicas, micro-morfológicas y moleculares.

Se logró caracterizar la patogenicidad de estos aislamientos sobre frutos del cultivar D'Anjou.

Se identificó al aislamiento SF23 como altamente patogénico, lo que permitió su selección para realizar futuros ensayos.

Los medios V8 y AA fueron identificados como los más indicados para la producción de conidios.

Para el cultivo de los aislamientos se destacó el medio PDA por la velocidad de crecimiento (no difiere del crecimiento en V8, APP o PZA), y su fácil acceso.

La colección de cepas lograda implica una base de material e información que permitirá realizar futuros estudios.

## Bibliografía

- Alberoni, G., Cavallini, D., Collina, M. & Brunelli, A. (2010). Characterization of the first *Stemphylium vesicarium* isolates resistant to strobilurins in Italian pear orchards. *Euro J Plant Pathol* 126(4):453–457. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9559-3>.
- Alberoni, G., Collina, M., Pancaldi, D., & Brunelli, A. (2005). Resistance to dicarboximide fungicides in *Stemphylium vesicarium* of Italian pear orchards. *European Journal of Plant Pathology*, 113(2), 211–219. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-2332-3>.
- Andersen, B., Krøger, E. & Roberts, R. G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research*, 106(2), 170-182.
- Belisario, A., Maccaroni, M., Corazza, L., Balmas, V., & Valier, A. (2002). Occurrence and etiology of brown apical necrosis on Persian (English) walnut fruit. *Plant Disease*, 86(6), 599–602. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.599>.
- CAFI, 2022. Producción argentina de peras y manzanas. <https://www.cafi.org.ar/nuestra-produccion/>.
- Cappai, F., De Franceschi, P., Ciriani, A., Collina, M. & Dondini, L. (2018). QTLs for susceptibility to *Stemphylium vesicarium* in pear. *Molecular Breeding*. 38. 10.1007/s11032-018-0785-2.
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553–556. <https://doi.org/10.2307/3761358>.
- Di Masi, S. (2017). La mancha negra del peral afecta la región. *Diario Río Negro*. <http://www.rionegro.com.ar/la-mancha-negra-del-peral-afecta-la-region-YG2293441>.
- Dobra, A. C., García, L. (2015). Presencia de mancha negra del peral, *Stemphyllium vesicarium*, en el Valle Medio del Río Negro, Patagonia Argentina. XXXVIII Congreso Argentino de Horticultura. Bahía Blanca. Buenos Aires. Página/s: 34(85):73.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797.
- Greco, M., Kemppainen, M., Pose, G., & Pardo, A. (2015). Taxonomic characterization and secondary metabolite profiling of aspergillus section aspergillus contaminating feeds and feedstuffs. *Toxins*, 7(9), 3512–3537.
- Hernández, E. B. (1999). Mancha negra en peral. *Cuaderno de Campo, Sanidad Vegetal*, 13, 35–39. <http://www.larioja.org/larioja-client/cm/agricultura/images?idMmedia=601025>.
- Hosen, M.I., Ahmed, A.U., Zaman, J., Ghosh, S. & Hossain, K.M.K. (2009). Cultural and physiological variation between isolates of *Stemphylium botryosum* the causal of stemphylium blight disease of lentil (*Lens culinaris*). *World J Agric Sci* 5:94–98

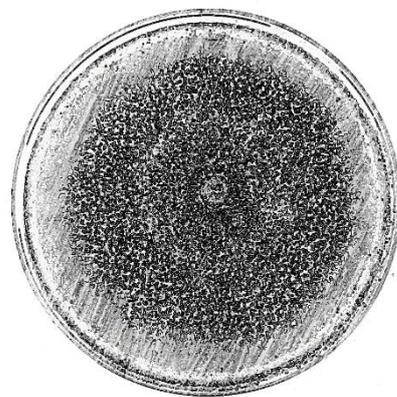
- Inderbitzin, P., Harkness, J., Turgeon, B. G., & Berbee, M. L. (2005). Lateral transfer of mating system in *Stemphylium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(32), 11390–11395.
- Inderbitzin, P., Mehta, Y.R. & Berbee, M.L. (2009). *Pleospora* species with *Stemphylium* anamorphs: a four-locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish among species in the *Pleospora herbarum* clade. *Mycologia* 101:329–339.
- Köhl, J., Groenenboom-de Haas, B., Goossen-van de Geijn, H., Speksnijder, A., Kastelein, P., de Hoog, S. & van den Ende, B.G. (2009a). Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. *European Journal of Plant Pathology* 124, 151–162. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9402-2>.
- Köhl, J., Groenenboom-de Haas, B. H., Kastelein, P., Rossi, V., & Waalwijk, C. (2009b). Quantitative detection of pear- pathogenic *Stemphylium vesicarium* in orchards. *Phytopathology*, 99(12), 1377–1386.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Kurose, D., Misawa, T., Suzui, T., Ichikawa, K., Kisaki, G., Hoang, L. H., Furuya, N., Tsuchiya, K., Tsuchida, S., & Sato, T. (2015). Taxonomic re-examination of several Japanese *Stemphylium* strains based on morphological and molecular phylogenetic analyses. *Journal of General Plant Pathology*, 81(5), 358–367. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0607-x>.
- Leach, C.M. & Aragaki, M. (1970). Effects of temperature on conidium characteristics of *Ulocladium chartarum* and *Stemphylium floridanum*. *Mycologia* 62:1071–1076.
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2002). Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology* 92: 99–104
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2004). Development and Field Evaluation of a Model to Estimate the Maturity of Pseudothecia of *Pleospora allii* on Pear. *Plant Disease*. 88. 215-219. 10.1094/PDIS.2004.88.2.215.
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2006). Brown spot of pear: An emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease*, 90(11), 1368–1375. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1368>
- Llorente, I., Moragrega, C., Ruz, L., & Montesinos, E. (2012). An update on control of brown spot of pear. *Trees - Structure and Function*, 26(1), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0607-1>

- McNeill, J., Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, W. F., Prud'homme van Reine, W.F., Smith, G.F., Wiersema, J.H., & Turland, N.J. (2012). International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. *Regnum Vegetabile* 154. Koenigstein: Koeltz Scientific Books.
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., & Vilardell, P. (1995). Susceptibility of selected European pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age. In *Plant Disease* (Vol. 79, Issue 5, pp. 471–473). <https://doi.org/10.1094/PD-79-0471>
- Moralejo, E., Clemente, A., Descals, E., Belbahri, L., Calmin, G., Lefort, F., Spies, C.F.J., McLeod, A. (2008). *Pythium recalcitrans* sp. nov. revealed by multigene phylogenetic analysis. *Mycologia* 100:310–319.
- Moslemi, A., Ades, P. K., Groom, T., Nicolas, M. E., & Taylor, P. W. (2017). *Alternaria infectoria* and *Stemphylium herbarum*, two new pathogens of pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 46(1), 91–101.
- Puig, M., Ruz, L., Montesinos, E., Moragrega, C., & Llorente, I. (2015). Combined morphological and molecular approach for identification of *Stemphylium vesicarium* inoculum in pear orchards. *Fungal biology*, 119(2-3), 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.11.006>
- Rossi, V., & Patteri, E. (2009). Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of Trichoderma-based products. *Biological Control*, 49(1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.12.012>
- Rossi, V., Patteri, E., Giosué, S., & Bugiani, R. (2005). Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology*, 111(4), 361–370. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-5273-3>
- Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Simmons, E.G. (1969). Perfect states of *Stemphylium*. *Mycologia* 61 1–26.
- Simmons, E.G. (1985). Perfect states of *Stemphylium* II. *Mycologia* 38 284–293.
- Simmons, E.G. (1989). Perfect states of *Stemphylium* III. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 49 305–307.
- Simmons, E.G. (2001). Perfect states of *Stemphylium* IV. *Harvard Papers in Botany* 6 199–208.

- Tanahashi M, Okuda S, Miyazaki E, Parada RY, Ishihara A, Otani H, Osaki-Oka K, (2017). Production of host-selective SV- toxins by *Stemphylium sp.* causing brown spot of European pear in Japan. J Phytopathol 165(3):189–194. <https://doi.org/10.1111/jph.12549>.
- Temperini, C.V., Tudela, M.A.A., Gimenez, G.N., Di Masi, S.N., & Pose, G.N. (2022). Brown spot of pear, an emerging disease in Argentina: identification and pathogenicity characterization of Argentinean *Stemphylium vesicarium* isolates. European Journal of Plant Pathology. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02493-y>
- Tudela, A. & Di Masi, S. N. (2022). La mancha marrón del peral. Boletín Sanitario Nº 7. INTA Alto Valle. <https://inta.gob.ar/documentos/presencia-de-la-enfermedad-mancha-marron-del-peral>
- Woudenberg, J. H. C., Hanse, B., Van Leeuwen, G. C. M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2017). *Stemphylium* revisited. Studies in Mycology, 87, 77 –103.



## Capítulo 3 : Eco fisiología de *Stemphylium vesicarium*





## Introducción

*Stemphylium vesicarium*, agente causal de mancha marrón en perales, ha demostrado ser una amenaza significativa para la producción frutícola en numerosas áreas productivas de Europa (Vilardell, 1988; Ponti et al., 1988; Hernández, 1999; Polfliet, 2002; Van Dijke, 2002; Llorente & Montesinos, 2002; Glos et al., 2023). Esto ha motivado investigaciones que profundicen en el conocimiento sobre el patógeno para desarrollar estrategias de control y mitigar sus efectos (Cugier et al., 1991; Llorente & Montesinos, 2002).

El efecto de la temperatura y la disponibilidad de agua sobre la germinación y el crecimiento micelial fue estudiado en España, utilizando aislamientos de *S. vesicarium* obtenidos en las zonas productivas de Cataluña (Montesinos & Vilardell, 1992). Dicho estudio ha proporcionado información valiosa sobre la epidemiología y el comportamiento de este patógeno. Según estos autores, las tasas de germinación y de crecimiento micelial de *S. vesicarium* son mayores que las de otros patógenos, y la germinación necesita de condiciones de alta humedad relativa. Sin embargo, señalan que los estudios realizados en laboratorio pueden no tener una correlación estricta con lo que sucede en el campo, donde las condiciones pueden ser más variables.

La disponibilidad de agua y la temperatura son dos factores medioambientales que ejercen efectos importantes en la actividad fúngica ya que son determinantes del potencial de germinación y crecimiento de los microorganismos (Plaza, 2003). Tener información sobre el efecto de la temperatura y  $a_w$  en el desarrollo de un patógeno, permitirá diseñar herramientas para su control con mayor certeza (Di Masi, 2007).

Actualmente no se cuenta con suficiente información sobre los hábitos de crecimiento de los aislamientos locales.

## Objetivos Generales

Determinar el efecto de los parámetros ambientales ( $a_w$  y temperatura) sobre la germinación de esporas y el crecimiento de aislamientos de *S. vesicarium* de la región del Alto Valle de Río Negro, estableciendo las condiciones óptimas y limitantes para ello.

## Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ) y la temperatura sobre la germinación de las esporas de *S. vesicarium*.
- Cuantificar el efecto de la  $a_w$  y la temperatura la tasa de crecimiento de aislamientos de *S. vesicarium*.

## Materiales y métodos

Se evaluó el desarrollo de tres aislamientos de *S. vesicarium* a seis temperaturas y siete  $a_w$ . Las  $a_w$  fueron 0,99; 0,97; 0,95; 0,93; 0,90; 0,88; y 0,85, y las temperaturas 0, 5, 15, 25, 30, y 37 °C. Se emplearon 5 repeticiones por aislamiento en cada una de las 42 combinaciones de temperatura y  $a_w$ .

### Preparación del inóculo

Los aislamientos seleccionados (SF8, SF20 y SF23) se incubaron a 25 °C durante 15 días, para producir abundante esporulación.

Se prepararon soluciones de glicerol (87% p.a. Cicarelli) y agua (Tabla 3.1), se tomaron alícuotas de 5 mL, se colocaron en tubos de ensayo, y se autoclavaron a 121°C durante 15 minutos. Luego se le agregó a cada tubo 2,5 µl de Tween 80 estéril. Los conidios de cada uno de los aislamientos fueron recogidos con un ansa ojal y colocados en los tubos. Luego de homogeneizar, la concentración de conidios en suspensión fue determinada por recuento en cámara de Neubauer. Las concentraciones del inóculo se ajustaron a  $5 \times 10^4$  conidios mL<sup>-1</sup>.

Tabla 3.1: Valores de actividad de agua de soluciones acuosas de glicerol a 25 °C

$a_w$	Glicerol (g/L)
0,99	18
0,97	120
0,95	200
0,93	250

0,90	340
0,88	380
0,85	416

### Medio de cultivo

Se empleó PDA (Anexo I) como medio de cultivo. El  $a_w$  del medio fue ajustada con glicerol (87% p.a. Cicarelli) y medido en equipo AquaLab modelo CX-2 (Decagon Devices Inc., USA). El cálculo teórico de la actividad acuosa se hizo teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$a_w \text{ medio} = a_w \text{ medio} \times a_w \text{ sol glicerol:agua}$$

Las  $a_w$  obtenidas fueron 0,99; 0,97; 0,95; 0,93; 0,88 y 0,85 +/- 0,003.

Los medios fueron esterilizados en autoclave a 120 °C durante 20 minutos, y una vez que alcanzó la temperatura adecuada, se distribuyó en placas de Petri de 90 mm de diámetro (aproximadamente 15 ml).

### Inoculación e incubación

Las placas de Petri fueron inoculadas en el centro con 1  $\mu$ l de la suspensión de esporas descrita anteriormente. Las placas fueron incubadas a 0, 5, 15, 25, 30, y 37 °C por un período máximo de 100 días.

Para minimizar la transferencia de agua al medio o desde el medio, las placas fueron colocadas dentro de bolsas de polietileno de 80 cm x 40 cm x 40  $\mu$ m de poro. Las mismas son permeables al oxígeno, pero no a la humedad, por lo que resultan adecuadas para mantener constante la actividad acuosa durante el período de tiempo que dura la experiencia. Se colocaron vasos de precipitado de 50 mL conteniendo una solución de glicerol/agua correspondiente a cada  $a_w$  y fueron renovados semanalmente (Chirife et al., 1980).

### Determinación de germinación y medición de crecimiento

Para determinar la germinación, las placas de Petri fueron observadas cada una hora bajo lupa estereoscópica (Arcano ST 30L/2L) a 40X.

El criterio de germinación fue la observación de tubo germinativo de longitud similar al diámetro del conidio (Figura 3.1) en al menos el 50% del inóculo (Hocking & Miscamble, 1995).

Se registró el tiempo transcurrido hasta la ocurrencia de la germinación (fase *lag*), y luego se se midieron diariamente las colonias, registrando sus diámetros perpendiculares, hasta que se completó la superficie de la placa, o por 90 días en el caso de las colonias que no completaron las placas.



Figura 3.1: Conidio germinado.

### Procesamiento de datos

Los datos de tiempos de germinación y diámetros de las colonias se volcaron a planillas de cálculo. Se graficó la curva de crecimiento (diámetro de la colonia en función del tiempo) para cada una de las réplicas (promedio 5) de cada una de las 42 condiciones (6 temperaturas y 7  $a_w$ ).

## Resultados

Se obtuvieron los tiempos de germinación y velocidad de crecimiento para los tres aislamientos en las 42 combinaciones de temperatura y  $a_w$  utilizados.

### Aislamiento SF23

En  $a_w$  0,99 se registró la máxima velocidad de germinación a 25 °C, donde la fase *lag* tuvo una duración menor a 4 horas. En dicha  $a_w$ , a los 30 °C fue ligeramente mayor, de más de 4 horas. A los 15 °C, la germinación ocurrió cerca de las 6 horas, a los 5 °C a las 11 horas, y a 0 °C a las 77 horas.

En las  $a_w$  0,99, 0,97, 0,95, y 0,93 incubadas a 37 °C, la germinación ocurrió, pero el crecimiento se detuvo luego de ella, solo llegando a formar una micro colonia.

En las  $a_w$  de 0,88 y 0,85 no se registró formación de colonia en ninguna de las temperaturas.

La germinación ocurrió en todas las temperaturas de las  $a_w$  0,99, 0,97, y 0,95. En el caso de  $a_w$  0,93, la germinación no se observó a 0°C. En  $a_w$  0,90 y 0,88, la germinación tuvo lugar en las temperaturas de 15, 25 y 30 °C, pero no en el resto. En 0,85, solo germinaron aquellas incubadas a 25 y 30 °C.

Respecto a la velocidad de crecimiento, las mayores ocurrieron a los 25 y 30 °C en condiciones de  $a_w$  de 0,99 y 0,97. Para una misma  $a_w$ , la velocidad es mayor en las temperaturas de 25 y 30 °C, siguiendo en importancia la de 15 °C, y luego 5 °C. A 0°C el crecimiento fue muy lento, y a 37 °C, nulo. Para una misma temperatura de incubación, al disminuir el  $a_w$ , la duración de la fase *lag* se incrementó y la velocidad de crecimiento disminuyó (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Efecto de la temperatura y  $a_w$  sobre el crecimiento del aislamiento SF23 de *S. vesicarium*: duración de la fase *lag* (tiempo transcurrido hasta la determinación de la germinación), y la velocidad media de crecimiento de las colonias.

$a_w$	T(°C)	Fase <i>lag</i> (días)	Velocidad media de crecimiento (mm/día)
0,99	0	3,21	0,46
	5	0,46	1,98
	15	0,25	6,46
	25	0,16	8,81
	30	0,17	8,16

	37	0,25	0
0,97	0	4,04	0,48
	5	1,29	1,64
	15	0,33	4,77
	25	0,25	8,12
	30	0,25	8,11
	37	0,31	0
0,95	0	12,00	0,18
	5	3,10	0,90
	15	0,96	2,93
	25	0,44	4,86
	30	0,40	4,68
	37	0,42	0
0,93	0	0,00	0
	5	7,04	0,31
	15	1,21	1,75
	25	0,96	3,51
	30	0,96	2,52
	37	0,98	0
0,90	0	0,00	0
	5	0,00	0
	15	2,77	0,07
	25	0,92	1,42
	30	0,92	0,92
	37	0,00	0
0,88	0	0,00	0
	5	0,00	0
	15	10,52	0
	25	3,75	0
	30	4,54	0
	37	0,00	0
0,85	0	0,00	0
	5	0,00	0
	15	0,00	0
	25	3,75	0
	30	4,54	0
	37	0,00	0

La velocidad media de crecimiento para cada condición de temperatura y  $a_w$  puede apreciarse en la Figura 3.2.

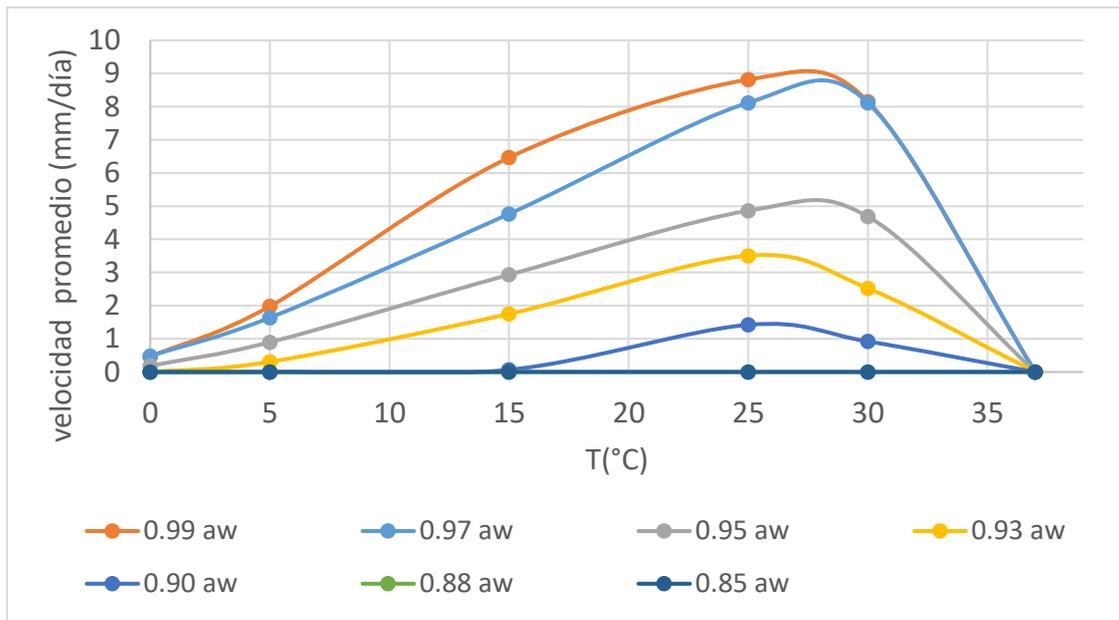


Figura 3.2: Velocidad media de crecimiento de la cepa SF23 en las distintas combinaciones de temperatura y  $a_w$  evaluadas.

### Aislamiento SF20

La máxima velocidad de germinación ocurrió en la  $a_w$  0,99 a 25 °C, donde la fase *lag* tuvo una duración de casi 5 horas. Al disminuir la temperatura para este mismo  $a_w$ , la germinación fue más lenta, siendo que a los 15 °C demoró cerca de 8 horas, y a los 5 °C, unas 11 horas. La germinación se registró en todas las temperaturas para los  $a_w$  desde 0.99 a 0.93.

En  $a_w$  de 0,90 la germinación no se produjo en 37 °C ni en 0 °C. En  $a_w$  0,88 no se produjo en 0, 5, ni 37 °C. Finalmente, en  $a_w$  0,85 no se registró germinación a ninguna temperatura de incubación.

Para este aislamiento se obtuvo que para un mismo  $a_w$ , los aumentos de temperatura producen un incremento en la velocidad de crecimiento de las colonias, excepto para la de 37 °C, temperatura a la cual se produjo la germinación, pero la colonia no logró desarrollarse. Las mayores velocidades de crecimiento se produjeron a los 25 y 30 °C en condiciones de  $a_w$  de 0,99 y 0,97 (Tabla 3.3).

La velocidad media de crecimiento para cada condición de temperatura y  $a_w$  puede apreciarse en la Figura 3.3.

Tabla 3.3: Efecto de la temperatura y  $a_w$  sobre el crecimiento del aislamiento SF20 de *S. vesicarium*: duración de la fase *lag* (tiempo transcurrido hasta la determinación de la germinación, expresado en días), y la velocidad media de crecimiento de las colonias en mm/día.

$a_w$	T(°C)	Fase <i>lag</i> (días)	Velocidad media de crecimiento (mm/día)
0,99	0	2,73	0,74
	5	0,46	1,89
	15	0,31	5,91
	25	0,20	8,76
	30	0,22	8,31
	37	0,25	0
0,97	0	3,66	0,34
	5	1,58	1,27
	15	0,35	4,41
	25	0,27	8,35
	30	0,27	7,67
	37	0,32	0
0,95	0	8,67	0,33
	5	2,71	0,81
	15	0,83	2,83
	25	0,48	5,51
	30	0,48	4,55
	37	0,48	0
0,93	0	48,54	0
	5	8,71	0,22
	15	1,6	1,86
	25	0,63	4,05
	30	0,63	4,03
	37	0,63	0
0,90	0	0	0
	5	33,4	0
	15	2,71	0,21
	25	0,85	1,48
	30	0,85	1,45
	37	0	0
0,88	0	0	0
	5	0	0
	15	10,46	0
	25	3,4	0,41
	30	3,4	0,23

	37	0	0
	0	0	0
	5	0	0
0,85	15	0	0
	25	0	0
	30	0	0
	37	0	0

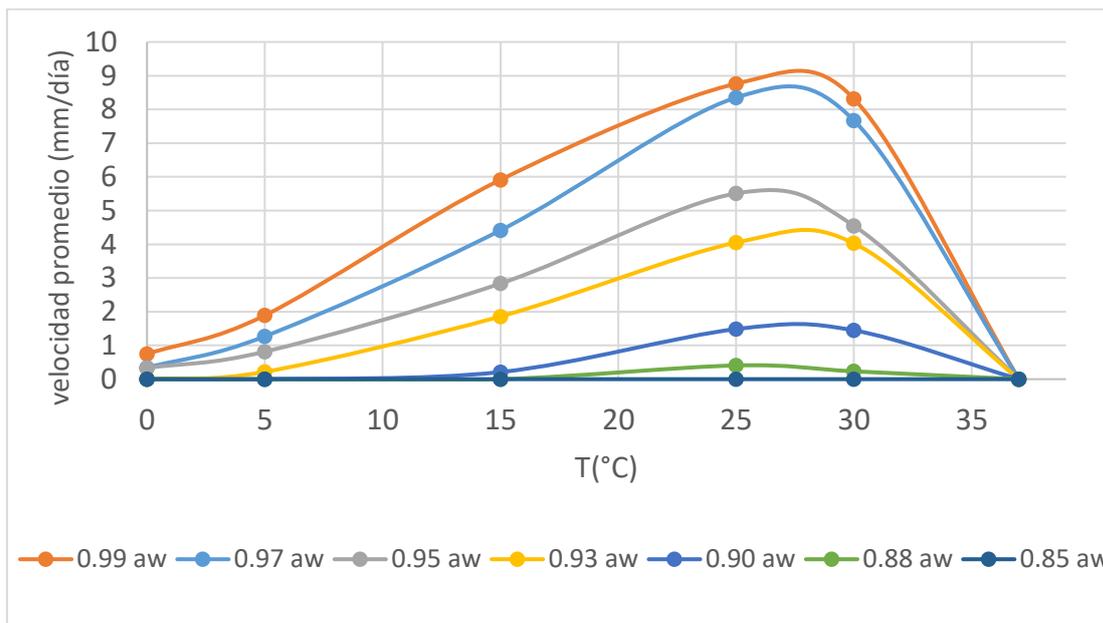


Figura 3.3: Velocidad media de crecimiento de la cepa SF20 en las distintas combinaciones de temperatura y  $a_w$  evaluadas.

### Aislamiento SF8

La máxima velocidad de germinación ocurrió en las  $a_w$  0,99 a 25 °C y 30 °C, donde la fase *lag* tuvo una duración de casi 5 horas. Al disminuir la temperatura para este mismo  $a_w$ , la germinación fue más lenta, siendo que a los 15 °C demoró 8 horas, y a los 5 °C, 13 horas.

La germinación se registró en todas las temperaturas para los  $a_w$  desde 0,99 a 0,93. En los  $a_w$  de 0,90 y 0,88, la germinación no se produjo en las temperaturas de 37, 5, y 0 °C.

A los 37 °C se observó ocurrencia de germinación en  $a_w$  0,93 y superiores, pero el crecimiento se detuvo, y la colonia no logró desarrollarse. En  $a_w$  0,85 no se registró germinación a ninguna temperatura de incubación.

Con respecto al crecimiento de las colonias, las mayores velocidades se produjeron a los 25 y 30 °C en condiciones de  $a_w$  de 0,99 y 0,97. Para una misma temperatura, el aumento de  $a_w$  produjo un incremento en la velocidad de crecimiento de las colonias, así como también un aumento de la velocidad de germinación, es decir, una disminución de la duración de la fase *lag* (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Efecto de la temperatura y  $a_w$  sobre el crecimiento del aislamiento SF8 de *S. vesicarium*: duración de la fase *lag* (tiempo transcurrido hasta la determinación de la germinación), y la velocidad media de crecimiento de las colonias.

$a_w$	T(°C)	Fase <i>lag</i> (días)	Velocidad media de crecimiento (mm/día)
0,99	0	2,52	0,71
	5	0,54	1,43
	15	0,35	6,08
	25	0,19	8,55
	30	0,19	7,04
	37	0,23	0
0,97	0	3,02	0,48
	5	1,1	1,03
	15	0,98	4,30
	25	0,29	7,49
	30	0,29	6,73
	37	31	0
0,95	0	12,06	0
	5	5,06	0,55
	15	1,1	2,78
	25	0,4	5,36
	30	0,4	4,78
	37	0,4	0
0,93	0	23	0
	5	6	0,29
	15	1,98	2,25
	25	0,96	3,61
	30	0,96	3,56
	37	0,96	0
0,90	0	0	0
	5	0	0
	15	0,06	0,21
	25	1,98	1,21
	30	1,98	1,15
	37	0	0
	0	0	0

0,88	5	0	0
	15	14,04	0
	25	5,06	0,74
	30	5,06	0,16
	37	0	0
	0	0	0
0,85	5	0	0
	15	0	0
	25	0	0
	30	0	0
	37	0	0
	0	0	0

La velocidad media de crecimiento para cada condición de temperatura y  $a_w$  puede apreciarse en la Figura 3.4.

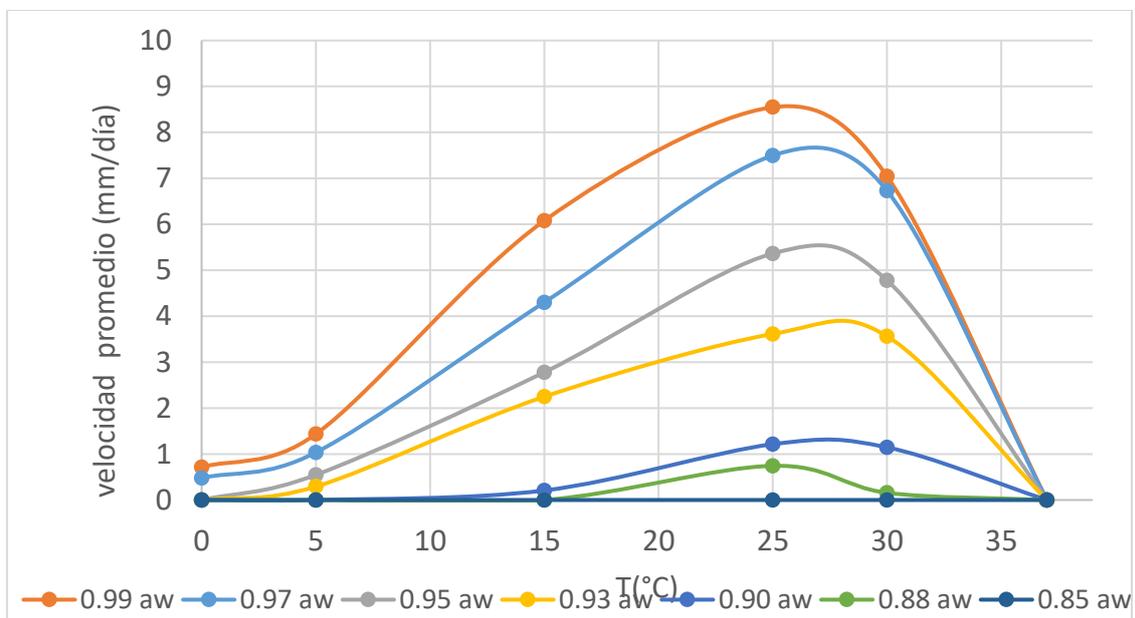


Figura 3.4: Velocidad media de crecimiento de la cepa SF8 en las distintas combinaciones de temperatura y  $a_w$  evaluadas.

En la Tabla 3.5 se puede observar el desarrollo de las colonias de este aislamiento a los doce días de incubación, en las distintas condiciones evaluadas, mientras que en la Figura 3.5 se puede observar de manera gráfica, la velocidad media de crecimiento de los tres aislamientos las distintas condiciones.

Tabla 3.5: Colonias de *S. vesicarium* a los 12 días de incubación, bajo las distintas condiciones de temperatura y  $a_w$ .

$T^{\circ}C$ / $a_w$	0°C	5°C	15°C	25°C	30°C	37°C
0,99						
0,97						
0,95						
0,93						
0,90						
0,88						
0,85						

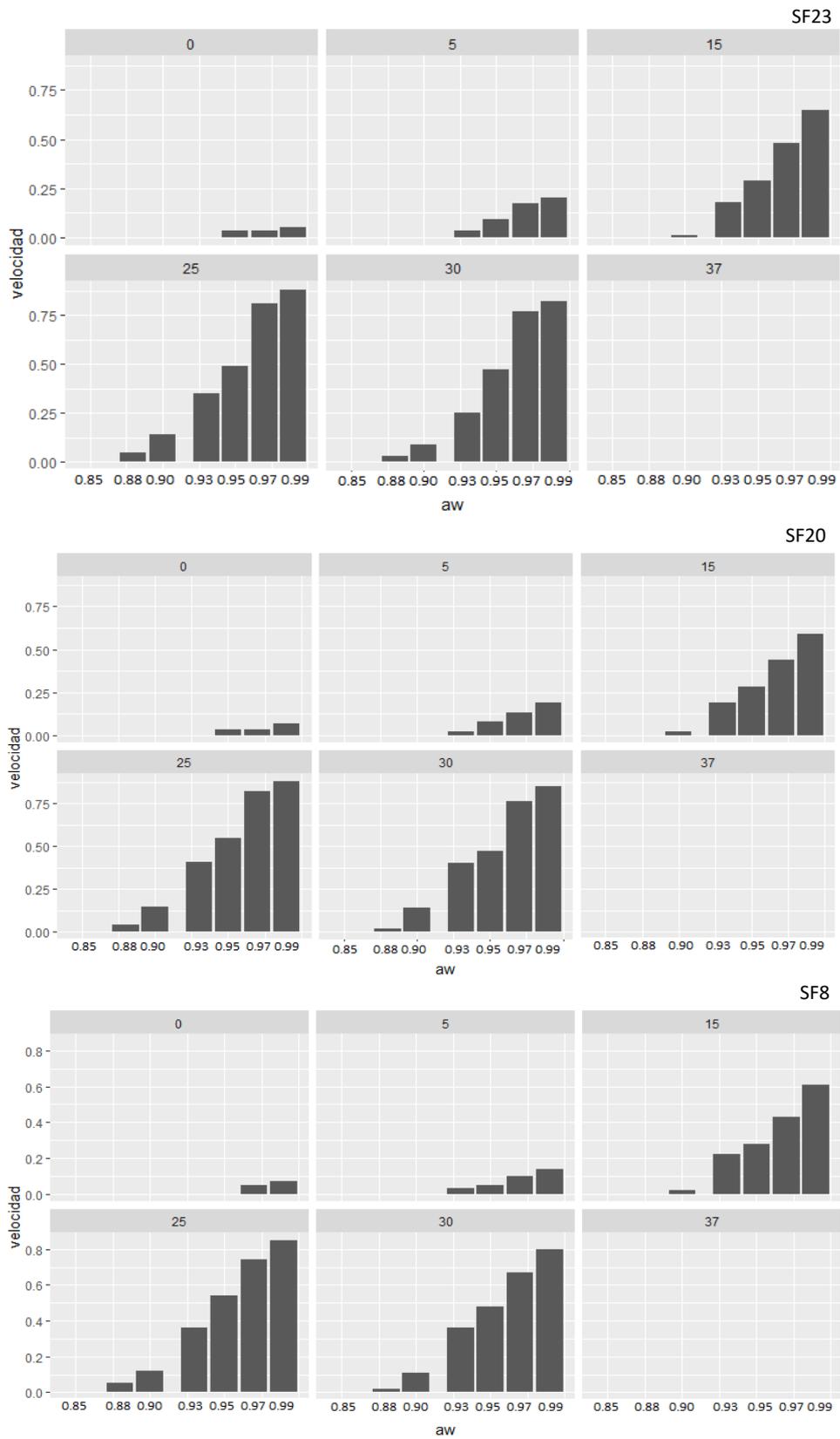


Figura 3.5: Velocidades medias de crecimiento, en cm/día para los tres aislamientos en las distintas condiciones de temperatura y  $a_w$ . 103

## Discusión

La germinación de los conidios de *S. vesicarium* fue estudiada por Montesinos & Vilardell (1992). En ella, la germinación fue evaluada mediante la colocación de gotas de suspensiones conidiales en portaobjetos adheridos a las tapas de la placa de Petri, dentro de la cuales se encontraban soluciones salinas correspondientes a un rango de  $a_w$ , los cuales fueron considerados como equivalentes al porcentaje de humedad relativa (HR). Sus resultados indicaron que no hubo germinación por debajo de una humedad relativa menor al 92%, a una temperatura de 20 °C.

Además, mediante la siembra de una gota de suspensión conidial dentro de placas de Petri con AA, Montesinos & Vilardell (1992) obtuvieron que los tiempos de germinación fueron de 1 hora para las temperaturas de entre 20 y 30 °C, y de 3 horas para las temperaturas de 10 y 35 °C.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que, en el rango de temperatura de 25 °C a 30 °C, la germinación pudo producirse hasta un  $a_w$  del 0,88, es decir, con una HR del 88%. Las diferencias observadas con respecto a la investigación de Montesinos & Vilardell (1992) pueden deberse a las distintas metodologías empleadas.

Las mayores velocidades de germinación se observaron en  $a_w$  0.99, siendo de entre 4 y 5 horas para las temperaturas de 25 y 30 °C, de 11 a 13 horas para la temperatura de 5 °C, y a los 37 °C de unas 6 horas, pero con un detenimiento del crecimiento, es decir, que a los 37 °C los conidios lograron germinar, pero no fueron capaces de formar una colonia. Las diferencias observadas con la investigación citada previamente son notorias, ya que en dicho estudio la germinación se observó en tan sólo 1 hora, mientras que en el presente demoró 4 horas. Esto puede atribuirse a las diferencias metodológicas o a características intrínsecas de los aislamientos estudiados. A pesar de estas diferencias, la tendencia de que las mayores velocidades de germinación ocurren entre los 25 y 30 °C y que la velocidad disminuye al descender la temperatura, coincide en ambos trabajos.

En cuanto a la velocidad del crecimiento de las colonias, los autores obtuvieron que la velocidad máxima de las colonias de *S. vesicarium* ocurrió a los 21 °C. Dicho ensayo fue efectuado mediante la siembra de un disco de micelio en placas con PDA, no incluyó modificación de  $a_w$  del medio. Los resultados aquí presentados, muestran que, para los aislamientos nativos utilizados, la mayor velocidad de crecimiento se produjo a los 25 °C, para todos los  $a_w$  empleados y, además, las velocidades de crecimiento fueron mayores para el  $a_w$  de 0,99.

En términos generales, los aislamientos de *S. vesicarium* evaluados no presentaron diferencias importantes entre sí, y en todos los casos el crecimiento óptimo fue próximo a los 25 °C.

La máxima temperatura de crecimiento reportada es cercana a los 35 °C y la mínima de 5 °C, donde se observó escaso crecimiento de las colonias (Montesinos & Vilardell, 1992). Los resultados aquí

presentados concuerdan con dichas observaciones, ya que a la temperatura de 37 °C no se observó crecimiento de las colonias, mientras que a 0 y 5 °C se observó un crecimiento muy lento, con escaso desarrollo de micelio.

## Conclusiones Parciales

El presente capítulo presenta el primer estudio eco fisiológico de aislamientos nativos de Argentina y de América de *Stemphylium vesicarium* obtenidos de perales.

Cuando se estudiaron las diferentes condiciones de temperatura y  $a_w$  se pudo observar que las mayores velocidades de crecimiento micelial y germinación se dieron a una temperatura de 25 °C y en  $a_w$  de 0,99. Por lo tanto, tanto la germinación como el crecimiento del micelio se ven favorecidos por condiciones de temperaturas medias y alta disponibilidad de agua.

Las temperaturas elevadas (37°C) son limitantes para el crecimiento del patógeno.

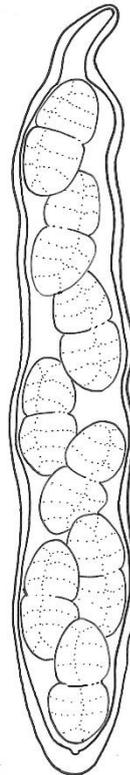
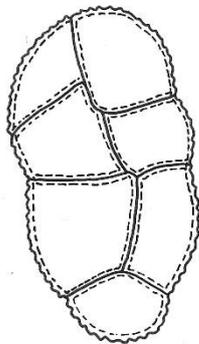
En temperaturas bajas, de 0 a 5 °C, el crecimiento es muy lento.

Esta investigación permitió obtener información local sobre las características de crecimiento del patógeno, indicando que su desarrollo requiere de condiciones climáticas específicas, y que, por lo tanto, la ocurrencia de infecciones va a depender de la temperatura y disponibilidad de agua del ambiente.

## Bibliografía

- Chirife J., Ferro Fontan C. y Bemmergi E. A. (1980). The prediction of the water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. *Journal of Food Technology* 15: 59.
- Cugier, J.P. & Humbert, W. (1991). Stemphyliose du Poirier. Etude de la biologie du parasite et recherches des fongicides actifs. *Phytoma*, 431: 47-50.
- Di Masi, S. (2007). Epidemiología, ecofisiología y control de *Alternaria spp.* causante del corazón mohoso en manzanas Red Delicious en Argentina. Tesis de doctorado, Universidad de Lleida.
- Głós, H., Bryk, H., Michalecka, M., Puławska J. (2023). First report of *Stemphylium vesicarium*, a new pathogen causing brown spot of pear in Poland. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01365-6>.
- Hernández, E. B. (1999). Mancha negra en peral. *Cuaderno de Campo, Sanidad Vegetal*, 13, 35–39.
- Hocking, A.D., Miscamble, B.F. (1995). Water relations of some Zygomycetes isolated from food. *Mycological Research* 99, 1113–1115.
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2002). Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology* 92: 99–104
- Montesinos, E. & Vilardell, P. (1992). Evaluation of FAST as a forecasting system for scheduling fungicide sprays for control of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Plant Disease* Vol. 76, Issue 12, p. 1221. <https://doi.org/10.1094/pd-76-1221>.
- Plaza, P. (2003). Control de les principals podridures en postcollita de cítrics mitjançant els tractaments de curat, els olis Essentials i l'agents de biocontrol *Pantoea agglomerans* CPA-2. Tesis de doctorado, Universidad de Lleida.
- Polfliet, M. (2002). Infection of *Stemphylium* increases every year. *Fruittelt Den Haag* 92: 16–17.
- Ponti, I.; Cavanni, P. & Bugiani, R. (1988). Maculatura bruna del pero. *Informato. Agrario*. 44(28): 55–59.8.
- Van Dijke, J.F. (2002). Incidence of pear fruit spot can increase explosively. *Fruittelt Den Haag* 92: 8–9.
- Vilardell, P. (1988). *Stemphylium vesicarium* en plantaciones de peral. *Fruticultura profesional* 18, 51–55.

## Capítulo 4 : Epidemiología de *Stemphylium vesicarium* en el Alto Valle de Río Negro





## Introducción

El desarrollo de las enfermedades en los cultivos es consecuencia de un proceso de interacción complejo que, entre los componentes que la literatura fitopatológica cita, se conforma del tetraedro de la enfermedad, involucrando a un agente causal, a un hospedante susceptible, un ambiente adecuado, y a la intervención del hombre.

La epidemiología es el estudio de la dinámica temporal y espacial de las enfermedades en los cultivos, y la utilización de los resultados de experimentos y monitoreos para describir, comprender, comparar y predecir epidemias (Madden, 2007). Según González (1976), la epidemiología es el estudio del desarrollo y de la diseminación de las enfermedades en poblaciones de plantas y de las condiciones ambientales que regulan estos procesos. La epidemiología proyecta en el tiempo y el espacio el tetraedro de enfermedad, surgió desde la fitopatología ante la necesidad de ponerle números al fenómeno biológico que significan las enfermedades, y así poder analizar con seguridad y objetividad las epidemias en los cultivos (March, et al. 2010).

El agente causal de la mancha marrón del peral, *Stemphylium vesicarium*, produce dos tipos de esporas, el teleomorfo produce ascosporas mientras que el anamorfo produce conidios. En la zona, se verificó la formación de conidios y pseudotecios en hojas y frutos de peral (Di Masi, 2017).

Según la bibliografía, el patógeno se ha encontrado en suelos, en hojas muertas y frutos de pera, y también sobre residuos de malezas (Rossi et al., 2005; Köhl et al., 2009). Se pueden producir ascosporas y conidios en dichos residuos de plantas durante toda la temporada de crecimiento (Rossi et al., 2005; Rossi & Patteri, 2009), de modo que se consideran una fuente constante de conidios que pueden causar infecciones en las hojas y frutas durante toda la temporada. Se ha confirmado que aislamientos capaces de producir la enfermedad en los perales tienen la habilidad de sobrevivir y producir ascosporas y conidios como saprófitos en algunas especies como *Poa pratensis*, *Festuca rubra*, *Festuca ovina*, *Lolium perenne*, *Digitaria sanguinalis*, *Setaria glauca*, y *Trifolium repens*, en algunas se producen, incluso, en mayor abundancia que sobre los restos de peral (Rossi et al., 2005). Los conidios están presentes en el aire del campo entre mediados de primavera hasta el otoño y pueden considerarse los principales responsables de las infecciones que ocurren durante la temporada (Bugiani et al., 2004). Las ascosporas maduran durante el invierno (Prados-Ligero et al., 1998), ya que las bajas temperaturas son necesarias para este proceso (Aveling, 1993; Llorente & Montesinos, 2004); las fechas de los primeros pseudotecios maduros dependen de las condiciones de campo que aseguren una humedad adecuada (Llorente & Montesinos, 2004). La expulsión de ascosporas ocurre en primavera, en asociación con la lluvia (Prados-Ligero et al., 2003; Llorente et al., 2003).

El inicio de infecciones requiere siempre la presencia conjunta de humectación o humedad relativa elevada y de temperaturas suaves. En cambio, la progresión de las infecciones depende sólo prácticamente de la temperatura. La óptima para la infección es entre 20 y 25 °C. Se requiere un mínimo de 6 h de humedad para la infección a la temperatura óptima, y la probabilidad de infección aumenta con el aumento de la duración de la humedad (Llorente & Montesinos, 2006).

Estas condiciones ambientales, que resultan favorables para el desarrollo de la enfermedad, se dan con mucha frecuencia en las regiones productoras de peras de Europa, donde se quieren de 15 a 25 aplicaciones de fungicidas para mantener bajos a los niveles de daño (Llorente et al., 2012). En la región de Emilia-Romaña, por ejemplo, lugar donde la enfermedad tuvo su primera detección, la media mensual de lluvias primaverales es de 51,1 mm y estivales de 41,7 mm. En Europa, se utiliza el sistema de pronóstico BSPcast, que consiste en un modelo que combina la temperatura media del periodo húmedo y el número de horas de hoja mojada para cuantificar la gravedad de las infecciones. Dicho pronóstico indica cuando es necesario realizar aplicaciones, y su implementación les ha permitido lograr una reducción de entre 30 y 40 % las aplicaciones de agroquímicos (Llorente et al., 2000).

En la zona del Alto Valle de Río Negro, la media de precipitaciones primaverales de los últimos 50 años es de 57,3 mm, variando entre 15 y 24 mm mensuales, mientras que, en verano, la precipitación media es de 55,7 mm, variando entre 14,7 y 23 mm mensuales (Rodríguez & Muñoz, 2022).

Las precipitaciones muestran una variabilidad interanual marcada, con alternancia de años secos y años húmedos. Además, en las últimas décadas, se evidenció una tendencia relevante de incremento de días con lluvia en primavera y aumento de ocurrencia de eventos extremos de precipitación en primavera y verano (Rodríguez & Muñoz, 2022).

Si bien se cuenta con abundante información sobre el comportamiento del patógeno en otras partes del mundo, hasta el momento, no hay antecedentes de estudios de la mancha marrón del peral bajo las condiciones ambientales del Alto Valle de Río Negro.

En el contexto de variación en la distribución de las precipitaciones en la zona de estudio, resulta fundamental la generación de información a nivel local sobre la epidemiología del patógeno, ya que esto proveerá herramientas para la planificación de estrategias de control.

En este capítulo, se abordarán principalmente dos componentes del triángulo de la enfermedad: patógeno y condiciones ambientales.

## Objetivos generales

Caracterizar el ciclo de vida del patógeno en las condiciones ambientales locales.

## Objetivos específicos

1. Detectar el momento de aparición de los síntomas de mancha marrón del peral y cuantificarlos. Identificar las condiciones ambientales que permiten el desarrollo de la enfermedad en la zona del Alto Valle.
2. Realizar un seguimiento de la formación y desarrollo de las estructuras sexuales del patógeno en los restos de hojas de peral. Identificar los parámetros ambientales que influyen en su maduración.
3. Evaluar la capacidad del hongo de afectar a las malezas y de producir estructuras reproductivas sobre las mismas.

## Materiales y métodos

### Condiciones climáticas y desarrollo de la enfermedad

#### Monitoreos

Durante cuatro temporadas, en el periodo 2018-2022, se realizaron monitoreos en establecimientos productivos, con el fin de detectar síntomas de mancha marrón.

Se definieron cuatro estaciones de monitoreo, tres de ellas ubicadas en la localidad de General Roca y una en Ingeniero Huergo (Figura 4.1).

La Estación 1 y Estación 2, consistieron en cultivos combinados de las variedades D'Anjou y Packham's.

La Estación 3, presentó las variedades Williams, D'Anjou y Abate Fetel.

La Estación 4, monitoreada en la cuarta temporada (2021/2022), presentó a las variedades Packham's, D'Anjou, y Abate Fetel.

En las estaciones 1, 2 y 3, los monitoreos de cada temporada se realizaron cada 15 días, a partir del 15 de septiembre hasta la cosecha, y realizando un último a fines de marzo. La estación 4 sólo se

monitoreó la última temporada. Se registraron los síntomas y se determinó la incidencia de la enfermedad a nivel de hoja y de fruto. Para esta determinación, se definieron al azar, 10 sitios de muestreo por estación, monitoreando 100 hojas y 100 frutos en cada uno.

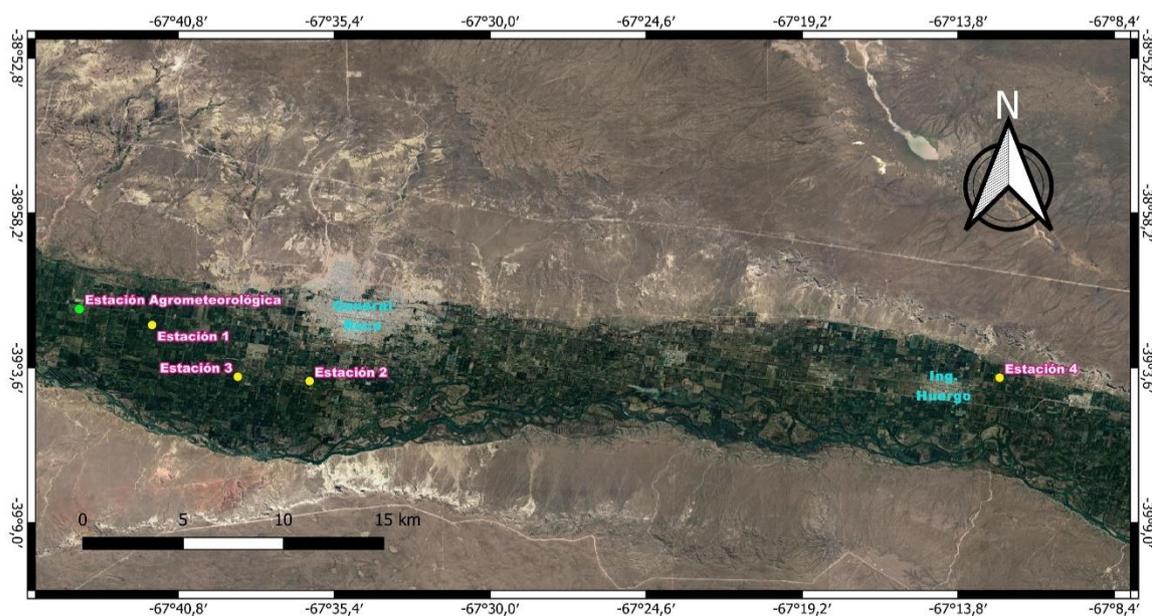


Figura 4.1: Ubicación geográfica de las estaciones de monitoreo 1, 2, 3, y 4, y la estación agrometeorológica.

### Condiciones climáticas

En cada temporada se tuvieron en cuenta las condiciones climáticas del período comprendido entre octubre y marzo, analizando las condiciones previas a la detección de los síntomas, considerando las siguientes variables: precipitaciones (mm), cantidad de días con precipitaciones, número de horas de hoja mojada, temperatura media del período húmedo, y temperatura media diaria. Se emplearon los registros climáticos de la estación agrometeorológica de la EEA Alto Valle de INTA.

### Análisis estadístico

Se realizaron gráficos descriptivos de las condiciones climáticas de cada temporada. Con los datos climáticos previos a la detección de los síntomas y con el nivel de daño registrado, se realizó un análisis de correlación entre variables, empleando el software R en su versión 4.2.3.

## Seguimiento del desarrollo y maduración de las estructuras invernantes

El seguimiento del desarrollo de las estructuras invernantes, producidas en hojas, de peral se efectuó durante los años 2017, 2018 y 2019. Se emplearon dos sitios de muestreo. Estos consistieron en establecimientos productivos con antecedentes de la enfermedad, la Estación 1, cuyas coordenadas son latitud: 39°02'06.1"S, longitud: 67°41'42.2"O y la estación 2, latitud: 39°04'03.5"S, longitud: 67°36'15.0"O (Figura 4.1).

Se utilizaron hojas del cultivar D'Anjou con síntomas de la enfermedad, retirándolas de los árboles frutales de manera aleatoria, a fines de marzo de cada año, antes de que se realizaran los tratamientos fungicidas otoñales. Las hojas sintomáticas se colocaron dentro de bolsas malla de polipropileno de 70 x 30 cm y se dispusieron en el interfilas (Figura 4.2). Cada bolsa con 250 hojas representó una repetición, y se usaron tres repeticiones por sitio.

Los muestreos se realizaron cada quince días aproximadamente, desde la primera semana del mes de julio y hasta el 30 de diciembre de cada año. Se realizó una lectura adicional en abril a fin de evaluar si los pseudotecios permanecían con ascas en su interior o se liberaban en su totalidad.

En cada muestreo, se trasladaron al laboratorio 20 hojas de cada repetición y se colocaron en recipientes con agua a una temperatura de unos 95-100 °C por unos diez minutos. Se secaron con papel absorbente y se observaron bajo lupa, contabilizando el número de pseudotecios por lamina foliar y extrayendo unos 50 pseudotecios por repetición. Las estructuras ubicadas con una gota de agua destilada con 1% de ácido láctico se aplastaron entre un portaobjeto y un cubreobjetos, y se observaron con microscopio.

Con el fin de determinar la viabilidad de una temporada a otra, muestras del 2019 se conservaron en el interfilas hasta el 2020, y tomando muestras mensualmente a partir de abril. Se observaron los pseudotecios en microscopio según la metodología descrita anteriormente, buscando detectar si las esporas se visualizaban deshidratadas.

Se clasificó la etapa de desarrollo de cada pseudotecio de acuerdo con escalas anteriormente reportadas para hongos ascomicetes (James & Sutton, 1982; Prados-Ligero et al., 1998; Trapero Casas & Kaiser, 1992), siendo:

- 0: primordios pseudoteciales;
- 1: ascas y ascosporas diferenciadas;
- 2: ascas con ascosporas diferenciadas y en proceso de maduración;

- 3: hasta el 50% de las ascas con ascosporas maduras;
- 4: >50% de las ascas con ascosporas maduras;
- 5: pseudotecio que evidencia la liberación de ascosporas.

Para cada fecha de muestreo se calculó un índice de madurez (Trapero Casas & Kaiser, 1992), según la siguiente ecuación:

$$IM = \sum ni (st_i) / N,$$

- IM= índice de madurez del pseudotecio,
- ni= número de pseudotecios en cada estado (estado i),
- st<sub>i</sub>= estado de desarrollo según la escala de 0 a 5 descripta,
- N= número total de pseudotecios observados.



Figura 4.2: Seguimiento del desarrollo de las estructuras invernantes: bolsa con hojas de la variedad D'Anjou con síntomas de mancha marrón del peral, dispuesta en el interfilas.

#### Relación de las condiciones climáticas y la maduración de las estructuras invernantes

A partir de los registros climáticos se obtuvieron las siguientes variables, adaptadas de Prados-Ligero et al., 1998, a fin de evaluar su posible efecto sobre el IM del pseudotecio:

- T0: número de horas acumuladas con temperaturas menores a 0 °C.

- T1: número de horas acumuladas con temperatura entre 4,5 y 10 °C.
- H0: número de horas acumuladas con humedad relativa menor a 90 %.
- H1: número de horas acumuladas con humedad relativa mayor a 90 %.
- HT0: número de horas acumuladas con temperatura menor a 0°C y humedad relativa mayor a 90%
- HT1: número de horas acumuladas con temperatura entre 4.5 y 10 °C y HR mayor a 90%.
- LA: lluvia acumulada (mm).

### Análisis estadístico

Se verificó la normalidad y homocedasticidad de los datos y se realizó una regresión lineal múltiple con las variables climáticas y el IM del pseudoteocio utilizando el software R en su versión 4.2.3.

### Las malezas como fuente de inóculo

#### Monitoreo y aislamiento en malezas

A fin de evaluar la presencia de *S. vesicarium* en las malezas presentes en el suelo de los lotes, se realizaron muestreos en la Estación 2 y la Estación 3 (Figura 4.1). Las especies evaluadas fueron *Trifolium repens*, *Taraxacum officinale*, *Bromus catharticus*, *Hordeum marinum*, *Festuca sp.*, *Poa sp.*, y *Lolium sp.*

Los muestreos se repitieron tres veces: en noviembre del año 2021, en enero de 2022 y marzo de 2022. En cada uno se tomaron 30 plantas al azar de cada especie por estación.

Las plantas fueron lavadas bajo agua corriente durante 15 minutos. Luego, se separaron 5 hojas de cada planta y se trasladaron a la cámara de flujo laminar, donde se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% por 1 minuto, y posteriormente se enjuagaron tres veces con ADE por 1 minuto.

Una vez secas, se cortaron segmentos de lámina foliar de aproximadamente 0,5 cm, y se desinfectaron nuevamente por inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5% por 1 minuto, seguido de tres enjuagues con ADE por 1 minuto. Una vez secos, se sembraron en placas de 9 cm de diámetro

con medio Diclorán Cloranfenicol Peptona Agar (DCPA, Anexo I), un medio selectivo para hongos hifomicetes dematiáceos (Hocking & Andrews, 1987).

Transcurrido el período de incubación, se procedió a realizar el recuento diferencial de hongos obtenidos por género. El mismo se llevó a cabo según Samson et al. (2000), Pitt y Hocking (2009), por medio del análisis macroscópico de las colonias en diferentes medios de cultivo y el análisis microscópico empleando una lupa binocular estereoscópica Arcano ST 30L/2L y un microscopio Motic BA210. Se calculó la frecuencia de aislamiento de *S. vesicarium* por especie.

### Inoculación de malezas

Con el fin de comprobar si *S. vesicarium* es capaz de afectar malezas y producir conidios y pseudotecios en ellas, se realizaron inoculaciones, tanto en plantas vivas como en hojas muertas y se comparó esta producción con la de hojas de perales. Además, se re-aisló el patógeno desde los restos inoculados y se realizaron inoculaciones en hojas de perales, con la finalidad de evaluar si el patógeno pierde o no capacidad patogénica.

### Producción de Inóculo

Para la inoculación se utilizó la cepa SF23 de *S. vesicarium*, previamente caracterizada a nivel morfológico, molecular y patogénico. Se cultivó en medio AA (Anexo I) en placas de Petri de 9 cm de diámetro y se incubó por 20 días a 20 °C y en oscuridad.

Transcurrido el periodo de incubación, las placas se transportaron a la cámara de flujo laminar, sus superficies se frotaron suavemente con un asa luego de añadir 9 mL ADE y una gota de Tween 20. La suspensión fue filtrada a través de gasa estéril y posteriormente se ajustó a una concentración de  $5 \times 10^4$  conidios mL<sup>-1</sup>, utilizando la cámara de Neubauer.

### Inoculación de hojas vivas

Esta prueba se realizó en condiciones de campo, en la Estación 2, en el mes de noviembre de 2021. Se emplearon cinco plantas de cada maleza: *Trifolium repens*, *Taraxacum officinale*, *Bromus catharticus*, *Festuca sp*, *Poa sp*, y *Lolium sp*.

Cada planta fue inoculada con 10 mL de suspensión conidial utilizando un atomizador manual. Luego de la inoculación, las plantas se cubrieron con una bolsa plástica por 48 horas a fin de mantener condiciones de hoja mojada y humedad relativa alta (Figura 4.3).

A los 7, 14, y 28 días de incubación se recolectaron, al azar, muestras de 20 hojas de cada especie. Se trasladaron al laboratorio, donde se registró si estaban sanas o presentaban necrosis y clorosis. Se lavaron con agua corriente del grifo durante 15 min, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (1%) durante 1 min, se enjuagaron tres veces por 1 minuto con ADE, y se secaron en la cámara de flujo laminar. En total se cortaron alrededor de 1000 segmentos de hojas, incluido el tejido necrótico cuando estaba presente. Los segmentos se colocaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA (Anexo I), hasta la identificación de las colonias de *S. vesicarium*. El experimento se repitió una vez. Se determinó la frecuencia de re-aislamiento del patógeno.



Figura 4.3: Plantas inoculadas a campo con suspensión conidial de *S. vesicarium* y cubiertas con bolsa plástica por 48 horas.

#### *Inoculación de hojas muertas*

Se recolectaron hojas sanas de *Trifolium repens*, *Taraxacum officinale*, *Bromus catharticus*, *Festuca sp*, *Poa sp*, *Lolium sp*, y de las variedades de pera Abate Fetel, D'Anjou, Packham's y Williams.

Se lavaron con agua corriente del grifo durante 15 min. Una vez secas, se esterizaron en autoclave a 120 °C durante 20 min. Posteriormente, en cámara de flujo laminar, se colocaron individualmente sobre un portaobjetos sostenido por 2 soportes, dentro de placas de Petri estériles de 9 cm de diámetro, que contenían doble capa de papel secante húmedo. Una vez dispuestas en las placas, la inoculación se realizó distribuyendo 0,5 mL de inóculo por hoja (Figura 4.4).

Se utilizaron 30 hojas de cada especie y variedad. Como control, se inocularon 5 hojas de cada especie de maleza y variedad de pera con ADE. Las placas se incubaron por 7 días a 25 °C y en oscuridad.

Concluido el período de incubación, 10 hojas de cada especie se lavaron durante 15 min con agua corriente del grifo, se esterizaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto, se enjuagaron con ADE por 1 minuto, y se secaron con un flujo de aire estéril. Se cortaron cinco segmentos de 0,5 cm de cada hoja, se colocaron en medio AA en placas de Petri de 9 cm, y se incubaron a 25 °C por 7 días. Se identificaron colonias de *S. vesicarium* y se determinó su frecuencia de aislamiento.

Un aislamiento monospórico de *S. vesicarium* obtenido del re-aislamiento de cada especie de maleza, fue empleado para determinar su patogenicidad en hojas de la variedad D'Anjou y se compararon con la cepa original SF23. Para ello, tres hojas jóvenes frescas se lavaron con ADE y se colocaron individualmente en placas de Petri. En su envés se inoculó, mediante aspersion, 3 mL de suspensión conidial ajustada a  $5 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . Los controles negativos se realizaron rociando el mismo volumen de ADE. Posteriormente, las hojas se incubaron a 25 °C y en oscuridad en una cámara



Figura 4.4: Inoculación de hojas muertas de la variedad Packham's con suspensión conidial de *S. vesicarium*.

húmeda (Tanahashi et al., 2017) compuesta por la caja de Petri sellada dentro de una bolsa de polietileno. Las condiciones de humedad se mantuvieron utilizando porciones de algodón estériles saturados con ADE.

Después de 48 h de incubación, se tomaron fotografías de las hojas lesionadas con una cámara de 16 megapíxeles de resolución y las imágenes obtenidas se procesaron con el software ImageJ (Schneider et al., 2012). Con dicho programa se determinó el área total y el área necrótica de cada hoja. Este ensayo se llevó a cabo tres veces. Para el análisis de los datos se utilizó el software R en su versión 4.2.3. Se verificó la bondad de ajuste del modelo, se realizó un ANOVA y test de Tukey de diferencia de medias.

Las 20 hojas restantes de cada especie fueron incubadas durante 24 días. Se les determinó el área foliar, mediante fotografía y procesamiento en el software ImageJ. Transcurrido este período, se observaron bajo lupa y se registró el número total de pseudotecios por hoja (Figura 4.5), expresando los resultados como el número pseudotecios por centímetro cuadrado de hoja.

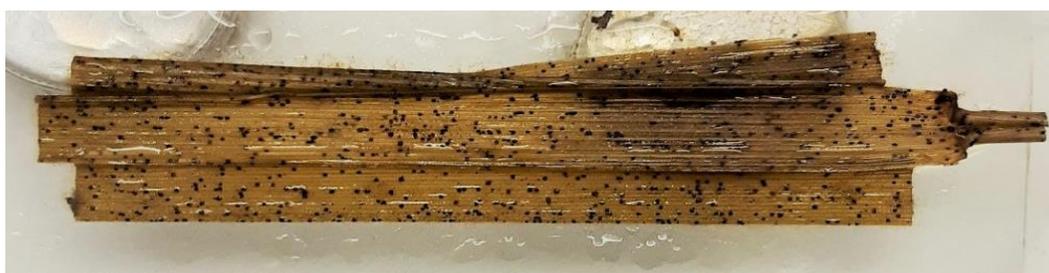


Figura 4.5: Producción de pseudotecios de *S. vesicarium* sobre *Festuca* sp.



Figura 4.6: Preparación del material para medición de conidios de *S. vesicarium* desarrollados en hojas de malezas y perales inoculados.

Luego, las hojas se sumergieron en tubos de ensayo que contenían 1,5 mL de ADE (1 hoja por tubo), y se agitaron durante 30 segundos en un vórtex, para separar los conidios (Figura 4.6).

La concentración de esporas se determinó utilizando una cámara de Neubauer y el resultado se expresó como el número medio de conidios por centímetro cuadrado de hoja. El experimento se realizó una vez. Esta metodología fue adaptada de Rossi et al., 2005.

### Análisis

Se analizó la cantidad de conidios y pseudotecios producidos por centímetro cuadrado de hoja y por especie. Se verificó la bondad de ajuste de los modelos. Se les realizó el análisis de la varianza y se compararon las medias mediante el test de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Se utilizó el software R en su versión 4.2.3.

## Resultados

### Condiciones climáticas y desarrollo de la enfermedad

#### Temporada 2018-2019

Durante esta temporada, se monitorearon las Estaciones 1, 2, y 3, cada 15 días, desde el 1 de septiembre hasta el 1 de abril.

Los síntomas de mancha marrón se registraron los primeros días de noviembre del 2018. En la Estación 2, en la variedad D'Anjou se observó una incidencia de 30% en hojas y de 25% en frutos. No se registraron síntomas en Packham's, ubicada en la misma estación.

En la estación 3, se registraron síntomas sobre las variedades D'Anjou y Abate Fetel, afectando un 35% de las hojas y 15% de los frutos. Sobre la variedad Williams, ubicada en esta estación, no se desarrollaron síntomas. La incidencia de la enfermedad se fue agravando durante la temporada, llegando a un 30% de daño en frutos.

Los datos de la Estación 1 no fueron considerados esta temporada, debido a que se realizaron aplicaciones preventivas con fungicidas.

Las precipitaciones durante esta temporada fueron muy abundantes. Como fue señalado por Rodríguez & Muñoz (2022), la primavera del 2018 presentó una media de 135 mm de precipitación y 26 días con lluvia, cuando las medias características para la zona son de 57,3 mm y 12 días, calificando a esta primavera como la más lluviosa de las cinco décadas anteriores. Previo a la detección de síntomas, durante la última quincena de octubre y primera semana de noviembre, se produjeron varios eventos de precipitación prolongados, generándose hasta 22 HHM diarias, y ocurriendo períodos de entre tres y cuatro días seguidos con más de 10 HHM diarios (Figura 4.7).

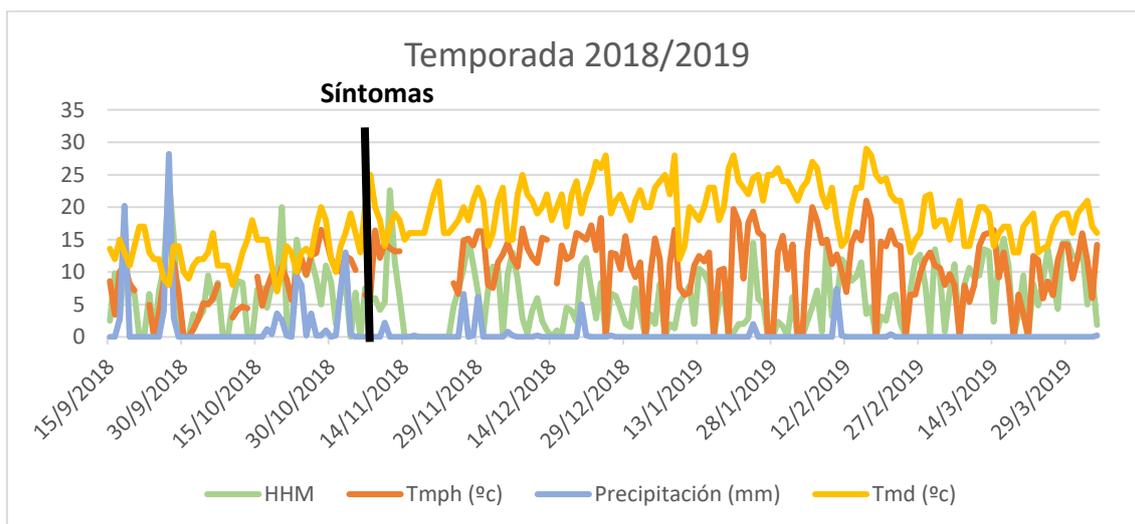


Figura 4.5: Condiciones climáticas de la temporada 2018/2019, número de horas de hoja mojada diarios (HHM), Temperatura media del período húmedo (Tmph, °C), Precipitación diaria (mm), Temperatura media diaria (Tmd, °C) y momento de detección de síntomas.

### Temporada 2019-2020

Durante esta temporada, se monitorearon las Estaciones 1, 2, y 3, cada 15 días, desde el 1 de septiembre hasta el 1 de abril.

En las tres estaciones de monitoreo, los síntomas fueron registrados en postcosecha, a fines del mes de marzo del 2020, sobre las hojas de las variedades D'Anjou (Estación 1, 2 y 3), y de Abate Fetel (Estación 3), con una incidencia media del 10%. De los frutos remanentes, cerca del 1% presentó síntomas de la enfermedad. No se registraron síntomas en Williams ni Packham's.

Durante el período primaveral del año 2019, la frecuencia y abundancia de precipitaciones fueron menores a la media, acumulándose 21,4 mm de lluvia.

Durante el verano, las temperaturas fueron medias y precipitaciones fueron escasas, menores a la media de 55,7 mm. Durante toda la temporada, las HHM no superaron el valor de 13 horas diarias (Figura 4.8).

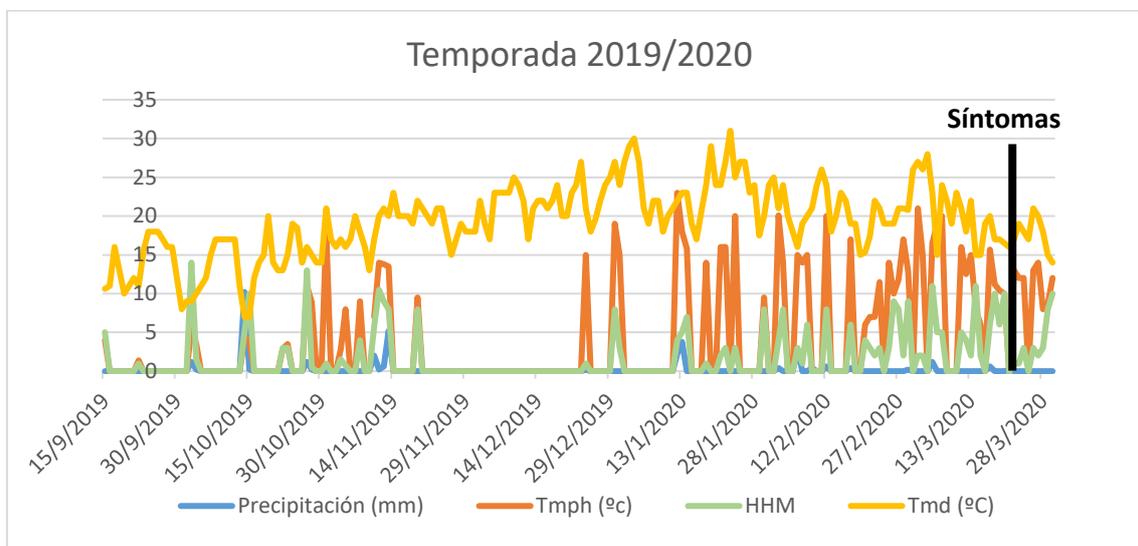


Figura 4.6: Condiciones climáticas de la temporada 2019/2020, número de horas de hoja mojada diarios (HHM), Temperatura media del período húmedo (Tmph, °C), Precipitación diaria (mm), Temperatura media diaria (Tmd, °C) y momento de detección de síntomas.

### Temporada 2020-2021

Durante esta temporada, se monitorearon las Estaciones 1, 2, y 3, cada 15 días, desde el 1 de septiembre hasta el 1 de abril.

En las Estaciones 2 y 3, se registraron síntomas en hojas y frutos a mediados enero, afectando únicamente a las variedades D'Anjou y de Abate Fetel. Las variedades Packham's y Williams, presentes en dichas estaciones, no presentaron síntomas. En promedio las variedades afectadas tuvieron una incidencia del 3% a nivel de fruto y del 10% a nivel de hoja.

Los datos de incidencia de la Estación 1 no fueron considerados por haber recibido tratamientos fungicidas.

Durante esta temporada, tanto la primavera como el verano registraron precipitaciones menores a la media histórica, acumulándose de 33,4 mm en primavera y 27,6 mm en verano. Previo a la detección de síntomas, a fines del mes de diciembre se produjo un evento de precipitación, en el

cual, en dos días se acumularon 8,6 mm de lluvia, las HHM fueron 14 horas y la temperatura media fue de 18,5 °C (Figura 4.9).

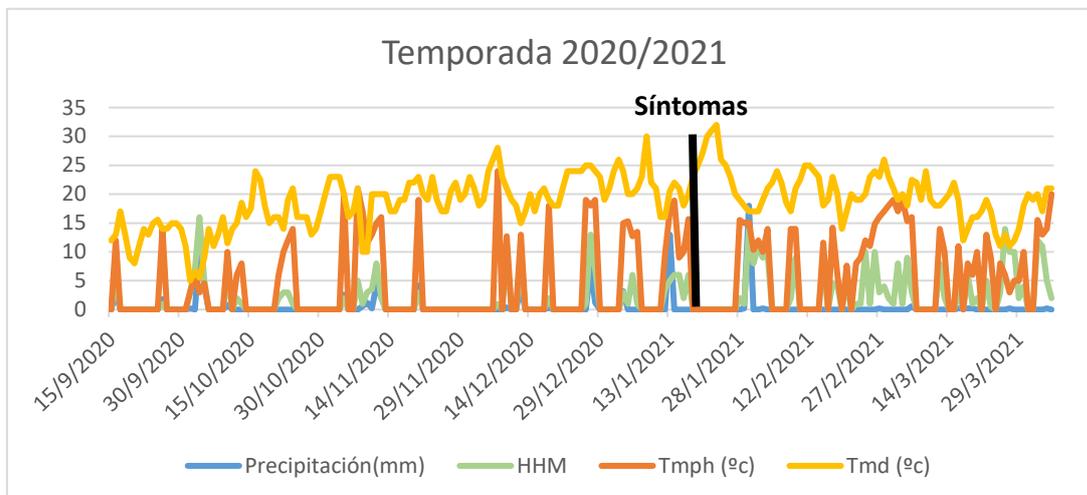


Figura 4.7: Condiciones climáticas de la temporada 2020/2021, número de horas de hoja mojada diarios (HHM), Temperatura media del período húmedo (Tmph, °C), Precipitación diaria (mm), Temperatura media diaria (Tmd, °C) y momento de detección de síntomas.

### Temporada 2021-2022

Durante esta temporada, se monitorearon las Estaciones 2, y 3, ubicadas en General Roca, cada 15 días, desde el 1 de septiembre hasta el 1 de marzo.

En noviembre se detectaron síntomas de la enfermedad, en ambas estaciones, registrando un 5% de incidencia a nivel de hoja en las variedades D'Anjou y Abate Fetel, y 0% a nivel de frutos de dichas variedades. En Packham's y Williams no se registraron síntomas en ninguna estación.

A mediados de febrero, se detectó un incremento de la incidencia, alcanzando un 15% en hojas y 12% en frutos de las variedades D'Anjou y de Abate Fetel, mientras que no se registraron síntomas en hojas ni frutos de Williams y Packham's.

En la Estación 4, el monitoreo efectuado por única vez el 16 de febrero de 2023, momento en que se registraron síntomas sobre hojas y frutos de D'Anjou, Abate Fetel, y también sobre Packham's. A nivel de fruto, D'Anjou presentó una incidencia de 34,6 % y a nivel de hoja del 33,2%. Abate Fetel, una incidencia del 21% en frutos y del 19,6 % en hojas. Packham's, presentó una incidencia en frutos del 26% y en hojas del 0,6%.

En esta temporada, durante la primavera se acumularon 46,2 mm de precipitación, mientras que durante los meses de verano se acumularon 39,6 mm. Del 17 al 21 de enero se acumularon 24,8 mm de lluvia, originándose períodos de hoja mojada que variaron entre 12 y 22 horas de duración y con temperatura media de entre 11 y 17 °C.

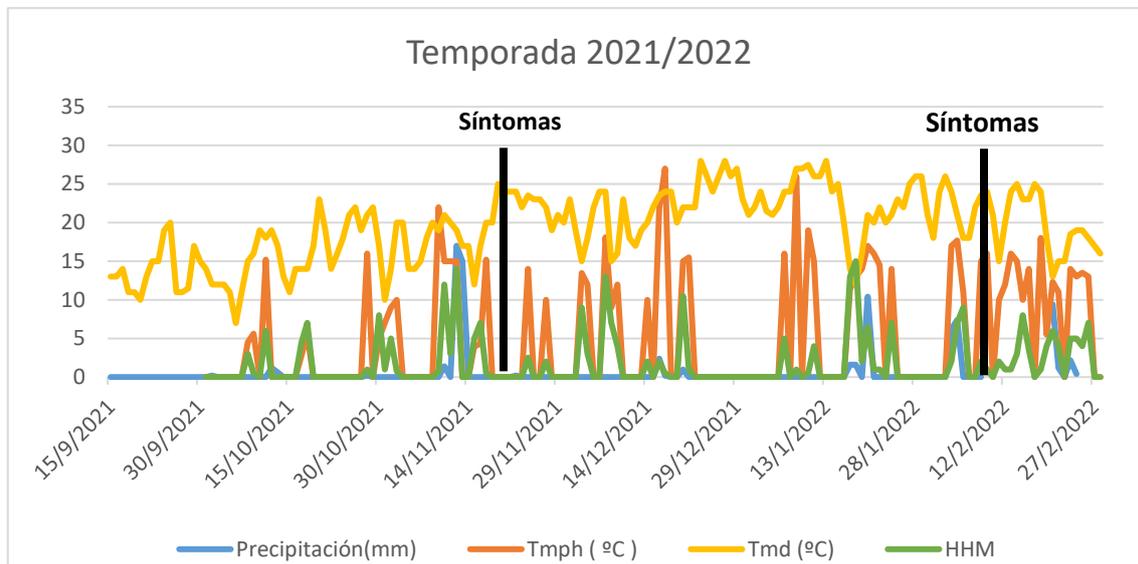


Figura 4.8: Condiciones climáticas de la temporada 2020/2021, número de horas de hoja mojada diarios (HHM), Temperatura media del período húmedo (Tmph, °C), Precipitación diaria (mm), Temperatura media diaria (Tmd, °C) y momento de detección de síntomas.

### Análisis descriptivo de las cuatro temporadas

Considerando únicamente las condiciones climáticas de los 20 días previos a la detección de los síntomas, para las cuatro temporadas analizadas, se estableció la correlación entre: la incidencia (valores medios de incidencia, en hojas y frutos), cantidad de lluvia (mm), temperatura media diaria (Tmd), temperatura media promedio del período húmedo (Tmph), el número de días con precipitación, y el número de días con registro mayor a 10 horas de hoja mojada diarios (Nº días 10 HHM).

En la Figura 4.11 se puede apreciar que tanto la incidencia en hojas como la incidencia en frutos se correlacionaron de manera directa con todas las variables. La correlación de las variables de incidencia fue más intensa con las variables que involucran a la precipitación (mm registrados y días con lluvia) y a las horas de hoja mojada.

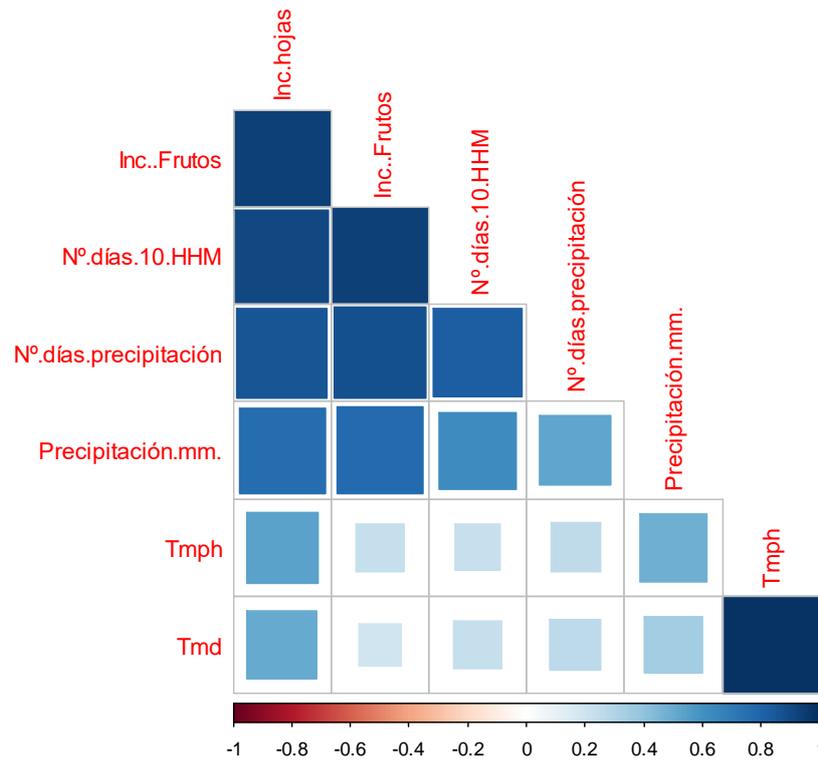


Figura 4.9: Análisis de correlación entre la incidencia de mancha marrón del peral en hojas y frutos para el período 2017-2022 y las variables climáticas asociadas.

### Desarrollo y maduración de las estructuras invernantes

En la temporada 2017, en las estaciones evaluadas, el 51 % de las hojas sintomáticas desarrolló estructuras sexuales y la densidad media fue de 24 pseudotecios por hoja. En la temporada siguiente, el 64,2 % de las hojas sintomáticas desarrolló pseudotecios, con una densidad media de 33 por hoja y, en el 2019, el 89% de las hojas afectadas formaron las estructuras invernantes, y el promedio por hoja fue de 81 pseudotecios (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Abundancia de pseudotecios en hojas por temporada.

Temporada	Hojas con pseudotecios (%)	Pseudotecios por hoja (media + D.E)
2017/2018	51	23,74 ± 35,48
2018/2019	64,20	31,00 ± 33,39
2019/2020	89	81,25 ± 94,95

Con respecto a la evolución de los pseudotecios durante el año, se observó una maduración escalonada en las tres temporadas analizadas (Figura 4.12).

En las temporadas 2017/2018 y 2019/2020 se observó que, en las primeras fechas de muestreo (realizadas en julio), más del 65 % de las estructuras habían superado el estado de primordios pseudoteciales (0), detectando hasta un 25% de las estructuras con más del 50% de sus ascas maduras (IM=3).

En la temporada 2018/2019 el desarrollo fue más tardío, encontrándose en estado de primordio (IM=0) durante julio y agosto inclusive. Sin embargo, a partir de septiembre el IM aumentó rápidamente.

En la temporada 2017/2018 se registraron 233 horas con temperaturas menores a 0 °C durante los tres meses de incubación hasta la primera fecha de muestreo, mientras que en la temporada 2018/2019 se registraron 328 y en la 2019/2020 el registro fue de 258 horas con temperaturas menores a 0 °C.

Para las tres temporadas analizadas, en el mes de octubre se presentaron porcentajes elevados de estructuras con gran cantidad de ascosporas maduras. El registro de pseudotecios que evidenciaron liberación de ascosporas (IM=5) se produjo luego de 6 a 7 meses desde la disposición de las hojas en el campo, en coincidencia con el registro de lluvias (en septiembre para los años 2017 y 2018, y octubre para el año 2019).

Este registro no implicó, en ninguno de los años analizados, la observación de pseudotecios totalmente vacíos. Para las tres temporadas se observó que a fines de temporada permaneció un gran porcentaje de pseudotecios con sus ascas conteniendo ascosporas maduras.

Respecto a las hojas que permanecieron durante 2 temporadas en el interfilar, en el mes de Julio el 80 % de pseudotecios se observó con ascosporas maduras y visualmente turgentes, mientras que el 20 % restante se observó deshidratado. En el muestreo de agosto, más del 50% de los pseudotecios exhibió deshidratación, por lo que dejaron de monitorearse.

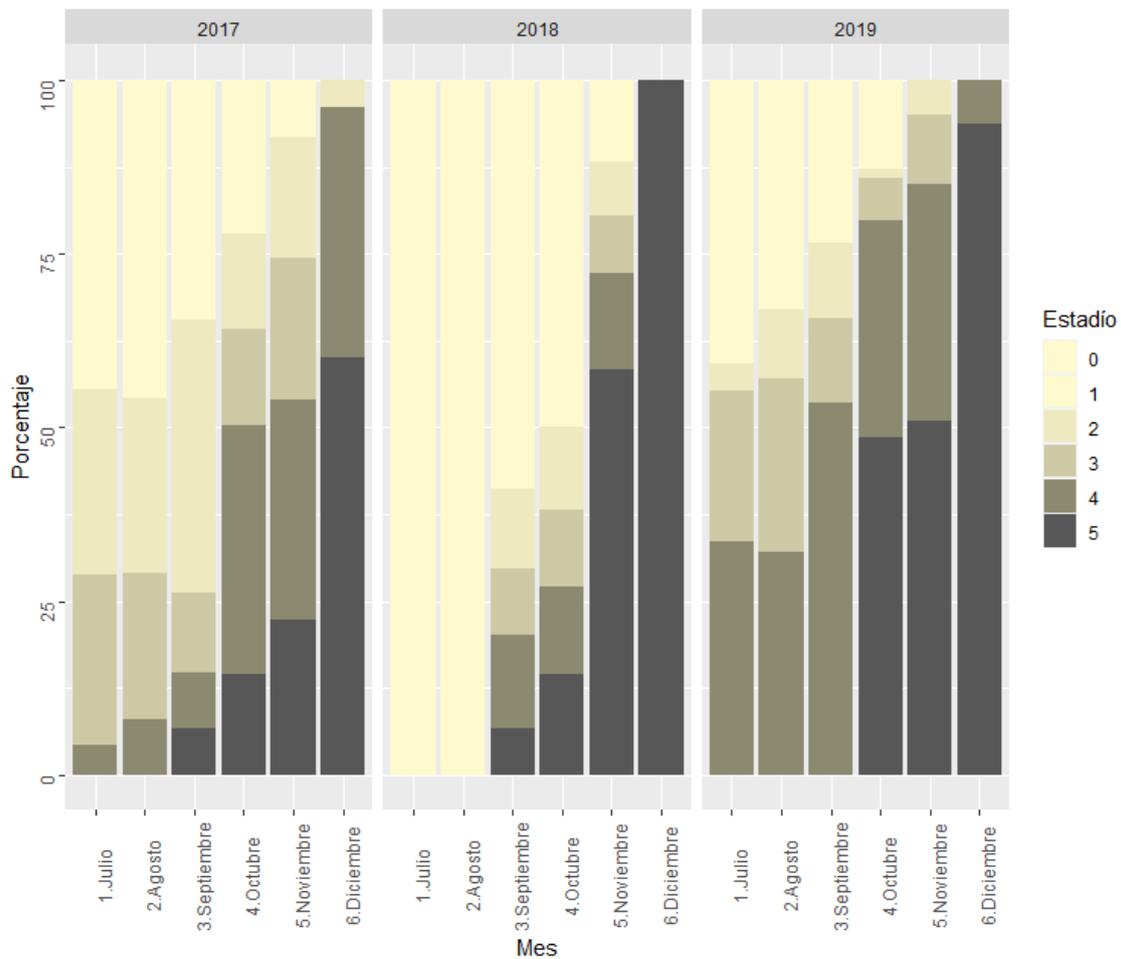


Figura 4.10: Estadios de madurez de los pseudotecios (proporciones) según mes y año.

### Relación de las condiciones climáticas y la maduración de las estructuras invernantes

El análisis de regresión múltiple indicó que las variables T0 (acumulación de horas con temperaturas menores a 0°C), T1 (horas acumuladas con temperaturas entre 4,5 y 10 °C), LA (lluvia acumulada), HT1 (horas acumuladas con temperaturas entre 4,5 y 10 °C y humedad relativa mayor al 90 %), fueron significativas, mientras que las variables H0 (número de horas acumuladas con humedad relativa menor a 90%), H1 (horas acumuladas con humedad relativa mayor al 90 %), y HT0 (horas acumuladas con temperatura menor 0 °C y humedad relativa mayor al 90 %), no tuvieron un aporte significativo, y por lo tanto no fueron incluidas en el mismo.

Se verificó la normalidad y homocedasticidad de los datos, y el modelo obtenido explicó un 94 % de la variabilidad del índice de madurez del pseudotecio. Las variables más contributivas fueron T1

(acumulación de horas con temperaturas entre 4.5 y 10 °C), explicando el 73.4 % de la variabilidad del IM, mientras que HT1 (la acumulación de horas con temperaturas entre 4.5 y 10 °C y humedad relativa mayor al 90%) explicó el 23.9 %.

$$IM = -2.05 + 0,005. T1 + 0,004. LA + 0,012. HT1 - 0,008. T0$$

La ecuación de regresión obtenida indica que las variables T1, LA, y HT1 producen un incremento en el índice de madurez, mientras que la variable T0 no realiza un aporte directo a la madurez del pseudotecio.

## Estudio de las malezas como fuente de inóculo

### Monitoreo de malezas

Los aislamientos realizados en las tres fechas de muestreo arrojaron los siguientes resultados: solo una de las siete malezas monitoreadas dio origen a colonias de *S. vesicarium*. Esta fue *Trifolium repens*, la cual dio origen a 2 aislamientos durante los monitoreos de noviembre y enero (Tabla 4.2). Estos se obtuvieron de Estación 2, mientras que de la Estación 1 no se obtuvieron colonias de *S. vesicarium* desde ninguna maleza. Los aislamientos positivos provienen desde tejido necrótico, el cual se observó extendido entre las nervaduras hasta el borde de la hoja (Figura 4.13).

Tabla 4.2: Frecuencias de aislamiento de *S. vesicarium* en el muestreo de malezas a campo

Momento de muestreo	Frecuencia de aislamiento de <i>S. vesicarium</i> por especie de malezas						
	<i>Bromus catharticus</i>	<i>Festuca sp.</i>	<i>Hordeum marinum</i>	<i>Lolium sp.</i>	<i>Poa sp.</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Trifolium repens</i>
Noviembre	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	1/30
Enero	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	1/30
Marzo	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30
Frecuencias totales	0/90	0/90	0/90	0/90	0/90	0/90	2/90



Figura 4.11: Mancha necrótica en *Trifolium repens*

#### Inoculación de hojas vivas

De las seis malezas inoculadas a campo, solo desde *Trifolium repens*, *Festuca arundinacea*, *Taraxacum officinale* y *Poa sp.*, se logró re-aislar al patógeno.

De los 1000 segmentos sembrados, solo se obtuvieron 6 cepas de *S. vesicarium*, todas ellas desde tejido necrótico. Las necrosis aparecieron inicialmente como pequeñas áreas amarillentas distribuidas irregularmente en las hojas. No se aislaron colonias de *S. vesicarium* desde hojas verdes asintomáticas.

Colonias de *Alternaria sp.* se obtuvieron del 5% de los segmentos asintomáticos y del 11% de los segmentos amarillentos y necrosados, mientras que *Cladosporium sp.* se aisló desde el 5% de los segmentos amarillentos y necróticos.

#### Inoculación de hojas muertas

La cepa SF23 colonizó todas las hojas de malezas y pera inoculadas, obteniendo un 100% de re-aislamiento de *S. vesicarium*, excepto en los controles sin inóculo.

Se produjeron conidios de *S. vesicarium* y pseudotecios de *P. herbarum* en todas las hojas muertas inoculadas, observándose diferencias en la cantidad de esporas producidas entre las especies analizadas. En la visualización con lupa, la producción de estructuras sexuales y asexuales se mostró muy abundante en las malezas.

La lectura de las suspensiones obtenidas de las hojas inoculadas indicó que sobre *Trifolium repens* se produjeron, en promedio, unos 12.000 conidios/cm<sup>2</sup>; sobre *Lolium sp.* y *Bromus catharticus*, un promedio mayor a 6000 conidios/cm<sup>2</sup>; sobre *Taraxacum* se formaron unos 4950 conidios/cm<sup>2</sup>; y sobre *Festuca arundinacea*, unos 2830 conidios/cm<sup>2</sup>. La producción media en hojas de perales fue mayor a 200 en el caso de D'Anjou y Abate Fetel, de 32 para Packham's y 17 para Williams.

Para el análisis de los datos se seleccionó un modelo lineal generalizado con distribución binomial negativa, logrando un ajuste adecuado (prueba de Ajuste de Pearson  $p = 0,52$ ). El test de ANOVA indicó que el factor "especie" tiene un aporte significativo al modelo. El test de Tukey indicó que existieron diferencias en la producción media de conidios de las especies consideradas, siendo las malezas *Trifolium repens*, *Lolium sp.*, *Bromus catharticus*, *Taraxacum officinale* y *Festuca sp.*, las que mayor producción media presentaron, sin diferencias significativas entre sí (grupo c, Tabla 4.3). La producción de conidios sobre las hojas de pera fue significativamente menor que la de las malezas. Considerando a las variedades de pera, la cantidad de conidios fue mayor en las variedades D'Anjou y Abate Fetel (grupo b) que en las variedades Packham's y Williams (grupo a).

Tabla 4.3: Conidios desarrollados en las hojas de malezas y de perales. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

<b>Malezas y variedades de pera</b>	<b>Conidios/cm<sup>2</sup> (media ± DE)</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>	<b>Grupo</b>
<i>T. repens</i>	12088,43 ± 2611,06	9090,91	13867,92	<b>c</b>
<i>Lolium sp</i>	6623,54 ± 1608,90	5000,00	8217,39	<b>c</b>
<i>B. catharticus</i>	6418,29 ± 1963,81	4651,90	8532,93	<b>c</b>
<i>T. officinale</i>	4950,56 ± 1500,97	3509,62	6505,10	<b>c</b>
<i>F. arundinacea</i>	2830,38 ± 1287,67	92000,00	4313,73	<b>c</b>
<i>D'Anjou</i>	236,96 ± 84,26	172,41	332,28	<b>b</b>
<i>Abate Fetel</i>	219,57 ± 46,73	175,85	268,82	<b>b</b>
<i>Packham's</i>	32,37 ± 28,05	0	49,34	<b>a</b>
<i>Williams</i>	17,48 ± 30,28	0	52,45	<b>a</b>

En cuanto a la producción de pseudotecios, se desarrollaron en todas las hojas muertas inoculadas, observándose diferencias de densidad sobre las distintas especies. Todas las malezas tuvieron una producción mayor que las hojas de peral.

*Bromus catharticus* fue la que mayor densidad media presentó en su lámina foliar, de 109 pseudotecios/cm<sup>2</sup>. *Trifolium repens*, *Lolium sp* y *Taraxacum officinale* presentaron una media mayor a 50 pseudotecios/cm<sup>2</sup>, *Festuca arundinacea* una media de 38. Entre las variedades de peral analizadas, D'Anjou y Abate Fetel presentaron medias mayores que D'Anjou y Abate Fetel.

Para el análisis de los datos se seleccionó un modelo lineal generalizado con distribución binomial negativa, logrando un ajuste adecuado (prueba de Ajuste de Pearson  $p=0,21$ ). La prueba de ANOVA indicó que el factor especie tiene un aporte significativo al modelo ( $p = 2.2e^{-16}$ ). El test de Tukey indicó diferencias de producción de pseudotecios entre los especímenes considerados, siendo *Bromus catharticus* (grupo e) y *Trifolium repens* (grupo de) las especies que mayor producción media presentaron (Tabla 4.4).

La producción de estructuras sexuales sobre las hojas de peral fue significativamente menor que la de las malezas. En cuando a las hojas de las distintas variedades de peral, fue mayor en D'Anjou y Abate Fetel (b) que en Packham'sy Williams (a).

Tabla 4.4: Pseudotecios desarrollados en hojas de malezas y de perales. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

<b>Especie</b>	<b>Pseudotecios/cm<sup>2</sup> (media ± D.E.)</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>	<b>Grupo</b>
<i>Bromus catharticus</i>	109,49 ± 2,87	107,06	112,66	<b>e</b>
<i>Trifolium repens</i>	76,38 ± 24,04	57,14	103,33	<b>de</b>
<i>Lolium sp</i>	67,19 ± 8,81	59,40	76,75	<b>d</b>
<i>Taraxacum officinale</i>	54,78 ± 5,94	49,54	61,23	<b>cd</b>
<i>Festuca arundinacea</i>	38,49 ± 12,25	24,47	47,10	<b>c</b>
D'Anjou	15,93 ± 5,94	10,31	22,15	<b>b</b>
Abate Fetel	13,9 ± 2,49	12,02	16,73	<b>b</b>
Packham's	1,18 ± 0,64	0,71	1,91	<b>a</b>
Williams	1,17 ± 0,50	0,7	1,69	<b>a</b>

Para comprobar si el patógeno pudiera perder capacidad patogénica al afectar las malezas, se realizaron los re-aislamientos desde las malezas muertas que habían sido previamente inoculadas con la cepa SF23, y con sus respectivos cultivos monospóricos se generó el inóculo para realizar la comparación de patogenicidad con el aislamiento SF23 original sobre hojas de peral D'Anjou.

Todos los re-aislamientos desarrollaron síntomas sobre las hojas de D'Anjou.

El modelo lineal generalizado con distribución binomial para la proporción de tejido necrosado presentó un ajuste correcto, pasando el test de ajuste de Pearson ( $p = 0.988$ ).

La prueba ANOVA indicó que existen diferencias entre los orígenes de los aislamientos ( $p = 0,0008$ ) y el test de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), indicó que los aislamientos provenientes de *Bromus catharticus*, *Poa sp.*, y *Festuca arundinacea* no presentaron diferencias significativas de patogenicidad sobre las hojas del cultivar D'Anjou respecto a la cepa SF23 original.

En cambio, las cepas re-aisladas desde *Trifolium repens*, *Lolium sp.*, y *Taraxacum officinale*, evidenciaron cierta reducción de patogenicidad (Tabla 4.5).

Tabla 4.5: Patogenicidad sobre hojas de peral del aislamiento SF23 de *S. vesicarium* y de las cepas re-aisladas desde malezas. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

<b>Aislamiento</b>	<b>Manchas/cm<sup>2</sup> (media ± D.E.)</b>	<b>Área foliar afectada (%) (media ± D.E.)</b>	<b>Grupo</b>
<b>SF23</b>	1,91 ± 0,50	45,06 ± 21,39	<b>a</b>
<i>S.v. Bromus catharticus</i>	1,43 ± 0,20	29,84 ± 8,09	<b>ab</b>
<i>S.v. Festuca arundinacea</i>	1,64 ± 0,47	29,03 ± 17,74	<b>ab</b>
<i>S.v. Poa sp.</i>	1,38 ± 0,29	28,38 ± 7,74	<b>ab</b>
<i>S.v. Taraxacum officinale</i>	1,42 ± 0,43	21,93 ± 24,79	<b>b</b>
<i>S.v. Trifolium repens</i>	1,21 ± 0,18	21,09 ± 2,97	<b>b</b>
<i>S.v. Lolium sp.</i>	1,35 ± 0,38	20,71 ± 5,45	<b>b</b>

## Discusión

Las condiciones climáticas de las temporadas analizadas fueron muy variables, así como también lo fueron los valores de incidencia de síntomas de mancha marrón del peral registrados en hojas y frutos. Las temporadas con mayor nivel de incidencia fueron las 2018/2019 y 2021/2022. La primera, presentó una primavera muy lluviosa, con valores atípicos para la región, lo que permitió el desarrollo de la enfermedad ocasionando daños importantes en las variedades D'Anjou y Abate Fetel. La temporada 2021/2022 presentó un verano con frecuentes y abundantes precipitaciones, superando también los valores característicos de la región. Luego de estos eventos se registraron síntomas en D'Anjou, Abate Fetel, y Packham's. En dicha temporada, una de las estaciones de monitoreo presentó incidencias más altas que las demás. Según Llorente et al., (2010), la cantidad de inóculo presente en el monte frutal puede afectar a los niveles de mancha marrón, por lo que las medidas culturales como la limpieza de restos vegetales son muy recomendadas. Además, según un estudio realizado para *Venturia inaequalis* se reportó una correlación positiva significativa entre la concentración aérea de ascosporas y la incidencia de enfermedad (Aylor & Kiyomoto, 1993). De acuerdo con lo establecido por dichos trabajos, las diferencias observadas entre estaciones podrían deberse a distintos niveles de inóculo.

Las variables que según este estudio mostraron tener mayor influencia sobre el valor de incidencia registrado en la zona, son la cantidad de precipitaciones y el número de horas de hoja mojada. Esto coincide con los hallazgos de Llorente & Montesinos (2002), donde mediante ensayos de inoculación en condiciones ambientales controladas, confirmaron que las esporas de *S. vesicarium* requieren la presencia de una película de agua en la superficie de la planta para desarrollar infecciones.

Según un estudio *in vitro*, los pseudotecios del patógeno solo se desarrollan en condiciones de alta humedad relativa, la temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre 10 y 15 °C, la tasa de maduración disminuye a 5 °C, y no maduran a temperaturas superiores a 25 °C (Llorente & Montesinos, 2004). En este trabajo, la evolución de las estructuras invernantes dependió de las condiciones climáticas de la temporada, presentando un desarrollo similar para los años 2017 y 2019, mientras que el 2018 el proceso de madurez fue más tardío pero acelerado. El análisis realizado indicó que la evolución de los pseudotecios se vio favorecida por la acumulación de temperaturas frescas (4,5–10 °C), la combinación de temperaturas frescas con humedad relativa elevada y la acumulación de precipitaciones, mientras que las temperaturas bajo 0 °C no favorecieron a la madurez de estos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Llorente & Montesinos (2004) y por Prados-Ligero et al. (1998), en este último caso con pseudotecios en restos vegetales de cebolla,

en el cual, las variables significativas para la regresión múltiple fueron lluvia acumulada y las temperaturas frescas combinadas con humedad relativa elevada. En una de las temporadas bajo estudio, la 2018, la madurez del pseudotecio tardó mucho más en iniciar que en las demás. Esto se podría atribuir a la mayor acumulación de horas con temperaturas bajo 0°C registradas durante el invierno ese año.

Los pseudotecios presentes en las hojas del suelo del interfilas constituyen una fuente de inóculo que puede afectar a los perales desde mediados de primavera hasta postcosecha. El hecho de que los pseudotecios permanezcan con gran cantidad de ascosporas en su interior podría deberse a las precipitaciones escasas del área de estudio, si se compara con el régimen de precipitaciones de las zonas europeas que presentan la enfermedad. La viabilidad de los pseudotecios en restos de peral de una temporada otra no había sido estudiado anteriormente, y aunque los resultados obtenidos indicaron que no parece constituir una fuente de inóculo considerable, resulta de gran importancia para el manejo de la enfermedad.

Para todas las temporadas analizadas el registro de las primeras infecciones ocurrió a partir de noviembre, momento en el cual se registró que ascosporas maduras y disponibles para liberarse, y las temperaturas medias diarias rondaron los 18 °C. Aunque antes de este momento ocurrieron lluvias, posiblemente no se generaron infecciones debido a que las temperaturas fueron menores a las requeridas. Además, en todos los casos del período estudiado, las infecciones se detectaron luego de que ocurrieran períodos de lluvia que originaron más de 10 horas de hoja mojada. Estos hallazgos complementan a los obtenidos en el capítulo 3, donde mediante ensayos de germinación *in vitro* se obtuvo que a una temperatura de 15 °C la germinación requiere de al menos 8 horas en condiciones de humedad elevada.

La producción de conidios y pseudotecios sobre las hojas de malezas fue mucho mayor que sobre las de perales, coincidiendo con los resultados obtenidos por Rossi et al. (2005) en Italia. En dicho trabajo, la especie que mayor densidad de pseudotecios presentó fue *Setaria glabra* (no incluida en este estudio), seguida por *L. perenne*, *P. pratensis*, *T. repens*, *F. rubra*, *F. ovina* y peral Abate Fetel. Si bien las especies incluidas en este estudio no coinciden completamente con las de Rossi et al. (2005), en ambos ocurrió que *Lolium sp.* y *T. repens* presentaron altos valores de pseudotecios/cm<sup>2</sup> y la variedad Abate Fetel presentó mayor densidad de estructuras que Williams. En el presente estudio, la variedad Abate Fetel se diferenció significativamente de las malezas, presentando una densidad mucho menor, lo cual no ocurrió en el estudio italiano.

En cuanto a los conidios, las malezas presentaron una producción similar, no existiendo diferencias estadísticas entre ellas, pero sí se diferenciaron de las hojas de pera, presentando una mayor densidad. A su vez, entre las variedades de pera, Abate Fetel y D'Anjou tuvieron una producción media significativamente mayor a la presentada por Williams y Packham's. En contraste con estos resultados, en el estudio de Rossi et al. 2005 se presentaron diferencias entre las malezas, siendo *Festuca* la que presentó la mayor producción, seguida por *Lolium perenne* y *Poa pratensis*, además, las variedades de pera no se diferenciaron entre sí.

La inoculación de hojas de pera con los re-aislados de malezas, demostró que el patógeno no perdió la capacidad de afectar perales luego de afectar malezas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Rossi et al. (2005).

Muy pocas colonias de *S. vesicarium* se volvieron a aislar de hojas de malezas vivas, inoculadas a campo. Si bien las especies *Stemphylium* poseen la capacidad de crecer de manera endófito en hojas vivas de numerosas especies (Larran et al., 2000; Sultanova et al., 2002; Rossi et al., 2005), los resultados obtenidos indican que las malezas empleadas en este trabajo no soportan el crecimiento endófito del hongo, al menos bajo las condiciones del ensayo y dentro del período de incubación considerado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rossi et al. (2005).

El monitoreo de malezas a campo indicó que el patógeno no se encuentra sobre hojas de malezas vivas sanas en alta proporción. En los muestreos, las malezas se encontraron, en su mayoría, libres de manchas, y sólo lograron obtenerse aislamientos de *S. vesicarium* desde la especie *Trifolium repens*.

## Conclusiones parciales

El presente capítulo presenta el primer estudio epidemiológico de la mancha marrón del peral en Argentina y América.

Cuando el patógeno está presente en el monte frutal con variedades susceptibles y las condiciones ambientales son favorables (lluvias, número elevado de horas de hoja mojada, y temperaturas medias a cálidas), se producen las infecciones.

Las variaciones climáticas que experimenta la zona del Alto Valle, sobre todo la ocurrencia de eventos extremos de precipitación, podrían permitir que esta enfermedad se convierta en un problema sanitario importante para la producción de peras de la región.

Las condiciones climáticas de la región permiten un adecuado desarrollo y maduración de las estructuras sexuales del patógeno. Los pseudotecios se desarrollan durante el invierno, en los restos vegetales que permanecen en el suelo. Las temperaturas bajas y humedad elevada favorecen su evolución. La diferenciación de las ascosporas ocurre entre los meses de julio y agosto.

En el período comprendido entre octubre y noviembre, existe una cantidad considerable de ascosporas maduras y disponibles para liberarse cuando ocurran las lluvias, además en este momento las temperaturas medias diarias rondan los 18 °C, las cuales son predisponentes para la infección. En dicha época, los frutos presentan un tamaño pequeño, correspondiente al estadio de elongación celular, que, según la bibliografía, es un momento en el cual el fruto es muy sensible a la enfermedad. Las ascosporas se encuentran disponibles hasta la época de cosecha y postcosecha.

Los restos de malezas pueden constituir también una fuente potencial de inóculo, tanto sexual como asexual.

Esta investigación permitió obtener información local sobre el ciclo de vida del patógeno y las potenciales fuentes de inóculo para la región del Alto Valle de Río Negro, Argentina.

## Bibliografía

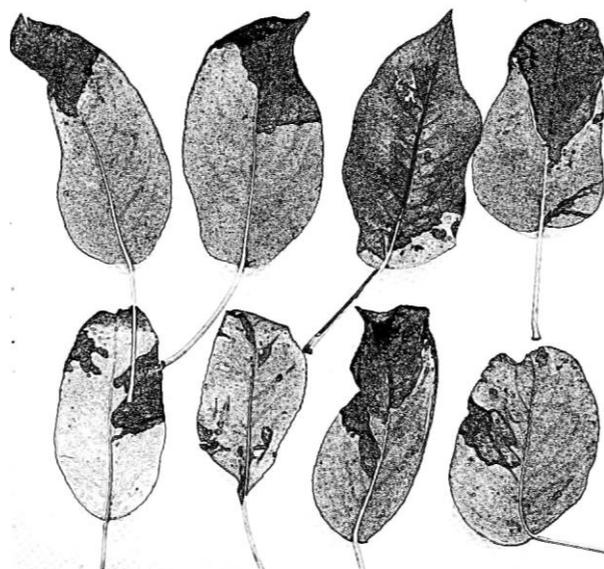
- Aveling, T. A. S., & Snyman, H. G. (1993). Infection studies of *Stemphylium vesicarium* on onion leaves. *Mycological Research*, 97, 984–988.
- Aylor, D. E., & Kiyomoto, R. K. (1993). Relationship between aerial concentration of *Venturia inaequalis* ascospores and development of apple scab. *Agricultural and Forest Meteorology*, 63, 133-147. [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(93\)90057-O](https://doi.org/10.1016/0168-1923(93)90057-O).
- Bugiani, R., Giosue, S., Rossi, V., Spada, G., (2004): I modelli previsionali per la lotta alla maculatura bruna del pero. *Phytomagazine*, 3(6): 43-50.
- Di Masi, S. (2017). La mancha negra del peral afecta la región. *Diario Río Negro*. <http://www.rionegro.com.ar/la-mancha-negra-del-peral-afecta-la-region-YG2293441>.
- González, L. (1976). Introducción a la Fitopatología. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- Hocking, A.D., & Andrews, S. (1987). Dichloran chloramphenicol peptone agar as an identification medium for *Fusarium* species and some dematiaceous hyphomycetes. *Transactions of The British Mycological Society*, 89, 239-244.
- James, J. R., & Sutton, T. B. (1982). Environmental factors influencing pseudothecial development and ascospore maturation of *Venturia inaequalis*. In *Phytopathology* (Vol. 72, Issue 8, p. 1073). <https://doi.org/10.1094/phyto-77-1073>.
- Köhl, J., Groenenboom-de Haas, B. H., Kastelein, P., Rossi, V., & Waalwijk, C. (2009). Quantitative detection of pear- pathogenic *Stemphylium vesicarium* in orchards. *Phytopathology*, 99(12), 1377–1386.
- Larran, S. & Mónaco, C., & Alippi, H. (2000). Endophytic fungi in beet (*Beta vulgaris var. esculenta L.*) leaves. *Advances in Horticultural Science*. 14. 193-196.
- Llorente, I., Vilardell, P., Bugiani, R., Gherardi, I. & Montesinos, E. (2000). Evaluation of BSPcast disease warning system in reduced fungicide use programs for management of brown spot of pear. *Plant Disease* 84, 631-637. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.631>.
- Llorente I., Vilardell P., Moragrega C., Bonaterra A. & Montesinos E. (2003). Biology, epidemiology and integrated control of *Stemphylium vesicarium* on pear, an emerging disease of economic impact in Europe. VIII International Congress of Plant Pathology, Christ Church: New Zealand.
- Llorente, I., & Montesinos E. (2002). Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology*, 92(1):99-104. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.99>.

- Llorente, I. & Montesinos, E. (2004). Development and field evaluation of a model to estimate the maturity of pseudothecia of *Pleospora allii* on pear. *Plant Disease*. 88. 215-219. [10.1094/PDIS.2004.88.2.215](https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.215).
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2006). Brown spot of pear: An emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease*, 90(11), 1368–1375. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1368>
- Llorente, I., Moragrega, C., Ruz, L., & Montesinos, E. (2012). An update on control of brown spot of pear. *Trees - Structure and Function*, 26(1), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0607-1>
- Llorente, I., Vilardell, A., Vilardell, P., Pattori, E., Bugiani, R., Rossi, V., & Montesinos, E. (2010). Control of brown spot of pear by reducing the overwintering inoculum through sanitation. *European Journal of Plant Pathology*. 128: 127-141. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9637-6>.
- Madden, L.V., Hugues, G. & Van Den Bosch, F. (2007). *The study of plant disease epidemics*. APS Press, St. Paul, MN. 432 p.
- March, G., Oddino, C. & Marinelli, A. (2010). Manejo de enfermedades de los cultivos según parámetros epidemiológicos. INTA-UNRC, Córdoba. 193 p.
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., & Vilardell, P. (1995). Susceptibility of selected European pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age. In *Plant Disease* (Vol. 79, Issue 5, pp. 471–473). <https://doi.org/10.1094/PD-79-0471>.
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (2009). *Fungi and food spoilage*. Academic Press 3<sup>rd</sup> ed.
- Prados-Ligero, A. M.; González-Andújar, J. L.; Melero-Vara, J. M., & Basallote-Ureba, M. J. (1998). Development of *Pleospora allii* on garlic debris infected by *Stemphylium vesicarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 104(9), 861–870. <https://doi.org/10.1023/A:1008619604684>
- Prados-Ligero, A.M., Melero-Vara, J., Corpas-Hervías, C., Basallote, M.J (2003). Relationships between weather variables, airborne spore concentrations and severity of leaf blight of garlic caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1023/A:1023519029605>.
- Rodríguez, A. B. & Muñoz, A. R. (2022). Variabilidad agroclimática en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Análisis de los últimos 50 años. INTA Ediciones. Centro Regional Patagonia Norte.

- Rossi, V., & Patteri, E. (2009). Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of Trichoderma-based products. *Biological Control*, 49(1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.12.012>
- Rossi, V., Patteri, E., Giosué, S., & Bugiani, R. (2005). Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology*, 111(4), 361–370. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-5273-3>
- Rossi, V., Bugiani, R., Giosué, S., & Natali, P. (2005). Patterns of airborne conidia of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot disease of pears, in relation to weather conditions. *Aerobiologia*, 21(3–4), 203–216. <https://doi.org/10.1007/s10453-005-9002-y>.
- Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J., & Filtenborg, O. (2000). Introduction to food and airborne fungi. Sixth edition. American Society for Microbiology.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.
- Sultanova, M.K.H., Tashpulatov, M.M. & Abdullaev, B.N. (2002). Pathogenic microflora of plants damaged by cotton whitefly. *Zashchita i Karantin Rastenii* 3: 45.
- Trapero Casas, A., & Kaiser, W. J. (1992). Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. In *Phytopathology* (Vol. 82, Issue 11, p. 1261). <https://doi.org/10.1094/phyto-82-1261>.



## Capítulo 5 : Caracterización biológica: Agresividad de los aislamientos, fitotoxicidad y zoo toxicidad de los extractos fúngicos





## Introducción

El conocimiento de las causas y mecanismos por los cuales los patógenos son capaces de ocasionar daño a sus hospedantes es un tema de suma importancia en la fitopatología y es también fundamental en el contexto de la producción vegetal. La mayoría de los estudios sobre los aspectos cuantitativos de la interacción patógeno - hospedante hacen referencia a la agresividad de los organismos patogénicos. Esta agresividad es entendida como la variación cuantitativa de su patogenicidad sobre hospedantes susceptibles (Pariaud et al., 2009), y puede ser estimada por la cantidad de enfermedad que origina un aislamiento virulento sobre un hospedante susceptible (Van der Plank, 1968). La agresividad es un factor determinante de la capacidad potencial que posee el patógeno de causar pérdidas de rendimiento.

Los hongos correspondientes a diferentes grupos ecofisiológicos como fitopatógenos y saprótrofos, sintetizan una variedad de metabolitos secundarios, que abarcan desde pigmentos, otros con características beneficiosas (Debbab et al., 2012), hasta sustancias tóxicas: antibióticos, fitotoxinas o micotoxinas (Moss, 1996). El género *Stemphylium* produce compuestos antibióticos, anticancerígenos (Debbab et al., 2012), fitotóxicos en distintas especies vegetales (Barash et al., 1975; Barash, 1982), y algunos compuestos con baja toxicidad en pequeños mamíferos (Stricker et al., 2021). La agresividad de las cepas de *S. vesicarium* puede ser explicada por la producción de toxinas específicas del huésped (Toxinas SV I y II) (Singh et al., 1999, 2000), las cuales ocasionan necrosis venosa en las hojas de cultivares de pera susceptibles (Singh et al., 1999). Este tipo de toxinas son compuestos de bajo peso molecular, con diversas estructuras producidas por los patógenos, que determinan su virulencia o patogenicidad (Walton, 1996). Particularmente, las toxinas SV son responsables de la necrosis venosa con el síntoma específico "V" producida por *S. vesicarium* en hojas de perales, y la gravedad de la necrosis puede estar relacionada con la concentración de toxinas y la susceptibilidad varietal (Köhl et al., 2009; Singh et al., 1999). Singh et al. (2000) informaron que estas toxinas ejercen su acción sobre la membrana plasmática generando una disfunción celular, y su producción fue demostrada para aislamientos europeos (Italia) y japoneses (Singh et al., 1999; Tanahashi et al., 2017).

Las micotoxinas en general pueden causar diversos problemas en el ser humano y los animales (Kendrick, 1992), algunas pueden, incluso, ser trasladadas a lo largo de la cadena de producción, y finalmente quedar asociadas a alimentos con los que nunca estuvieron en contacto con hongos contaminantes (Moss, 1996). Los efectos de algunas micotoxinas presentes en los alimentos se manifiestan rápidamente tras el consumo de los productos contaminados, mientras que otras se relacionan con efectos a largo plazo. Entre los principales géneros de hongos reconocidos de

producción de micotoxinas están: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. De los varios cientos de micotoxinas identificadas hasta ahora, unas doce han llamado más la atención debido a sus efectos graves en el ser humano y su frecuencia en los alimentos (OMS, 2018). Entre ellas se encuentra la patulina, la cual es producida por distintos mohos, especialmente *Aspergillus* y *Penicillium*. Sin embargo, existe un reporte de producción de patulina en pera por *S. vesicarium* (Laidou et al., 2001). Las principales fuentes dietéticas humanas de patulina son los jugos de frutas. Según el Codex alimentario, el límite admitido para la patulina en el zumo de manzana es de 50 µg/l (OMS, 2018).

Si bien se sabe que *Stemphylium* produce diversos metabolitos secundarios, los estudios disponibles en la bibliografía en general son limitados (Vera Bahima, 2020). No está registrado que las toxinas SV o los metabolitos producidos por *S. vesicarium* tengan algún efecto adverso a la salud humana, sin embargo, el género se clasificó por muchos años en Canadá como un agente de posible riesgo (nivel 2). En el año 2018, la Agencia de Salud Pública de dicho país (PHAC), lo recategorizó como un agente de riesgo básico (nivel 1), es decir, que representa poco o ningún riesgo para los seres humanos o los animales (Stricker et al., 2021). Algunos estudios señalan a las esporas de *Stemphylium* como responsables de alergias y alteraciones respiratorias en caballos (Al-Doory & Ramsey, 1987), e infección de la piel en gatos (Lloret et al., 2013).

*Artemia salina* es un crustáceo sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica y de muy diversas estructuras químicas (Meyer et al., 1982). El bioensayo con dichas larvas se considera una herramienta útil para estudios preliminares de sustancias con actividad biológica, entre ellas micotoxinas y extractos fúngicos (González et al., 2005). Se utiliza hace muchos años, catalogándose como un sistema de detección adecuado para probar la toxicidad de los hongos (Harwig & Scott, 1971). Fue propuesto por Michael et al. (1956) y por Vanhaecke et al. (1981) para pruebas de toxicidad, y también para la determinación de la concentración letal 50 o del porcentaje de mortalidad que produce una sustancia (Wijnands & van Leusden, 2000). El sistema cuenta con las ventajas de que los huevos tienen amplia disponibilidad comercial y la metodología es rápida y sencilla.

## Objetivos generales

Caracterizar la agresividad de los aislamientos, la fitotoxicidad de los extractos crudos sobre hojas y evaluar la posible zootoxicidad de los extractos.

## Objetivos específicos

1. Determinar la agresividad de aislamientos de *S. vesicarium* del Alto Valle de Río Negro sobre hojas de las principales variedades cultivadas en la zona del Alto Valle (Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel).
2. Evaluar la fitotoxicidad de los extractos crudos en relación con la producción potencial de toxinas SV mediante un bioensayo en hojas de perales Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel.
3. Evaluar la zootoxicidad potencial de los extractos de los aislamientos mediante el bioensayo con *Artemia salina*.

## Materiales y Métodos

### Bioensayos en hojas

#### Material vegetal

Se utilizaron hojas de los cultivares de pera D'Anjou, Packham's, y Abate Fetel como plantas hospederas y de los cultivares Red Delicious y Cripp's Pink de manzana como plantas no hospedantes. Las hojas, jóvenes y sanas, fueron obtenidas desde árboles frutales en buen estado nutricional y sanitario, ubicados en un cuadro perteneciente a la Estación Experimental agropecuaria (EEA) Alto Valle de INTA. Se trasladaron al laboratorio de Fitopatología de la misma institución, donde se desinfectaron por inmersión durante un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % y se enjuagaron tres veces con ADE. Una vez secas, se trasladaron a la cámara de flujo laminar, para su posterior inoculación (Figura 5.1).



Figura 5.1: Hojas de peral dispuestas en cámara de flujo laminar, para su secado y posterior inoculación.

### Producción de inóculo

Se emplearon los 21 aislamientos de *S. vesicarium* caracterizados previamente a nivel morfológico y molecular. Se cultivaron en medio de AA (Anexo I) en placas de Petri de 9 cm de diámetro y se incubaron durante tres semanas a 25 °C y fotoperíodo de 16 h bajo luz azul-negra hasta la esporulación completa. La superficie de las colonias se inundó con 9 mL de ADE y los conidios se recolectaron frotando suavemente la superficie con un pincel. Las suspensiones se filtraron a través de una capa de gasa para eliminar los restos de micelio. La concentración de conidios se ajustó a  $5 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  con ADE, usando una cámara de Neubauer (Tanahashi et al., 2017).

### Obtención de los extractos crudos

Pequeños trozos de micelio de los 21 aislamientos fueron obtenidos desde colonias desarrolladas en placas de Petri con medio PDA (Anexo I) por 7 días. Fueron cultivados individualmente en un matraz de 500 mL que contenía 200 mL de medio líquido de Richard modificado (Anexo I), y se incubaron a 27 °C bajo luz difusa continua durante 20 días.

Concluido el período de incubación, el medio de cultivo se filtró al vacío a través de papel de filtro Whatman grado 50 (Figura 5.2). Se realizó una segunda filtración a través de filtro de jeringa de 0,2  $\mu\text{m}$  (Tanahashi et al., 2017).



Figura 5.2: Obtención de extractos crudos de *S. vesicarium*. Filtraciones.

### Test de agresividad sobre hojas

Las hojas se inocularon pulverizando las suspensiones conidiales sobre su cara abaxial, con un atomizador, utilizando 1 mL por hoja (Figura 5.3). En el caso de los controles, se pulverizaron con ADE.

Posteriormente, las hojas se colocaron individualmente en una cámara húmeda (Tanahashi et al., 2017), compuesta por una placa de Petri sellada con Parafilm, dentro de una bolsa de polietileno, y se incubaron por 48 horas a 25 °C en oscuridad. Las condiciones de humedad se mantuvieron utilizando trozos de algodón esterilizados y saturados con ADE.

Concluido el periodo de incubación, se fotografiaron las hojas utilizando una cámara de resolución de 16 megapíxeles, las imágenes obtenidas se procesaron con el software ImageJ (Schneider et al., 2012). El programa determinó el área total y el área necrótica de cada hoja, con lo cual se calculó el porcentaje de área foliar afectada por necrosis.

Los porcentajes se organizaron en niveles de agresividad según la escala de Tanahashi et al. (2017) de la siguiente manera: (-): sin necrosis, 0%; (±): una pequeña cantidad de necrosis alrededor del punto de inoculación,  $1 \leq 5,00\%$ ; (+):  $5,01 \leq 25,00\%$ ; (++) :  $25,01 \leq 50,00\%$ ; (+++) :  $50,01 \leq 100\%$ .

Según Moragrega et al. (2018), los niveles de agresividad o toxicidad (-) y (±) representan aislamientos no agresivos/tóxicos. Los aislamientos incluidos en el nivel (+) se consideraron de baja agresividad / toxicidad, los incluidos en el nivel (++) se consideraron de moderada agresividad / toxicidad y los incluidos en el nivel (+++) se consideraron de alta agresividad / toxicidad.



Figura 5.3: Test de agresividad. Inoculación de hojas con suspensión conidial de *S. vesicarium*.

### Test de fitotoxicidad

La parte inferior de las hojas se lesionó levemente en su parte central con un par de pinzas y se colocó una gota de 40  $\mu$ l de cada filtrado de cultivo en el sitio de la herida (Figura 5.4).

Los controles negativos se realizaron con una gota de ADE (Tanahashi et al., 2017).

La incubación de las hojas se realizó de la misma forma que en el test de agresividad, así como la determinación del porcentaje de área foliar afectada por necrosis. Los porcentajes se organizaron en niveles de agresividad según la escala de Tanahashi et al. (2017) descritos en el test de agresividad.



Figura 5.4: Test de fitotoxicidad. Inoculación de hojas de peral con extractos crudos de *S. vesicarium*.

### Diseño del experimento y análisis

Para ambas pruebas (agresividad y fitotoxicidad), se utilizó un diseño completamente aleatorizado con estructura factorial, con aislamiento y variedad como factores, y con tres réplicas por aislamiento. Los ensayos fueron repetidos tres veces.

Para ambos análisis, se utilizó como respuesta el porcentaje de área foliar afectada por necrosis, y las variables aislamiento, variedad y su interacción se utilizaron como variables predictoras. Se utilizaron modelos lineales con ajuste de la matriz de varianzas/covarianzas debido a la falta de homocedasticidad entre las variedades. La heterocedasticidad entre las variedades fue compensada por una función "varident". Los supuestos se verificaron gráficamente y mediante la prueba de razón de verosimilitud. Se realizó el análisis de varianza y la comparación de medias con el método de LSD

Fisher con corrección de  $p$ -valor de Bonferroni. Los datos fueron analizados con la versión 4.2.3 de R.

### Zootoxicidad sobre larvas de *Artemia salina*

#### Obtención de los extractos

Los 21 aislamientos de *S. vesicarium* caracterizados previamente a nivel morfológico y molecular se cultivaron por siete días en medio PDA. Desde cada placa se tomaron discos de micelio de 0,5 cm de diámetro y se sembraron individualmente en el centro de placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo medio DRYES (Anexo I). Se incubaron a 25 °C durante 15 días (Andersen et al., 2015; Medina et al., 2021). A partir de los cultivos, se realizó una extracción con cloroformo (20 mL por placa) en bolsas de nylon herméticas. Después de homogeneizar durante 2 minutos, la mezcla se filtró al vacío a través de sulfato de sodio y papel de filtro Whatman grado 1. El sobrenadante se evaporó a sequedad bajo campana de extracción. El residuo se reconstituyó en 1 mL de metanol. El procedimiento de extracción se ilustra en la Figura 5.5.

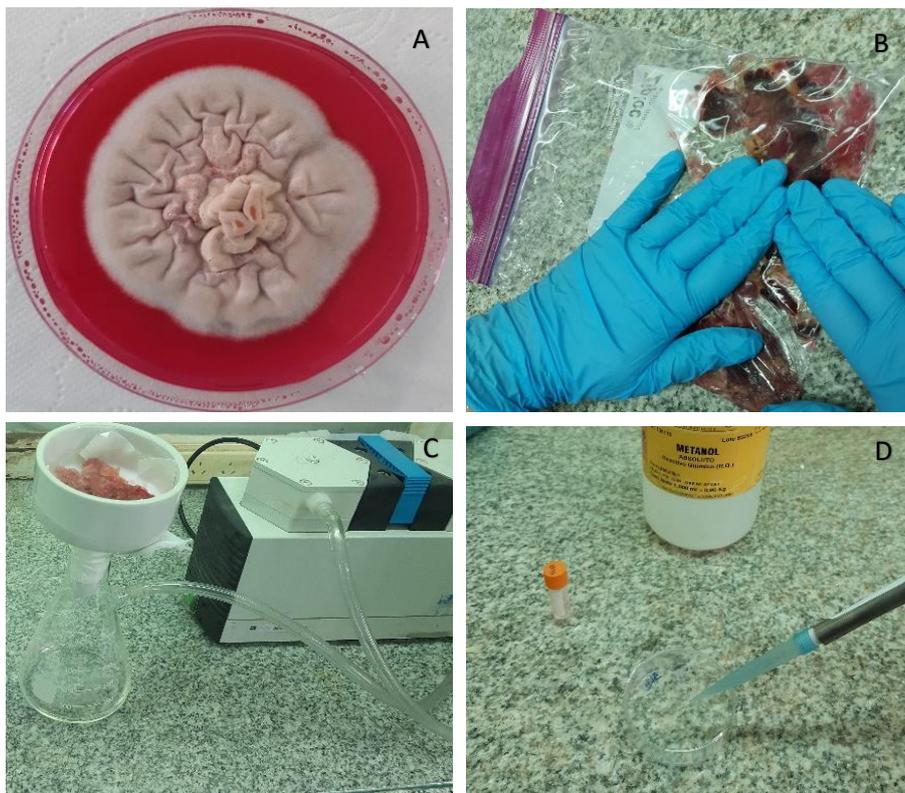


Figura 5.5: Procedimiento de obtención de extractos clorofórmicos. Colonia de *S. vesicarium* en medio DRYES (A). Extracción con cloroformo (B). Filtrado (C). Reconstitución del residuo (D).

## Obtención de las larvas

Se agregaron 0,1 gr de huevos de *Artemia salina* a medio de crecimiento compuesto por 100 mL de ADE y 3,2 gramos de sal marina.

La solución se incubó durante tres días en forma estacionaria y oscuridad a 25°C para permitir la eclosión de los huevos (Ludeman et al., 2009).

## Bioensayo

Se colocó 1 mL de la suspensión de *Artemia salina* y 10 µL de cada extracto fúngico a testear en cada una de las celdas de una placa de cultivo de células.

Después de 24 h de incubación a 25 °C, se determinó el número de larvas muertas mediante el uso de un microscopio estereoscópico, mientras que el número total de larvas se determinó después de 24 h de congelación a -20 °C, y los resultados se expresaron como porcentaje de mortalidad para cada extracto fúngico (Ludeman et al., 2009).

Se incluyó en paralelo un control de muerte por medio base sin patógeno y extracción con metanol. El ensayo se realizó por duplicado.

Los rangos de toxicidad fueron considerados según Harwig y Scott (1971):

1. No tóxicos (NT): entre 0 y 9% de mortandad.
2. Levemente tóxico (LT): entre 10 y 49% de mortandad.
3. Tóxico (T): entre 50 y 89% de mortandad.
4. Muy tóxico (MT): mayor del 90% de mortandad.

## Diseño del experimento

Se realizó un diseño totalmente aleatorizado, con tres repeticiones por extracto, sorteando la ubicación de los extractos en las celdas de cultivo. El ensayo se realizó dos veces.

## Resultados

### Bioensayos en hojas

#### Agresividad sobre hojas

Las suspensiones conidiales fueron capaces de reproducir los síntomas de la enfermedad en hojas de peral (planta hospedante), pero no en hojas de manzano (planta no hospedante). Tampoco se desarrollaron síntomas sobre los controles.

El número de manchas por unidad de área foliar en las variedades Williams y Packham's arrojó valores medios menores a 0,2 manchas/cm<sup>2</sup>, mientras que las variedades Abate Fetel y D'Anjou se obtuvieron valores medios de 1,83 y 2,15 manchas/cm<sup>2</sup>, respectivamente.

En cuanto a superficie foliar necrosada, en Williams el porcentaje de área afectada fue del 0,09 ± 0,22; en Packham's de 0,06 ± 0,18; en Abate Fetel 12,61 ± 11,41; y en D'Anjou 13,38 ± 11,64. El análisis estadístico indicó que las variedades más afectadas fueron D'Anjou y Abate Fetel, no presentando entre sí diferencias estadísticas significativas. Las hojas de las variedades Packham's y Williams fueron menos afectadas que las anteriores, no presentando diferencias estadísticas entre ellas.

El test de medias indicó que los aislamientos más agresivos fueron SL39 y SL63 sobre las variedades Abate Fetel y D'Anjou, y SF24 sobre D'Anjou. Los valores medios de superficie foliar afectada por cada aislamiento y el test de medias se presentan en el Anexo III.

En la Figura 5.6 se puede ver el efecto de la cepa SF23 sobre las hojas de los cuatro cultivares de pera.

De acuerdo con la escala de Moragrega et al., (2018), los resultados indicaron que sobre las variedades Packham's y Williams, ninguno de los aislamientos resultó agresivo. En D'Anjou, 5 de los 21 aislamientos (23,8 %) resultaron no agresivos, 5 presentaron agresividad baja (23,8 %) y 11 (52,4 %) agresividad moderada. En Abate Fetel, 7 aislamientos (33,3 %) fueron no agresivos, 3 (14,4 %) presentaron agresividad baja, y 11 (33,3 %) mostraron agresividad moderada (Figura 5.7).

Los resultados de la clasificación de agresividad obtenida por aislamiento y variedad se pueden apreciar en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Agresividad y toxicidad obtenidas para cada aislamiento en los cuatro cultivares de pera, donde A: Agresividad y T: Toxicidad. Los resultados se expresan de acuerdo con la escala establecida, la cual indica que los aislamientos que resultaron (-) y ( $\pm$ ) no son fitotóxicos/agresivos, (+) son levemente fitotóxicos/agresivos, y los (++) son moderadamente fitotóxicos/agresivos.

Cepa	Cultivares							
	Williams		Packham's		D'Anjou		Abate Fetel	
	A	T	A	T	A	T	A	T
SF4	-	-	-	-	++	+	++	+
SF5	-	-	-	-	$\pm$	+	$\pm$	+
SF8	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+	$\pm$	+
SF9	-	-	-	-	++	+	++	+
SF13	-	-	-	-	++	+	++	+
SF19	-	-	-	-	++	+	++	+
SF20	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+	$\pm$	+
SF21	$\pm$	$\pm$	$\pm$	-	+	+	+	+
SL22	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+	$\pm$	+	$\pm$	+
SF23	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+	+	+	+
SF24	-	-	-	-	++	+	++	+
SL35	-	-	$\pm$	-	++	+	++	+
SL37	-	-	-	-	++	+	++	+
SL39	-	-	-	-	++	+	++	+
SL40	-	-	-	-	+	+	+	+
SL61	-	-	$\pm$	-	++	+	++	+
SL62	$\pm$	$\pm$	-	$\pm$	+	+	$\pm$	+
SL63	-	-	-	-	++	+	++	+
SL65	-	-	-	-	$\pm$	+	$\pm$	+
SL68	$\pm$	-	$\pm$	-	++	+	++	+
SL70	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	+	+	$\pm$	+

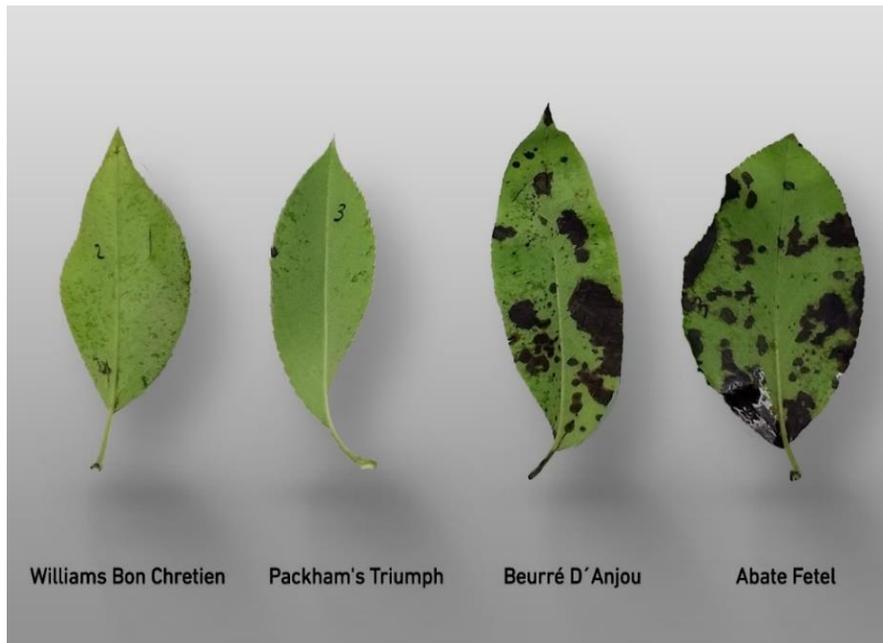


Figura 5.6: Agresividad de la suspensión conidial del aislamiento SF23 de *S. vesicarium* sobre las hojas de las cuatro variedades de pera.

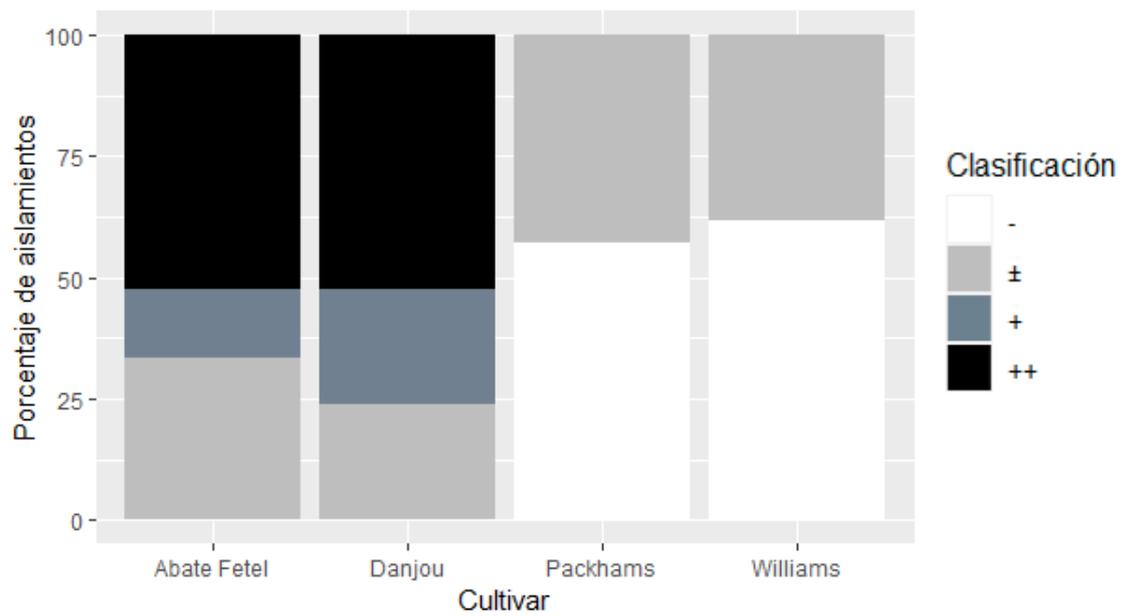


Figura 5.7: Porcentaje de los 21 aislamientos de *S. vesicarium* que resultaron no agresivos (- y ±), de agresividad leve (+), y de agresividad moderada (++) en las cuatro variedades analizadas.

### Toxicidad sobre hojas

Los filtrados no produjeron necrosis sobre las hojas de manzano (planta no huésped). Tampoco se desarrollaron síntomas sobre los controles.

Los resultados indicaron que en las hojas de las variedades Packham's y Williams, ninguno de los filtrados resultó tóxico. En las variedades Abate Fetel y D'Anjou, todos los aislamientos presentaron un nivel de toxicidad leve (entre 5 y 25% de la superficie foliar afectada por necrosis).

En la Figura 5.8 se puede ver el efecto fitotóxico del filtrado de la cepa SF23 sobre una hoja de cada cultivar evaluado. Los resultados de esta prueba se pueden apreciar gráficamente en la Figura 5.9.

Los resultados de la clasificación de toxicidad obtenida por aislamiento y variedad se pueden apreciar en la Tabla 5.1. Según el test de medias, los aislamientos más fitotóxicos fueron SF4, SL63, SF23 y SF19 sobre D'Anjou, y SF19 Y SF20 sobre Abate Fetel. Los valores medios de superficie foliar afectada por cada aislamiento en los distintos cultivares y los resultados del test de medias se presentan en el Anexo III.



Figura 5.8: Efecto fitotóxico del extracto crudo del aislamiento SF23 de *S. vesicarium* sobre las hojas de cuatro variedades de pera.

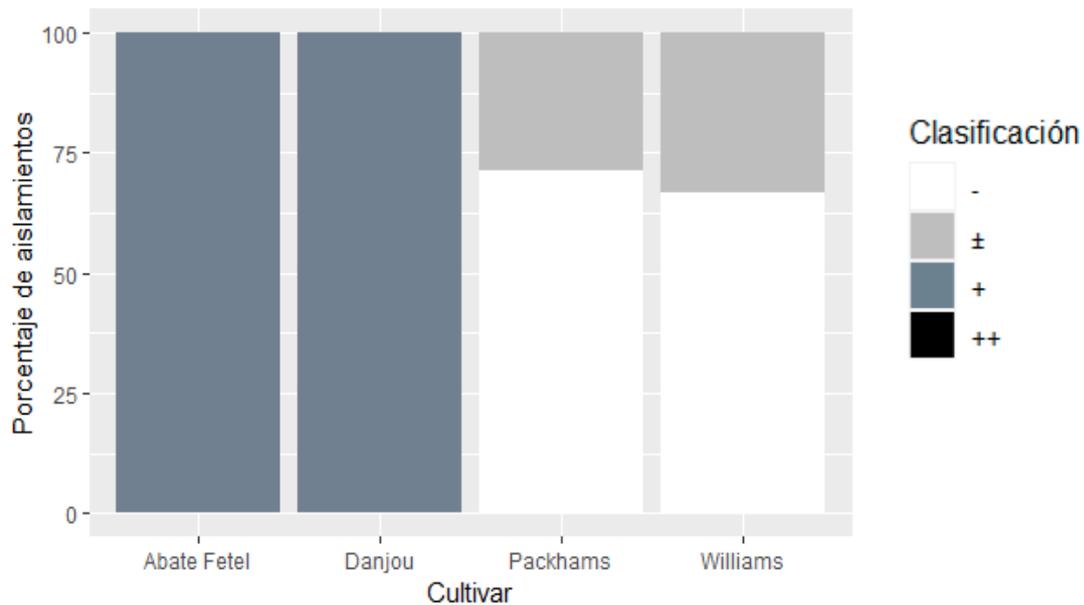


Figura 5.9: Porcentaje de los 21 aislamientos de *S. vesicarium* que resultaron no fitotóxicos (- y ±), levemente fitotóxicos (+) y moderadamente fitotóxicos (++) en las cuatro variedades de pera.

### Zoo toxicidad sobre larvas de *Artemia salina*

El porcentaje medio de larvas muertas que resultaron de la exposición a cada extracto fue calculado sobre el porcentaje medio de larvas muertas en el control sin el extracto (medio base sin patógeno). El efecto tóxico sobre las larvas *A. salina* de los extractos fúngicos obtenidos desde los medios Richard modificado y DRYES, fueron clasificados según Harwing y Scott (1971). Según dicha escala, el 4,8 % de los extractos crudos, obtenidos desde medio Richard modificado, presentaron efecto muy tóxico, el 66,6 % fueron tóxicos, y el 28,6 % presentó toxicidad leve. De los extractos metanólicos, obtenidos desde medio Dryes, el 4,8 % resultaron muy tóxicos, 90 % fueron tóxicos, el 4,8 % fueron levemente tóxicos (Figura 5.10).

Los resultados de los extractos detallados por aislamiento se pueden observar en la Tabla 5.2.

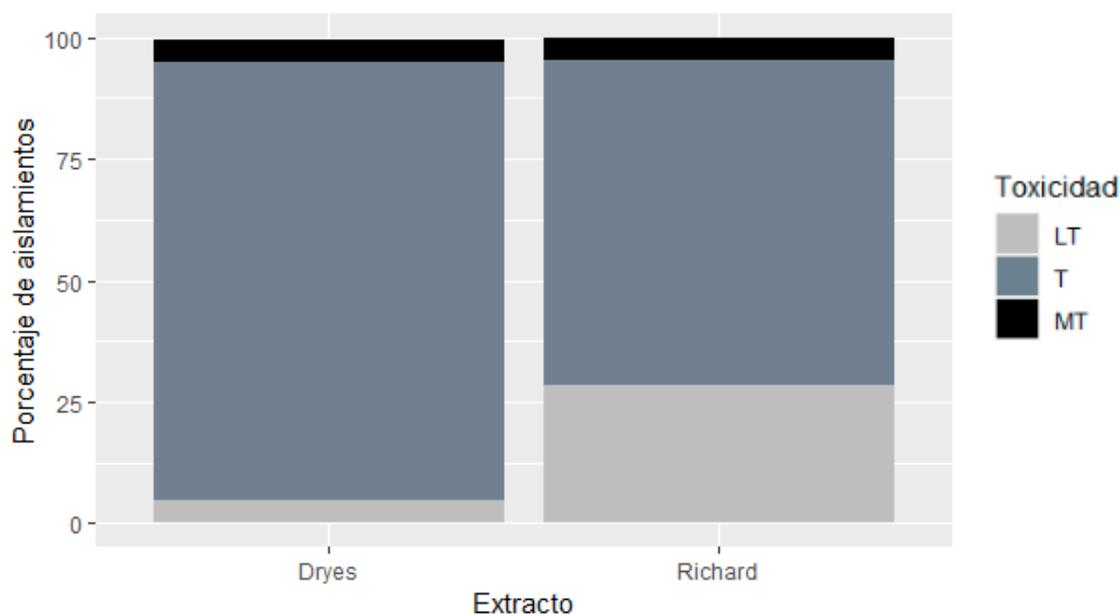


Figura 5.10: Porcentaje de los 21 aislamientos que resultaron levemente tóxicos (LT, 10-49% mortandad), tóxicos (T, 50-89% de mortandad) y muy tóxicos (MT, >90% mortandad) sobre larvas de *Artemia salina*, según el tipo de extracto fúngico.

Tabla 5.2: Efecto tóxico de los extractos de *S. vesicarium* sobre larvas de *Artemia salina*. Clasificación según porcentaje de mortandad: No tóxicos (NT): 0-9%. Levemente tóxico (LT): 10-49%. Tóxico (T): 50-89% de mortandad. Muy tóxico (MT): >90%.

Aislamiento	Origen del extracto	Porcentaje medio de larvas muertas $\pm$ DE	Toxicidad
SF4	Medio líquido de Richard	86,65 $\pm$ 10,11	T
	DRYES	87,53 $\pm$ 5,65	T
SF5	Medio líquido de Richard	67,80 $\pm$ 9,73	T
	DRYES	83,18 $\pm$ 5,52	T
SF8	Medio líquido de Richard	59,10 $\pm$ 8,63	T
	DRYES	74,28 $\pm$ 8,56	T
SF9	Medio líquido de Richard	83,00 $\pm$ 8,34	T
	DRYES	67,47 $\pm$ 10,86	T
SF13	Medio líquido de Richard	88,20 $\pm$ 7,92	T
	DRYES	75,18 $\pm$ 11,49	T
SF19	Medio líquido de Richard	88,60 $\pm$ 7,35	T
	DRYES	51,87 $\pm$ 16,76	T

SF20	Medio líquido de Richard	87,50 ± 19,37	T
	DRYES	51,55 ± 16,95	T
SF21	Medio líquido de Richard	35,05 ± 30,05	LT
	DRYES	45,73 ± 20,50	LT
SL22	Medio líquido de Richard	81,30 ± 17,68	T
	DRYES	75,35 ± 8,07	T
SF23	Medio líquido de Richard	83,80 ± 14,14	T
	DRYES	85,90 ± 2,49	T
SF24	Medio líquido de Richard	42,00 ± 49,64	LT
	DRYES	78,82 ± 5,39	T
SL35	Medio líquido de Richard	71,50 ± 15,70	T
	DRYES	75,93 ± 8,49	T
SL37	Medio líquido de Richard	40,45 ± 18,88	LT
	DRYES	71,02 ± 10,18	T
SL39	Medio líquido de Richard	36,90 ± 13,86	LT
	DRYES	64,67 ± 4,62	T
SL40	Medio líquido de Richard	13,35 ± 27,79	LT
	DRYES	79,02 ± 10,12	T
SL61	Medio líquido de Richard	62,10 ± 25,88	T
	DRYES	75,81 ± 12,42	T
SL62	Medio líquido de Richard	93,80 ± 0,00	MT
	DRYES	90,7 ± 9,81	MT
SL63	Medio líquido de Richard	84,15 ± 13,65	T
	DRYES	78,45 ± 12,33	T
SL65	Medio líquido de Richard	81,00 ± 10,18	T
	DRYES	79,3 ± 5,71	T
SL68	Medio líquido de Richard	16,95 ± 18,60	LT
	DRYES	73,87 ± 12,28	T
SL70	Medio líquido de Richard	67,00 ± 2,55	T
	DRYES	75,25 ± 4,76	T

## Discusión

Respecto a la agresividad de los aislamientos y la toxicidad de sus extractos crudos sobre las hojas de los diferentes cultivares de peral, sus niveles fueron ponderados en virtud de la magnitud del área necrótica originada. Los resultados indicaron una considerable proporción de aislamientos que presentaron agresividad moderada en las variedades Abate Fetel y D'Anjou (52,3 %), mientras que en las hojas de las variedades Packham's y Williams, ninguno de los aislamientos fue agresivo. Los resultados indicaron que los cultivares D'Anjou y Abate Fetel fueron los más afectados, tanto en el ensayo de agresividad como en el de toxicidad. Esto es consistente con las observaciones realizadas a campo, en las cuales, infecciones severas fueron detectadas en hojas y frutos de Abate Fetel y D'Anjou, mientras que en Williams y Packham's la infección fue menor (datos presentados en el Capítulo 6). Se obtuvieron resultados similares en pruebas con cepas europeas de *S. vesicarium*, en las que se caracterizó a Abate Fetel como altamente susceptible, mientras que Williams y Packham's fueron caracterizadas como poco o nada susceptibles (Llorente et al., 2012; Montesinos et al., 1995; Pattori et al., 2006; Rossi et al., 2005). De esta manera, queda puesto de manifiesto que *Stemphylium vesicarium* es un patógeno asociado a ciertas variedades de peral. Otras investigaciones también han reportado diferentes grados de agresividad y toxicidad en una variedad de plantas hospedadoras (Foster et al., 2019; Köhl et al., 2009; Singh et al., 1999). En cuanto a la fitotoxicidad, un aislado (IT37) mostró mayor toxicidad en comparación con los otros aislados probados, y el cultivar de pera europea más susceptible fue Alexandrine Douillard (Singh et al., 1999). Estudios desarrollados en Japón mostraron resultados similares, donde el cultivar de pera europea Le lectier fue el más susceptible a *S. vesicarium* mientras que el cultivar europeo Bartlett y el japonés Nijisseiki no fueron afectados por los aislamientos (Tanahashi et al., 2017). Asimismo, resulta importante destacar que no fue posible establecer una diferenciación del grado de patogenicidad o toxicidad asociado a cada origen de aislamiento (foliar o frutal), ya que exhibieron similar comportamiento en cuanto a la capacidad de generar necrosis en las hojas. En el estudio realizado por Temperini et al. (2022), se obtuvo que los aislamientos de *S. vesicarium* obtenidos desde muestreos de aire presentaron menor agresividad y fitotoxicidad que los obtenidos desde tejidos vegetales de peral, mientras que estos últimos no presentaron diferencias significativas entre sí.

Durante la colonización del hospedador el patógeno puede producir muchos metabolitos tóxicos, entre ellos las fitotoxinas, involucrados en la patogénesis de plantas. Las toxinas SV alteran la membrana plasmática de las células, provocando la fuga de electrolitos y ocasionando la necrosis venosa en las variedades de pera susceptibles (Singh et al., 2000). Respecto a los aislamientos

evaluados en este estudio, se ha podido determinar que la mayoría de ellas presentan actividad fitotóxica sobre las hojas de las variedades susceptibles, poniendo así de manifiesto la producción de metabolitos secundarios bioactivos (fitotoxinas), incluyendo posiblemente a las toxinas SV. Las variedades menos sensibles, presentaron una respuesta fitotóxica menor, por lo que se puede concluir que el efecto de las toxinas es definido por el fenómeno de interacción huésped-patógeno, coincidiendo con lo expuesto por Singh et al. (1999). El hecho de que los filtrados crudos hayan tenido un efecto fitotóxico sobre las variedades susceptibles a la infección podría señalar que las toxinas SV están presentes en los extractos, y que, por lo tanto, los aislamientos estudiados son capaces de producirlas.

Diversos estudios han empleado el bioensayo de exposición de larvas de *Artemia salina* a los extractos fúngicos, obteniendo una buena concordancia entre la mortalidad exhibida por estos crustáceos y la detección de metabolitos fúngicos y micotoxinas mediante los análisis de HPTLC o HPLC (González et al., 2005; González et al., 2007; Logrieco et al., 1996; Visconti et al., 1992; Harwig y Scott, 1971). En el presente estudio, la elevada proporción de extractos que resultaron tóxicos para las larvas sugiere que sería recomendable un análisis de su composición. Dicha información permitiría la identificación compuestos producidos por los aislamientos y de su riesgo potencial para la salud humana. Se ha reportado que el género *Stemphylium* produce varios compuestos además de las toxinas SV, como estemfilina, estemfiloxinas I y II, estemfol, estemfiperilenol, y estemfilotoxinas I-IV. El efecto de las toxinas SV y de las estemfiloxinas I y II no ha sido estudiado en mamíferos (Stricker et al., 2021). En el caso de la estemfilina, se ha encontrado que a dosis bajas tiene propiedades anticancerígenas en células de leucemia de ratón (Assante & Nasini 1987), también mostró toxicidad para las bacterias, pero no tuvo efectos contra cinco tipos de cáncer humano (Zhou et al., 2015). El estemfiperilenol exhibió actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos, y citotoxicidad contra células de cáncer de colon humanas (Xiao et al., 2014). El estemfol presentó actividad antimicrobiana contra hongos, levaduras y bacterias (Marumo et al., 1985). Además, el estemfol indujo apoptosis en células de leucemia humana (Ji et al., 2018). Un aislamiento de *Stemphylium* produjo estemfol A y B, los cuales exhibieron propiedades antibacterianas, pero no resultaron tóxicos para células cancerosas humanas (Zhou et al., 2015). Las estemfitoxinas I-IV, extraídas originalmente de *S. botryosum*, tienen un anillo de epóxido, lo que indica que son fitotóxicas (Arnone et al., 1986). *Alternaria alternata* también produce estemfitoxina III, que fue mutagénico en *Salmonella sp.* (Davis & Stack 1991). La producción de patulina en pera por *Stemphylium vesicarium* fue reportada por Laidou et al. (2001), debido a la elevada importancia toxicológica de este metabolito secundario, con efectos embriotóxicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos

(Schiefer, 1986), y posiblemente cancerígenos (Kießling, 1986; Schiefer, 1986), sería muy importante identificar si la población de aislamientos locales es capaz de producirlo.

Los estudios futuros deberían centrarse en la determinación de la producción de las toxinas SV y la de otros metabolitos secundarios, así como su interacción con las plantas hospedantes. De esta forma, se podría establecer el comportamiento y potencial fitotóxico del patógeno. Así mismo, podría determinarse el riesgo que los metabolitos representarían para la salud humana.

## Conclusiones parciales

Esta sección describe el efecto de los aislamientos de *Stemphylium vesicarium* obtenidos desde hojas y frutos afectados por la enfermedad, en términos de agresividad y toxicidad sobre las hojas de variedades hospederas.

Los aislamientos y los extractos crudos utilizados ocasionaron mayores efectos sobre las variedades D'Anjou y Abate Fetel que sobre Packham's y Williams, señalando que las dos primeras son mucho más sensibles.

Se determinó que los aislamientos locales podrían producir las toxinas hospedador específico, causantes de la necrosis venosa que da a la enfermedad el síntoma característico.

Los bioensayos de toxicidad indicaron la posible producción de compuestos tóxicos.

## Bibliografía

- Al-Doory, Y. & Ramsey, S. (1987). *Moulds and health who is at risk?* Charles C. Thomas, Springfield, Ill., USA.
- Andersen, B., Nielsen, K.F., Fernández Pinto, V. & Patriarca, A. (2015). Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. *Int J Food Microbiol* 196:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.029>.
- Arnone, A., Nasini, G., Merlini, L. & Assante, G. (1986). Secondary mould metabolites. Part 16. Stemphytoxins, new reduced perylenequinone metabolites from *Stemphylium botryosum* var. *Lactucum*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. 1: 525–530. <https://doi.org/10.1039/p19860000525>.
- Assante, G. & Nasini, G. (1987). Identity of the phytotoxin stemphylin from *Stemphylium botryosum* with altersolanol A. *Phytochemistry*, 26(3): 703–705. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84768-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84768-8).
- Bahima, J. V. (2020). Hongos causantes de la mancha gris de la hoja en *Lycopersicon esculentum* Mill., su variabilidad y el rol de la resistencia sistémica adquirida (RSA) en la reducción de su incidencia. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- Barash, I. (1982). A Novel Enolic B-Ketoaldehyde Phytotoxin Produced by *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici*. 69 23–27.
- Barash, I., Karr, A.L. & Strobel, G.A. (1975). Isolation and Characterization of Stemphylin, a chromone glucoside from *Stemphylium botryosum*. *Plant Physiology* 55 646–651.
- Davis, V. M., & Stack, M. E. (1991). Mutagenicity of stemphytoxin III, a metabolite of *Alternaria alternata*. *Applied and environmental microbiology*, 57(1), 180–182. <https://doi.org/10.1128/aem.57.1.180-182.1991>
- Debbab, A., Aly, A.H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Pretsch, A., Pescitelli, G., Kurtan, T. & Proksch, P. (2012). New anthracene derivatives – structure elucidation and antimicrobial activity. *European Journal of Organic Chemistry* 7 1351–1359.
- Foster, J. M., Tayviah, C. S., Stricker, S. M., Gossen, B. D., & McDonald, M. R. (2019). Susceptibility to *Stemphylium vesicarium* of asparagus, onion, pear, and rye in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 41(2), 228–241.
- González, A. M., Presa, M. F., & Lurá, M. C. (2005). Ensayo de Toxicidad a *Artemia salina*: Puesta a Punto y Aplicación de Micotoxinas. In *Fabrib* (Vol. 7, pp. 117–122). <https://doi.org/10.14409/fabrib.v7i1.726>.

- González, A. M., Presa, M., Latorre, M. G., & Lurá, M. C. (2007). Detección de metabolitos fúngicos con actividad toxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana De Micología*, 24(1), 59–61. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70015-3](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70015-3).
- Harwig, J., & Scott, P. M. (1971). Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Applied Microbiology*, 21(6), 1011–1016. <https://doi.org/10.1128/aem.21.6.1011-1016.1971>
- Ji, S., Lee, J. Y., Schrör, J., Mazumder, A., Jang, D. M., Chateauvieux, S., Schneckeburger, M., Hong, C. R., Christov, C., Kang, H. J., Lee, Y., Han, B. W., Kim, K. W., Shin, H. Y., Dicato, M., Cerella, C., König, G. M., Orlikova, B., & Diederich, M. (2018). The dialkyl resorcinol stemphol disrupts calcium homeostasis to trigger programmed immunogenic necrosis in cancer. *Cancer letters*, 416, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.011>
- Kendrick, B. (1992). *The Fifth Kingdom*. Focus Texts, Newburyport, USA.
- Kiiessling, K.H. (1986): Biochemical mechanism of action of mycotoxins.
- Köhl, J., Groenenboom-de Haas, B. H., Kastelein, P., Rossi, V., & Waalwijk, C. (2009). Quantitative detection of pear- pathogenic *Stemphylium vesicarium* in orchards. *Phytopathology*, 99(12), 1377–1386.
- Laidou, I.A., Thanassoulopoulos, C.C.& Liakopoulou-Kyriakides, M. (2001). Diffusion of patulin in the flesh of pears inoculated with four post-harvest pathogens. *Journal of Phytopathology*. 149: 457–461. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00663.x>.
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2006). Brown spot of pear: An emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease*, 90(11), 1368–1375. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1368>
- Llorente, I., Moragrega, C., Ruz, L., & Montesinos, E. (2012). An update on control of brown spot of pear. *Trees - Structure and Function*, 26(1), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0607-1>.
- Lloret, A., Hartmann, K., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Addie, D., Belák, S., et al. (2013). Rare opportunistic mycoses in cats: Phaeohyphomycosis and hyalohyphomycosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 15, 628–630. <https://doi.org/10.1177/1098612X13489227>.
- Logrieco, A., Moretti, A., Fornelli, F., Fogliano, V., Ritieni, A., Caiaffa, M. F., Randazzo, G., Bottalico, A., & Macchia, L. (1996). Fusaproliferin production by *Fusarium subglutinans* and its toxicity to *Artemia salina*, SF-9 insect cells, and IARC/LCL 171 human B lymphocytes. *Applied and environmental microbiology*, 62(9), 3378–3384. <https://doi.org/10.1128/aem.62.9.3378-3384.1996>.

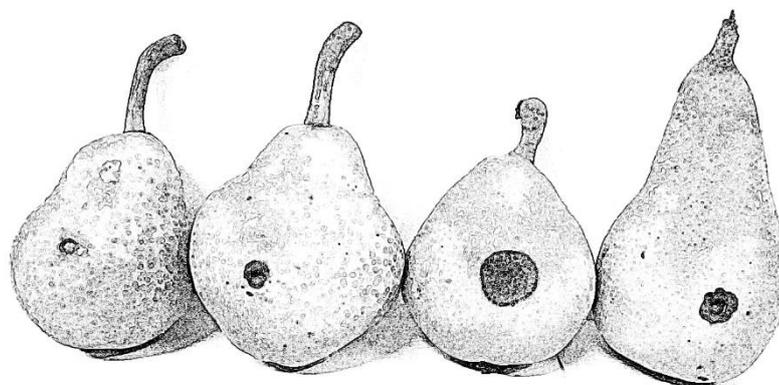
- Ludemann, V., Pose, G., Moavro, A., Maliaviabarrena, M.G., Fandiño, R., Ripoll, G., Basílico, J.C. & Pardo, A.G. (2009). Toxicological assessment of *Penicillium nalgiovense* strains for use as starter cultures in the manufacture of dry fermented sausages. *Journal of food protection*, 72(8), 1666–1670. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.8.1666>.
- Marumo, S., Hattori, H. & Katayama, M. (1985). Stemphol from *Pleospora herbarum* as a self-inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry* 49(5): 1521–1522. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866933>.
- Michael, A.S., Thompson, C.G. & Abramovitz, M. (1956). *Artemia salina* as test organisms for a bioassay. *Science* 1956; 123:464.
- Medina, R., Franco, M.E.E., da Cruz Cabral, L. *et al.* (2021). The secondary metabolites profile of *Stemphylium lycopersici*, the causal agent of tomato grey leaf spot, is complex and includes host and non-host specific toxins. *Australasian Plant Pathology*. **50**, 105–115. <https://doi.org/10.1007/s13313-020-00753-1>
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. & Mc Laughlin, J.L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(5): 31-34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>.
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., & Vilardell, P. (1995). Susceptibility of selected European pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age. *Plant Disease*, 79(5): 471–473. <https://doi.org/10.1094/PD-79-0471>.
- Moragrega, C., Puig, M., Ruz, L., Montesinos, E., & Llorente, I. (2018). Epidemiological features and trends of brown spot of pear disease based on the diversity of pathogen populations and climate change effects. *Phytopathology*, 108(2): 223–233. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0079-R>.
- Moss, M.O. (1996). Mycotoxins. Centenary Review. *Mycological Research* 100 513–523.
- Organización mundial de la salud (2018). Micotoxinas. Nota descriptiva. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>.
- Pariaud, B., Ravignné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., & Lannou, C. (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x>
- Patteri, E., Rossi, V., Bugiani, R., & Giosue, S. (2006). Virulence of *Stemphylium vesicarium* isolates from pear and other host species. *IOBC WPRS Bull.* 29: 195-205.
- Rossi, V., Patteri, E., Giosué, S., & Bugiani, R. (2005). Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns.

- European Journal of Plant Pathology, 111(4): 361–370. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-5273-3>.
- Schiefer, H. B. (1986). Pathology mycotoxicoses: possibilities and limits of a diagnosis. Pure and Applied Chemistry. 58, 351-356.
  - Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature methods, 9(7): 671-675.
  - Singh, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H., & Kohmoto, K. (1999). Purification and biological characterization of host-specific SV-toxins from *Stemphylium vesicarium* causing brown spot of European pear. Phytopathology, 89(10): 947–953. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.10.947>.
  - Singh, P., Park, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H. & Kohmoto K. (2000). Effects of host-selective SV-toxin from *Stemphylium vesicarium*, the cause of brown spot of European pear plants, on ultrastructure of leaf cells. Journal of Phytopathology 148:87–93. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00474.x>.
  - Stricker, S.M., Gossen, B.D., & McDonald, M.R. (2021) Risk assessment of secondary metabolites produced by fungi in the genus *Stemphylium*. Canadian Journal of Microbiology. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0351>.
  - Tanahashi M, Okuda S, Miyazaki E, Parada RY, Ishihara A, Otani H, Osaki-Oka K, (2017). Production of host-selective SV toxins by *Stemphylium sp.* causing brown spot of European pear in Japan. Journal of Phytopathology 165(3):189–194. <https://doi.org/10.1111/jph.12549>.
  - Van der Plank, J.E. (1968). Disease resistance in plants. Academic Press, New York, USA.
  - Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C. & Sorgeloos, P. (1981). Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 5: 382-387. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(81\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0147-6513(81)90012-9).
  - Vera Bahima, J. (2020). Hongos causantes de la mancha gris de la hoja en *Lycopersicon esculentum* Mill., su variabilidad y el rol de la resistencia sistémica adquirida (RSA) en la reducción de su incidencia. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Museo.
  - Visconti, A., Sibilia, A., & Sabia, C. (1992). *Alternaria alternata* from oilseed rape: mycotoxin production, and toxicity to *Artemia salina* larvae and rape seedlings. *Mycotoxin research*, 8(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/BF03192209>
  - Walton, J.D. (1996) Host-selective toxins: agents of compatibility. The Plant Cell, Volume 8, Issue 10, Pages 1723–1733, <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1723>.

- Wijnands, L.M. & van Leusden, F.M. (2000). An overview of adverse health effects caused by micotoxins and bioassays for their detection. Bilthoven, National Institute of Public Health and the Environment.
- Xiao, J., Zhang, Q., Gao, Y. Q., Tang, J. J., Zhang, A. L., & Gao, J. M. (2014). Secondary metabolites from the endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(16), 3584–3590. <https://doi.org/10.1021/jf500054f>.
- Zhou, X. M., Zheng, C. J., Chen, G. Y., Song, X. P., Han, C. R., Tang, X. Z., Liu, R. J., & Ren, L. L. (2015). Two new stemphol sulfates from the mangrove endophytic fungus *Stemphylium* sp. 33231. *The Journal of antibiotics*, 68(8), 501–503. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.1>.



Capítulo 6 : Susceptibilidad de las principales variedades de pera cultivadas en el Alto Valle a la infección por *Stemphylium vesicarium*





## Introducción

La mancha marrón del peral, causada por *Stemphylium vesicarium*, ha sido reportada en varias zonas productivas de Europa y Japón (Llorente & Montesinos, 2006; Tanahashi et al., 2008; Llorente et al., 2012). A los pocos años de su primera detección se expandió progresivamente en varias regiones mediterráneas de Europa, provocando pérdidas en zonas productivas de Italia, Países Bajos y Bélgica (Polfliet, 2002; Llorente & Montesinos 2006; Köhl et al., 2009), Francia y España (Llorente et al., 2012).

La susceptibilidad a la mancha marrón ha sido estudiada en dieciséis cultivares de pera (*Pyrus communis*) en Europa (Montesinos et al., 1995). Los cultivares caracterizados fueron Passe Crassane, Alexandrine, Conference, Doyenne Du Comice, Duc de Bordeaux, Abate Fetel, Kaiser, Rocha, Winter Nellis, General Leclerc, Williams, Blanquilla, Beurré Hardy, Luis Bonne, Grand Champion, y Highland.

Además, según los estudios realizados en Italia y España, la susceptibilidad de los tejidos vegetales a la infección por *S. vesicarium* disminuye con el aumento de la edad fisiológica de los mismos. En las variedades sensibles, los frutos son susceptibles en todos los estadios de crecimiento, aunque se observó un desarrollo importante en las primeras etapas y en la fruta cercana a la cosecha (Collina, 2019; Montesinos et al., 1995).

En Argentina, el Alto Valle de Río Negro y Neuquén conforma la principal zona de producción de frutas pomáceas, representando el 90% de toda la producción nacional (Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas, 2016). La superficie implantada con peras es de 18.367 hectáreas. Los principales cultivares son: Williams, Packham's, D'Anjou, y Abate Fetel. La superficie implantada con el cultivar Williams es de 7.358 hectáreas y representa el 40,1 % de la producción de peras de la zona. La superficie correspondiente a Packham's es de 5.352 hectáreas representa el 29,1 % de la producción, la de D'Anjou es de 2.713 hectáreas y representa el 14,8 % de la producción, y la superficie de Abate Fetel comprende 906 hectáreas y representa el 4,9 % de la producción.

La enfermedad se detectó por primera vez en Argentina el año 2013, en la zona Valle Medio de Río Negro (Dobra & García, 2015). En el 2016 fue detectada en la zona del Alto Valle de Río Negro, momento a partir del cual ha sido recurrente y ha causado diferentes niveles de daño en las peras (Tudela et al., 2018; Temperini et al., 2022; Tudela & Di Masi, 2022). En el Alto Valle se ha diagnosticado en los cultivares D'Anjou, Abate Fetel y, en algunas ocasiones, en Williams y Packham's. En el caso de D'Anjou y Abate Fetel, los síntomas fueron detectados sobre hojas y frutos,

mientras que en Williams y Packham's, solo se observaron frutos afectados por la enfermedad, y con una frecuencia mucho menor.

Sin embargo, existe poca información sobre la susceptibilidad a *S. vesicarium* en los cultivos de pera del hemisferio sur. El conocimiento sobre la susceptibilidad o tolerancia de los cultivares a la enfermedad, puede brindar herramientas para una acertada elección varietal y definición de estrategias adecuadas de control.

## Objetivos generales

El objetivo de este capítulo fue determinar la susceptibilidad de los principales cultivares de pera de Argentina a la infección por *Stemphylium vesicarium*.

## Objetivos específicos

1. Determinar las diferencias de susceptibilidad de los frutos entre las principales variedades de pera de la zona del Alto Valle.
2. Establecer los momentos de mayor sensibilidad de los frutos a la enfermedad.
3. Determinar la susceptibilidad de las hojas y la influencia de la edad de estas en la susceptibilidad.

## Materiales y métodos

### Susceptibilidad natural de hojas y frutos

Durante 4 temporadas (2018-19; 2019-20; 2020-21; 2021-22) se realizó el seguimiento de los síntomas de mancha marrón en tres establecimientos productivos de perales con historial de presencia de la enfermedad, definidas como estaciones de monitoreo. En la última temporada, se añadió una cuarta estación de monitoreo. Las estaciones son las mencionadas en el Capítulo 4, ubicadas en las localidades de General Roca e Ingeniero Huergo, y se puede apreciar presentada su localización en la Figura 4.1.

En cada temporada, una vez detectada la aparición de los síntomas, se determinó la incidencia de la enfermedad en hojas y frutos en las variedades Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel. En cada estación se tomaron al azar cinco repeticiones de 100 hojas y 100 frutos de cada variedad de pera y se determinó el porcentaje de órganos afectados. En el caso de las lesiones en frutos, se clasificó su severidad según la siguiente escala propia: leves (lesiones <10 mm de diámetro), medio (lesiones de 10 a 15 mm de diámetro) y grave (lesiones >15 mm de diámetro).

Se analizó la proporción de hojas y frutos afectados en cada temporada según la variedad. Se realizó el análisis de la varianza y se empleó el test de Tukey para la comparación de medias ( $\alpha=0,05$ ).

### Susceptibilidad *in vitro* de los frutos

#### Material vegetal

Se emplearon frutos de los cultivares Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel. Se obtuvieron desde 6 árboles frutales en buen estado nutricional y sanitario, ubicados en la estación Experimental Agropecuaria Alto Valle de INTA (Río Negro, Argentina). En base a las fechas registradas de plena floración, se calcularon las edades de los frutos como días después de plena floración (DDPF). Para cada variedad se eligieron tres edades de fruto para realizar los estudios, la edad 1 corresponde a un fruto joven (55-60 DDPF), la edad 2 corresponde a un fruto de desarrollo medio (85-90 DDPF) y la edad 3 corresponde a un fruto que ha alcanzado su madurez comercial. Se utilizaron 6 repeticiones de 5 frutos por variedad en cada una de las edades mencionadas y el ensayo se realizó 2 veces.

#### Producción de Inóculo

Para el ensayo se seleccionó un aislamiento altamente patogénico, identificado como SF23. Se cultivó en medio AA (Anexo I) en placas de Petri de 9 cm de diámetro y se incubó por 20 días a 20°C con un fotoperíodo de 12 horas. Transcurrido el periodo de incubación, las placas se transportaron a la cámara de flujo laminar, las superficies de las placas se frotaron suavemente con un asa luego de añadir 9 mL de ADE y una gota de Tween 20. La suspensión fue filtrada a través de una gasa y se ajustó su concentración a  $5 \times 10^4$  conidios mL<sup>-1</sup>.

## Inoculaciones

Los frutos se desinfectaron por inmersión durante un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % y se enjuagaron tres veces con ADE. Se utilizaron dos técnicas de inoculación en dos ensayos diferentes, una de ellas sobre frutos sanos, con el objetivo de determinar la incidencia (porcentaje de frutos afectados) y el daño según el número de lesiones, y la otra sobre heridas, para determinar la severidad según el diámetro de la lesión producida.

La primera técnica consistió en sumergir los frutos en la suspensión conidial durante un minuto (Montesinos et al., 1995). Los frutos empleados como control fueron sumergidos en una solución de ADE y Tween 20. La segunda se basó en efectuar una pequeña herida en la zona ecuatorial de los frutos, utilizando un punzón de 2 mm de ancho y 2 mm de profundidad (Figura 6.1). En la herida se depositaron de 20  $\mu$ l de la misma suspensión. En las heridas de los frutos control se colocaron 20  $\mu$ l de ADE.

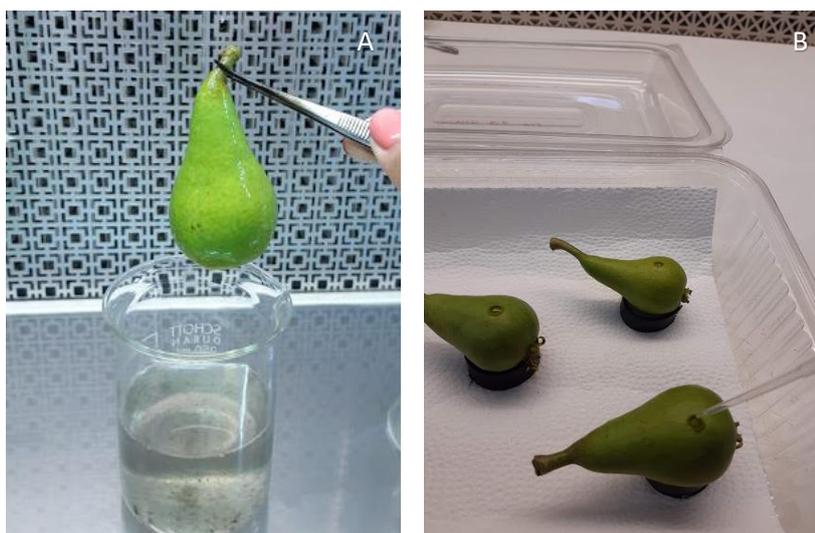


Figura 6.1: Inoculación de peras Abate Fetel con suspensión conidial de *S. vesicarium*. Inmersión de fruto en la suspensión (A). inoculación en herida con gota de suspensión (B).

## Condiciones de incubación

Para ambos ensayos, luego de la inoculación, los frutos se dispusieron dentro de cámaras húmedas (con cinco frutos cada una), que consistieron en bandejas plásticas cerradas con soportes

individuales para cada fruto. Para mantener una humedad elevada, se cubrió el fondo de cada bandeja con una toalla de papel y se le agregó ADE hasta saturación. La incubación se realizó por 7 días a temperatura ambiente (20-25 °C).

### Determinaciones de incidencia y severidad

Para el primer ensayo, se determinó la cantidad de frutos afectados por repetición, se contabilizó el número de manchas por fruto con un contador automático (Figura 6.2) y se estimó el porcentaje de superficie afectada por manchas de acuerdo con la escala detallada en Figura 6.3. Dicha escala se confirmó mediante el software ImageJ® (Schneider et al., 2012). Para el segundo ensayo, se registró el diámetro de cada podredumbre, a partir de la medición y promedio de los diámetros transversales. Estas lesiones se clasificaron según su diámetro según la siguiente escala (propia): lesiones leves (menores a 10 mm de diámetro), medias (de 10 a 15 mm de diámetro), y graves (más de 15 mm de diámetro).



Figura 6.2: Conteo de número de manchas desarrolladas por *S. vesicarium* sobre peras.

# Escala de severidad

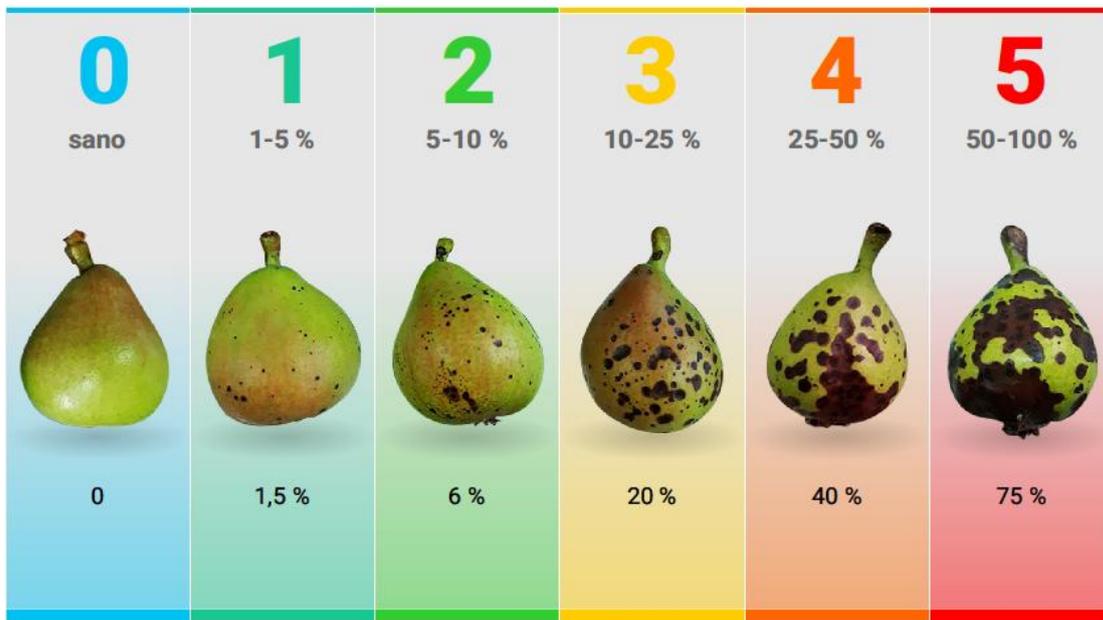


Figura 6.3: Escala de severidad en función del porcentaje de superficie del fruto afectada por manchas.

## Diseño del experimento y análisis estadístico

Se utilizaron 6 repeticiones de 5 frutos por variedad en cada una de las tres edades de fruto, y el ensayo se realizó 2 veces, en dos temporadas. Se empleó un diseño factorial, completamente aleatorizado, con 30 frutos por combinación de cultivar y edad.

Para analizar la incidencia (el porcentaje de frutos afectados por variedad y edad de fruto) se analizaron las proporciones relevantes con una prueba de proporcionalidad.

Para analizar el número de lesiones por fruto, variable respuesta de conteo que presentó sobre dispersión, en primer lugar, se seleccionó un modelo binomial negativo con función de enlace logarítmico, con los efectos fijos de variedad, edad del fruto, y repetición del ensayo. En segundo lugar, para analizar la severidad mediante el uso de la escala, se calcularon los puntos medios de cada grado y con ellos se ajustó un modelo lineal, debiendo transformar la variable respuesta a raíz cuadrada, a fin de cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad.

Para el diámetro de la lesión se utilizó el método de mínimos cuadrados ponderados para ajustar un modelo lineal con distribución normal.

A todos los modelos se les realizó el análisis de la varianza y el test de Tukey de diferencia de medias.

### Susceptibilidad *in vitro* de las hojas

#### Materia vegetal

Se utilizaron hojas de las variedades Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel. Las hojas se tomaron al azar, desde árboles en buenas condiciones nutricionales y sanitarias, ubicados en un cultivo perteneciente a la estación Experimental Agropecuaria Alto Valle de INTA. El ensayo se llevó a cabo dos veces. En el primer ensayo, solo se usaron hojas jóvenes. Se realizaron tres repeticiones de tres hojas por cultivar. En el segundo ensayo se utilizaron hojas jóvenes y viejas. Se realizaron tres repeticiones de tres hojas por cultivar y edad de hoja. Cada hoja representa la unidad experimental y observacional.

#### Producción de inóculo

La metodología fue la misma que la descrita en el apartado de susceptibilidad de frutos.

#### Inoculaciones

Las hojas se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante un minuto. Se enjuagaron tres veces con ADE y se secaron en cámara de flujo laminar. Posteriormente, se aplicó 0,5 mL de suspensión conidial por hoja, en su cara abaxial, con un atomizador (Figura 6.4). En el caso de los controles, la cara abaxial se roció con ADE.

#### Incubación

Las hojas se incubaron individualmente en cajas de Petri selladas con Parafilm™, a 25 °C durante 48 horas en oscuridad (Tanahashi et al., 2017). Las condiciones de humedad se mantuvieron utilizando trozos de algodón estériles saturados con ADE.



Figura 6.4: Inoculación de hojas por aplicación de suspensión conidial de *S. vesicarium* con atomizador.

#### Determinación de la afectación

Se realizó el conteo del número de manchas por hoja. Las hojas se fotografiaron con una cámara de 16 Mpx y las imágenes se procesaron con el software ImageJ® (Schneider et al., 2012) para obtener la superficie de cada hoja (cm<sup>2</sup>).

#### Diseño y análisis estadístico

Para el ensayo con hojas jóvenes de los distintos cultivares, se empleó un modelo factorial. Para su análisis se seleccionó un modelo lineal generalizado con distribución *Poisson*, para la variable manchas en función del cultivar.

Para el segundo ensayo, con hojas de los distintos cultivares y edades, se empleó un modelo bifactorial. Se seleccionó un modelo lineal generalizado con distribución *Poisson* para las manchas variables por hoja en función del cultivar y la edad de la hoja.

A ambos modelos se les realizó en análisis de la varianza y el test de Tukey de diferencia de medias ( $\alpha=0,05$ ).

## Resultados

### Susceptibilidad natural de hojas y frutos

La incidencia en hojas y frutos mostró diferencias marcadas entre las variedades en las distintas temporadas. Los modelos presentaron un ajuste adecuado y las variables temporada y variedad presentaron interacción significativa.

La primera temporada (2018/2019) presentó lluvias muy abundantes a mediados de primavera y los síntomas se registraron en noviembre, cuando los frutos rondaron los 50 DDPF. Packham's y Williams presentaron una incidencia del 0%, mientras que en Abate Fetel fue del  $15,2 \pm 5,59\%$  y en D'Anjou del  $25 \pm 5,92\%$  (Tabla 6.1). Las lesiones en estos dos cultivares fueron severas (más de 15 mm de diámetro). En las dos temporadas siguientes, que se caracterizaron por no presentar periodos prolongados de lluvia, la incidencia de frutos para todas las variedades fue muy baja (entre 0 y 1%) y no hubo diferencias significativas entre ellas. La cuarta temporada presentó periodos prolongados de lluvia durante el verano, cerca de la época de cosecha. La incidencia registrada en D'Anjou fue la más alta,  $34,6 \pm 3,85 \%$ , en Packham's fue de  $26 \pm 19,17 \%$  y en Abate Fetel  $21 \pm 6,75 \%$ , mientras que en Williams fue 0%. En cuanto a la severidad de las lesiones, fue media para Packham's (10-15 mm de diámetro) y severa para D'Anjou y Abate Fetel (más de 15 mm de diámetro). La proporción de frutos afectados por temporada y variedad se muestran en la Figura 6.5.

En cuanto a la incidencia en hojas, en todas las temporadas ocurrió que el porcentaje de hojas afectadas de Williams y Packham's fue muy bajo (en Williams fue de 0 y de Packham's del 0,6 %). En la primera temporada (2018/2019), la incidencia de hojas fue de  $30,4 \pm 3,71$  en D'Anjou y de  $34,8 \pm 3,7$  en Abate Fetel (Tabla 6.1). En la segunda (2019/2020), fue de  $10,2 \pm 3,42$  en D'Anjou y de  $10 \pm 3,39$  en Abate Fetel. En la tercera temporada (2020/2021) la incidencia fue de  $10,4 \pm 2,51$  en D'Anjou y de  $9,20 \pm 4,82$  en Abate Fetel. En la última (2021/2022), la incidencia fue de  $33,2 \pm 17,51$  en D'Anjou y de  $19,6 \pm 9,66$  en Abate Fetel. En todas las temporadas, más del 80% de las hojas afectadas correspondieron a brotes jóvenes. La proporción de hojas afectadas por temporada y variedad se muestran en la Figura 6.6.

Tabla 6.1: Datos de incidencia de mancha marrón del peral para frutos y hojas de las variedades Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel durante cuatro temporadas. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

Temporada	Variedad	Incidencia en frutos (%) (media ± DE)	Grupo	Incidencia en hojas (%) (media ± DE)	Grupo
2018-2019	Williams	0,00 ± 0,00	a	0,00 ± 0,00	a
	Packham's	0,00 ± 0,00	a	0,60 ± 0,89	a
	D'Anjou	25,00 ± 5,92	bc	30,4 ± 3,71	cd
	Abate Fetel	15,20 ± 5,59	b	34,80 ± 3,70	d
2019-2020	Williams	0,00 ± 0,00	a	0,00 ± 0,00	a
	Packham's	0,00 ± 0,00	a	0,00 ± 0,00	a
	D'Anjou	0,20 ± 0,45	a	10,20 ± 3,42	b
	Abate Fetel	0,40 ± 0,89	a	10,00 ± 3,39	b
2020-2021	Williams	0,00 ± 0,00	a	0,00 ± 0,00	a
	Packham's	0,00 ± 0,00	a	0,00 ± 0,00	a
	D'Anjou	1,40 ± 1,14	a	10,40 ± 2,51	b
	Abate Fetel	1,80 ± 1,10	a	9,20 ± 4,82	b
2021-2022	Williams	0,00 ± 0,00	a	0,00 ± 0,00	a
	Packham's	26,00 ± 19,17	bc	0,60 ± 0,55	a
	D'Anjou	34,60 ± 3,85	c	33,20 ± 17,51	cd
	Abate Fetel	21,00 ± 6,75	bc	19,60 ± 9,66	bc

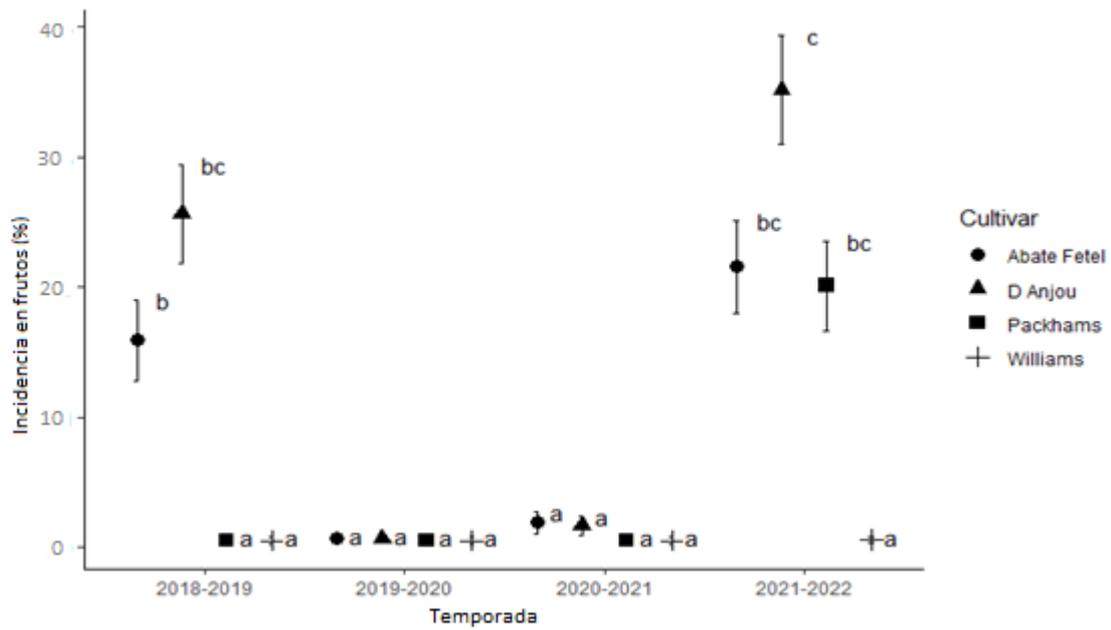


Figura 6.5: Porcentaje de frutos afectados por mancha marrón del peral según cultivar y temporada. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

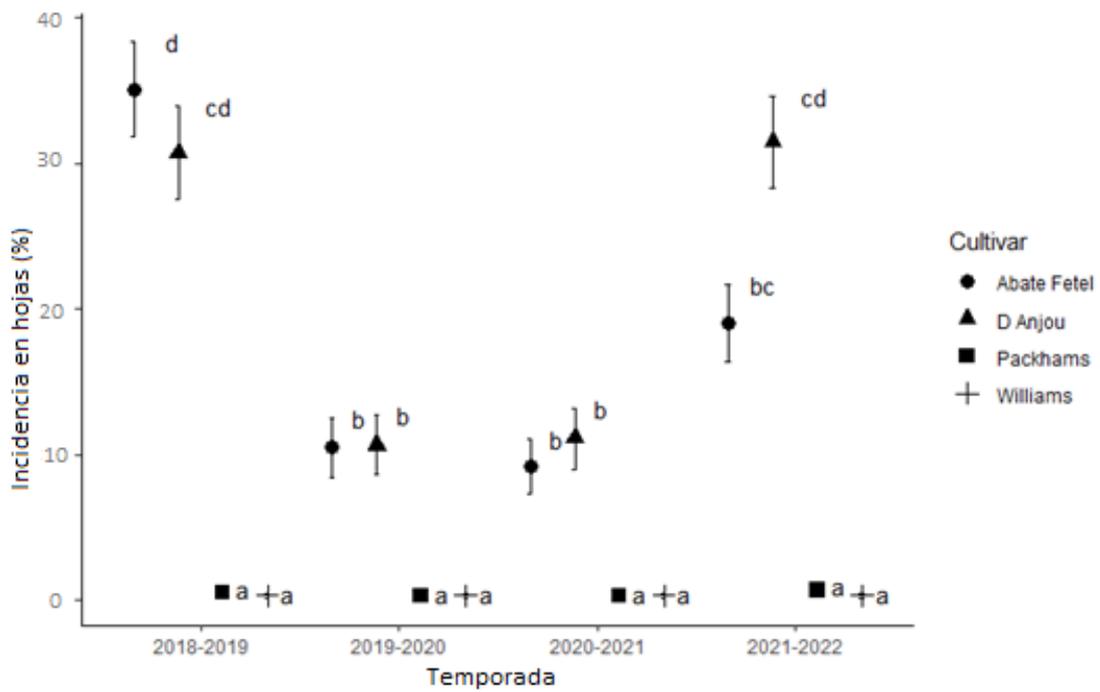


Figura 6.6: Porcentaje de hojas afectadas por mancha marrón del peral según cultivar y temporada. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

### Susceptibilidad de los frutos *in vitro*

Los frutos control (inoculados con agua) no resultaron afectados en ninguna de las pruebas. En ambas repeticiones, la inoculación por inmersión afectó a todos los frutos de los cultivares Abate Fetel, D'Anjou y Packham's, en todas las edades evaluadas (100 % de incidencia), mientras que en Williams resultaron afectados el 36,6% de los frutos jóvenes y el 25 % de los de desarrollo medio y el 28 % de los de madurez comercial. De acuerdo con la proporción de frutos afectados, Williams se diferenció del resto de los cultivares, pero no hubo diferencias significativas entre las edades de dicho cultivar ( $p$  valor = 0,6).

En cuanto a la severidad como manchas por fruto, el valor medio para Williams fue de 1,4; para Packham's 42,4; para D'Anjou 116; y para Abate Fetel 129. Sobre Williams se observó un alto porcentaje de frutos sin manchas en todas las etapas de desarrollo analizadas. En Packham's, todos los frutos inoculados desarrollaron manchas, y en el caso de Abate Fetel se observó un elevado número de manchas en todos los estadios, al igual que en D'Anjou (Figura 6.7).

El análisis estadístico resultante del uso de la variable respuesta manchas por fruto, indicó que el efecto de la repetición fue significativo, así como el efecto de la variedad, la edad del fruto y la interacción de ambas ( $p < 0.0001$ ). La edad con mayor cantidad manchas para la mayoría de las variedades fue la 2, fruto de desarrollo medio, seguida por la 1 (fruto joven) y 3 (madurez comercial). En la prueba de medias se observó la agrupación de diferentes combinaciones de cultivares y edades

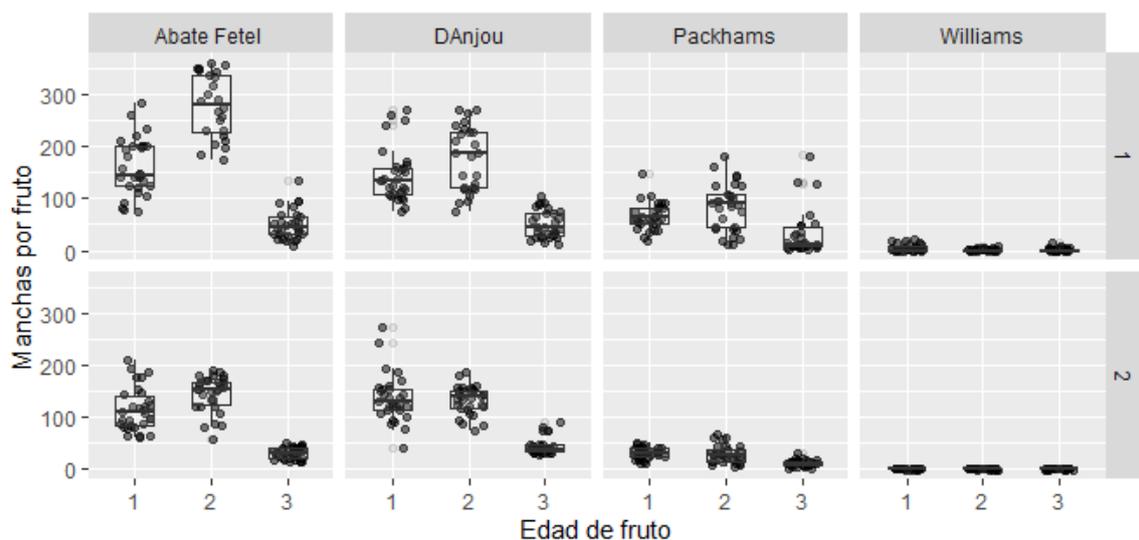


Figura 6.7: Diagrama de cajas para las manchas por fruto desarrolladas en las cuatro variedades de pera en los tres estadios de desarrollo del fruto (1 = fruto joven; 2 = fruto de desarrollo medio; y 3 = fruto en madurez de cosecha) en ambas repeticiones del ensayo.

de frutos, según el número medio de manchas. En ambas repeticiones, Williams registró los valores más bajos de manchas por fruto, estableciendo una diferencia significativa con el resto. La severidad más alta fue la desarrollada en los frutos de desarrollo medio de Abate Fetel, seguida de los frutos de desarrollo medio de D'Anjou y los frutos jóvenes de ambas variedades (Tabla 6.2). En la Figura 6.8 se muestra el desarrollo de manchas en las tres edades de fruto en la variedad Abate Fetel, mientras que en Figura 6.9 puede observarse el desarrollo de las manchas en los frutos jóvenes de las cuatro variedades.



Figura 6.8 Manchas desarrolladas en Abate Fetel en las tres edades de fruto, a los 7 días de incubación luego de la inoculación por inmersión en suspensión conidial de la cepa SF23 de *S. vesicarium*.

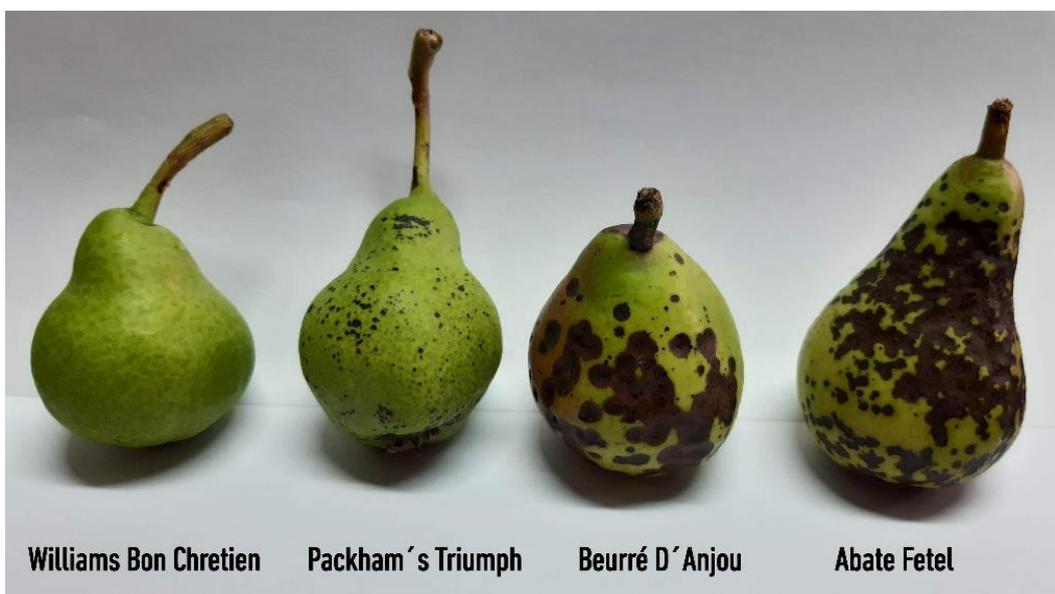


Figura 6.9: Manchas desarrolladas en los cuatro cultivares de pera a los 7 días de incubación luego de la inoculación por inmersión en suspensión conidial de la cepa SF23 de *S. vesicarium*.

Tabla 6.2: Incidencia de la enfermedad (porcentaje de frutos afectados) y severidad (número de manchas por fruto en las cuatro variedades de pera en tres etapas de desarrollo: 1 = fruto joven; 2 = fruto de desarrollo medio; y 3 = fruto maduro. Medias seguidas de la misma letra dentro de la misma repetición no son significativamente diferentes entre sí en la prueba de Tukey.

Repetición	Variedad	Edad del fruto	Porcentaje de frutos afectados (%)	Manchas por fruto (media $\pm$ DE)	Grupo
<b>1</b>	Williams	2	36,66	1,72 $\pm$ 0,44	<b>a</b>
	Williams	3	36,66	1,99 $\pm$ 0,62	<b>a</b>
	Williams	1	46,62	2,93 $\pm$ 0,62	<b>a</b>
	Packham's	3	100	23,72 $\pm$ 2,33	<b>b</b>
	Abate Fetel	3	100	50,79 $\pm$ 3,67	<b>c</b>
	D'Anjou	3	100	58,65 $\pm$ 3,97	<b>c</b>
	Packham's	2	100	61,37 $\pm$ 4,17	<b>c</b>
	Packham's	1	100	61,56 $\pm$ 4,13	<b>c</b>
	Abate Fetel	1	100	163,57 $\pm$ 7,12	<b>d</b>
	D'Anjou	1	100	165,97 $\pm$ 7,09	<b>d</b>
	D'Anjou	2	100	190,35 $\pm$ 7,75	<b>d</b>
Abate Fetel	2	100	250,25 $\pm$ 9,29	<b>e</b>	
<b>2</b>	Williams	2	13,30	1,17 $\pm$ 0,34	<b>a</b>
	Williams	3	20	1,35 $\pm$ 0,33	<b>a</b>
	Williams	1	26,60	1,99 $\pm$ 0,42	<b>a</b>
	Packham's	3	93,30	16,09 $\pm$ 1,59	<b>b</b>
	Abate Fetel	3	100	34,46 $\pm$ 2,54	<b>c</b>
	D'Anjou	3	100	39,89 $\pm$ 2,80	<b>c</b>
	Packham's	2	100	41,65 $\pm$ 2,83	<b>c</b>
	Packham's	1	100	41,78 $\pm$ 2,83	<b>c</b>
	Abate Fetel	1	100	111,0 $\pm$ 5,14	<b>d</b>
	D'Anjou	1	100	112,62 $\pm$ 5,28	<b>d</b>
	D'Anjou	2	100	129,17 $\pm$ 5,66	<b>d</b>
Abate Fetel	2	100	169,82 $\pm$ 6,52	<b>e</b>	

La prueba de ANOVA resultante del análisis estadístico mediante el uso de los puntos medios de escala de severidad indicó que no hubo un efecto significativo de la repetición del ensayo ( $p = 0,18$ ), por lo que los datos de ambas repeticiones se analizaron juntos, mientras que las variables edad de fruto, variedad y su interacción si presentaron significancia ( $p < 0,05$ ).

El test de medias indicó que los frutos jóvenes (edad 1) de las variedades Abate Fetel, D'Anjou fueron los más afectados por la enfermedad, seguido por los frutos de desarrollo medio (edad 2) y por último los frutos maduros (edad 3). En el caso de Packham's, los frutos jóvenes fueron los más afectados (grupo b) pero no se diferenciaron estadísticamente de los frutos maduros (ab). En el caso de Williams, no se detectaron diferencias significativas entre las edades de fruto. Los resultados obtenidos se pueden visualizar en la Tabla 6.3, donde se puede apreciar el test de medias anidado por variedad.

Tabla 6.3: Severidad de la enfermedad (área media afectada de los frutos) en cuatro variedades de pera y tres momentos de desarrollo: 1 = fruto joven; 2 = fruto de desarrollo medio y 3 = fruto maduro. Medias seguidas de la misma letra dentro de cada variedad no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

<b>Variedad</b>	<b>Edad del fruto</b>	<b>Área afectada (media <math>\pm</math> DE)</b>	<b>Grupo</b>
Williams	2	0,39 $\pm$ 0,18	<b>a</b>
	3	0,67 $\pm$ 0,24	<b>a</b>
	1	1,14 $\pm$ 0,32	<b>a</b>
Packham's	2	3,36 $\pm$ 0,54	<b>a</b>
	3	3,84 $\pm$ 0,58	<b>ab</b>
	1	6,30 $\pm$ 0,74	<b>b</b>
D'Anjou	3	9,51 $\pm$ 0,92	<b>a</b>
	2	16,10 $\pm$ 1,19	<b>b</b>
	1	33,81 $\pm$ 1,73	<b>c</b>
Abate Fetel	3	9,06 $\pm$ 0,89	<b>a</b>
	2	20,15 $\pm$ 1,33	<b>b</b>
	1	34,83 $\pm$ 1,76	<b>c</b>

En la inoculación por heridas, Williams presentó un valor medio de diámetro de lesión de 6,6 mm, Packham's de 11,7 mm, Abate Fetel de 15,1 mm, y D'Anjou de 16,5 mm. En Williams, la mayoría de los frutos desarrollaron lesiones leves (menores a 10 mm de diámetro). En Packham's, la mayoría de los frutos desarrollaron lesiones medias (de 10 a 15 mm de diámetro). En D'Anjou y Abate Fetel, casi todas las lesiones fueron de grado medio (de 10 a 15 mm de diámetro) y grave (más de 15 mm de diámetro). La frecuencia de los tipos de lesiones por variedad y edad de fruto se puede apreciar en la Figura 6.10.

El análisis estadístico mostró que las variables cultivar y edad presentaron aportes significativos al modelo de distribución de la severidad en frutos, existiendo interacción entre ellas ( $p < 0,05$ ). El efecto de la repetición del ensayo no fue significativo ( $p > 0,05$ ), por lo que los resultados se analizaron juntos. En la prueba de medias se observó la agrupación de diferentes combinaciones de variedades y edades de frutos de acuerdo con el diámetro promedio de las lesiones que se desarrollaron sobre ellos. Williams presentó las menores medias de severidad, la lesión provocada por el hongo pudo expandirse muy pocos milímetros desde el punto de inoculación. Packham's presentó severidades medias mayores que Williams, pero menores que D'Anjou y Abate Fetel en todas las edades del fruto. Se observó que en Packham's, D'Anjou, y Abate Fetel la mayor severidad se presentó en la etapa de fruto joven, disminuyó en mediana edad y aumentó nuevamente al llegar a la madurez. En la Tabla 6.4 se pueden observar los resultados del análisis estadístico.

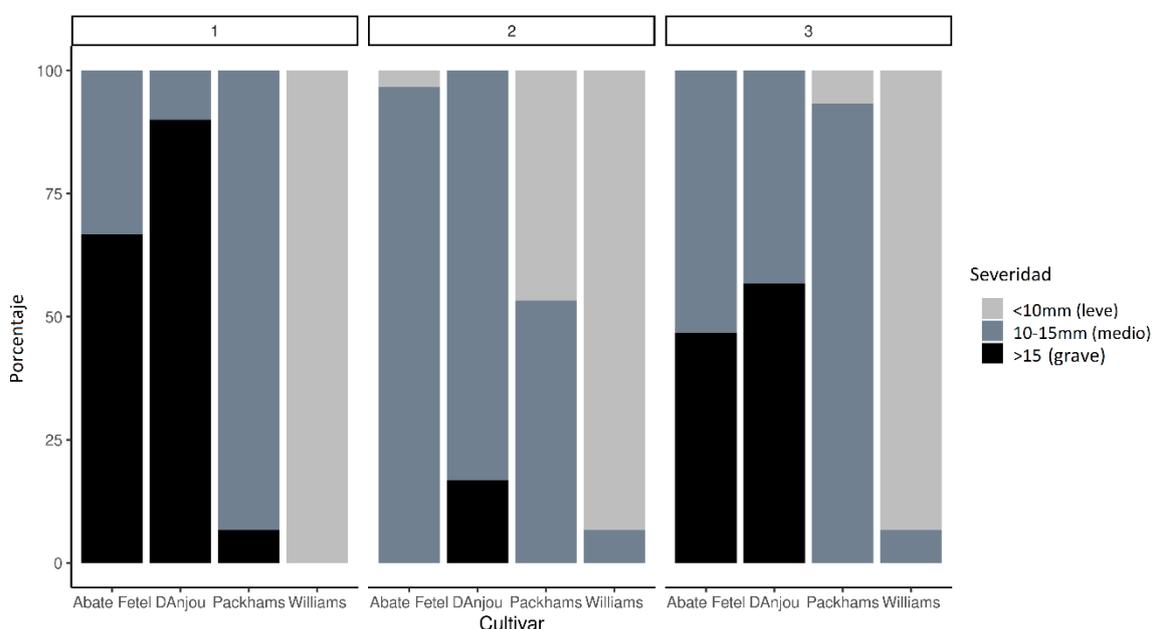


Figura 6.10: Severidad de la enfermedad (diámetro de la lesión) causada por la inoculación por herida con la cepa SF23 de *S. vesicarium* de frutos jóvenes (1), de medio desarrollo (2) y maduros (3) de las cuatro variedades.

Tabla 6.4: Severidad de la enfermedad (diámetro de lesión) generada por la inoculación por herida en cuatro variedades de pera y tres momentos de desarrollo: 1 = fruto joven; 2 = fruto de desarrollo medio y 3 = fruto maduro. Medias seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey, anidado por variedad.

Variedad	Edad del fruto	Diámetro de lesión en mm	
		(media ± DE)	Grupo
Williams	1	4,88 ± 0,10	a
	2	5,00 ± 0,11	a
	3	6,35 ± 0,14	b
Packham's	2	9,24 ± 0,20	a
	3	11,47 ± 0,25	b
	1	12,9 ± 0,28	c
D'Anjou	2	14,04 ± 0,31	a
	3	15,66 ± 0,34	b
	1	19,23 ± 0,42	c
Abate Fetel	2	10,80 ± 0,23	a
	3	14,63 ± 0,32	b
	1	16,49 ± 0,36	c

### Susceptibilidad de las hojas

En ninguno de los ensayos se desarrolló necrosis sobre las hojas testigo. En el primer ensayo, realizado en hojas jóvenes (Figura 6.11 A), los resultados obtenidos mostraron que existen diferencias entre los cultivares estudiados ( $p < 0.05$ ). La variable superficie foliar no presentó un aporte significativo, por lo que no fue incluida en el modelo. Los valores medios de manchas por hoja fueron 4,56 para Williams, 7,56 para Packham's, 33,22 para Abate Fetel y 41,89 para D'Anjou. En la prueba de medias se formaron tres grupos; el grupo "a" mostró la media más baja, incluyendo a Williams y Packham's; seguido del grupo "b", con Abate Fetel; y el grupo "c" fue el que mostró valores promedio más altos, incluyendo a D'Anjou (Figura 6.12 A).

En el segundo ensayo, realizado en hojas viejas y jóvenes (Figura 6.11 B), los resultados obtenidos mostraron que existen diferencias entre los cultivares y las edades foliares estudiadas, existiendo

interacción entre ellos ( $p < 0.05$ ). La variable superficie foliar no presentó un aporte significativo, por lo que no fue incluida en el modelo. Los valores medios de manchas por hoja joven fueron 1,22 para Williams, 0,56 para Packham's, 21,67 para Abate Fetel y 37,56 para D'Anjou. Los valores medios en hojas viejas fueron de 0,11 manchas por hoja en Williams, 0,22 en Packham's, 6 en Abate Fetel y 18,33 en D'Anjou.

En la prueba de medias se observó el agrupamiento de diferentes combinaciones de cultivares y edades de hojas de acuerdo con el número de lesiones desarrolladas. Se formaron cuatro grupos (Figura 6.12 B), el que presentó el menor valor medio de manchas por hoja incluyó hojas viejas y jóvenes de Williams y Packham's (grupo a). Este grupo presentó diferencias significativas con respecto al grupo d, que incluyó a las hojas jóvenes del cultivar D'Anjou y presentó la mayor media de manchas por hoja. Las hojas viejas de D'Anjou presentaron un comportamiento similar a las jóvenes de Abate Fetel, formando el mismo grupo. En los cultivares D'Anjou y Abate Fetel, las hojas jóvenes desarrollaron de 2 a 3,6 veces más manchas que las hojas viejas.



Figura 6.11: A) Efecto de la cepa SF23 de *S. vesicarium* en hojas jóvenes de los cultivares Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel. B) El efecto de la cepa SF23 de *S. vesicarium* en hojas jóvenes y viejas del cv. D'Anjou.

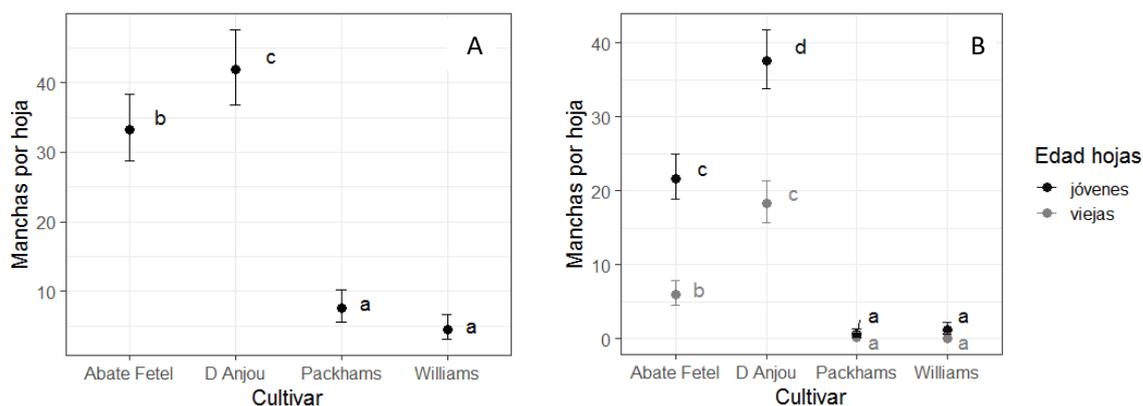


Figura 6.12: Patogenicidad de la cepa SF23 de *S. vesicarium* en hojas de los cuatro cultivares de pera. A. Patogenicidad en hojas jóvenes. B. Patogenicidad en hojas jóvenes y viejas.

## Discusión

El presente estudio fue motivado por la existencia de estudios previos que reportan diferencias entre los cultivares de pera europeos a la enfermedad (Blancard et al., 1989; Cavanni & Ponti 1994; Montesinos et al., 1995; Llorente & Montesinos 2006; Llorente et al., 2012). En las observaciones a campo, las variedades cultivadas en el Alto Valle de Río Negro presentaron diversos grados de daño por infección natural, por lo que se coincide con los reportes europeos. Williams no presentó síntomas; D'Anjou y Abate Fetel fueron las más afectadas, tanto a nivel de frutos como de hojas; y en el caso de Packham's, sus frutos se vieron afectados en una temporada, mientras que sus hojas no presentaron síntomas durante los cuatro años evaluados.

Los cuatro cultivares de pera incluidos en los estudios *in vitro*, mostraron diferentes susceptibilidades a la infección producida por *S. vesicarium*, y la edad de los frutos ejerció influencia sobre la susceptibilidad de los cultivares. Los resultados de la inoculación de hojas y frutos indicaron que las variedades Abate Fetel y D'Anjou resultaron ser los más afectados, mientras que Williams presentó valores de incidencia y severidad muy bajos. Esta variedad fue identificada en el estudio de Montesinos et al. (1995) como resistente o muy poco susceptible; mientras que la variedad Abate Fetel fue definida como altamente susceptible, por lo tanto, los resultados coinciden con la caracterización previamente efectuada.

Con respecto a la edad de los tejidos, los más jóvenes resultaron ser los más sensibles a la enfermedad, expresando un mayor porcentaje de área del fruto afectada por manchas, mayor diámetro de lesión, y mayor número de manchas por lámina foliar en el caso de las inoculaciones de

hojas. Esto coincide con el estudio realizado en España, donde reportaron que la susceptibilidad de los tejidos vegetales a la infección por *S. vesicarium* disminuye con el aumento de la edad fisiológica (Montesinos et al., 1995).

Montesinos et al. (1995) realizaron las inoculaciones en dos momentos de desarrollo del fruto, a los 2-3 meses antes de cosecha y 7 días antes de la cosecha, y utilizan la variable número de lesiones por fruto para caracterizar la susceptibilidad de 16 cultivares de pera. En la presente investigación se optó por incluir tres edades, la edad 1 corresponde a un fruto joven (55-60 DDPF), la edad 2 corresponde a un fruto de desarrollo medio (85-90 DDPF) y la edad 3 corresponde a un fruto que ha alcanzado su madurez comercial (unos 7 días antes de cosecha), y se analizó, además del número de manchas por fruto, el porcentaje de frutos afectados, el área de fruto afectada por manchas a través de una escala de severidad, y el diámetro de la lesión. Al analizar los datos obtenidos con la variable manchas por fruto, los valores medios indicaron que los frutos de desarrollo medio eran los más afectados, seguidos por los frutos jóvenes y en último lugar los de madurez comercial. Sin embargo, los frutos de desarrollo medio presentaron una densidad de manchas visualmente menor a la de los frutos más jóvenes. Se llegó a la conclusión de que la variable manchas por fruto no resultó ser la más indicada para realizar comparaciones entre distintas edades de fruto, ya que no contempla el tamaño de este. El uso de una escala de nivel de severidad que contempla la superficie del fruto afectada por lesiones representó de mejor manera la variabilidad observada entre los frutos, pudiendo concluir que, para cada variedad, los frutos más jóvenes fueron los más susceptibles a la enfermedad, y que, al aumentar la edad del fruto, disminuyó la probabilidad de infección. Por lo tanto, se coincide con lo encontrado por Montesinos et al. (1995). Sin embargo, se debe tener en cuenta que, en las variedades sensibles, como D'Anjou y Abate Fetel, los frutos son susceptibles en todos los estadios de crecimiento, y que, si bien la posibilidad de que se generen lesiones disminuye al aumentar la edad del fruto, cuando éste se encuentra próximo a la cosecha, las lesiones pueden presentar un aumento de tamaño, posiblemente debido a la pérdida de firmeza de los tejidos asociada a la madurez.

En un ensayo de susceptibilidad de hojas de 12 cultivares, Blancard et al. (1989), identificaron a Packham's y Abate Fetel como muy susceptibles. Dichos resultados no coinciden completamente con los de este trabajo, ya que Packham's se vio ligeramente afectado por la cepa utilizada, pero sí coinciden con la caracterización realizada para Abate Fetel. Los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* con hojas jóvenes indican que los cultivares más sensibles fueron D'Anjou y Abate Fetel, mientras que Packham's y Williams se vieron menos afectados. Los resultados de la infección natural también mostraron que las hojas de estas dos variedades presentaron incidencias menores. En el segundo ensayo, los resultados fueron similares a los presentados por Montesinos et al. (1995) en

hojas del cultivar Conferencia, siendo más afectadas las hojas jóvenes que las viejas, para todos los cultivares en estudio.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo determinar que la edad de hojas y frutos influyó en la susceptibilidad a la mancha marrón del peral, y que el efecto del cultivar es muy importante, ya que influyó en el desarrollo y avance de las lesiones. En estado de fruto joven, los frutos fueron más susceptibles a presentar infecciones que los maduros. Además, las lesiones tuvieron mayor desarrollo cuando la fruta era joven en la mayoría de los cultivares. Sin embargo, cuando el fruto alcanza la madurez comercial, también se pueden desarrollar lesiones importantes.

Conocer la susceptibilidad de los frutos de las distintas variedades a lo largo de su desarrollo resulta útil a la hora de considerar las medidas de control de la enfermedad. Los cultivares más sensibles a la enfermedad fueron D'Anjou, Abate Fetel y Packham's, siendo los dos primeros mucho más sensibles que el último. Por otro lado, los frutos de Williams fueron poco sensibles. A nivel foliar, las más sensibles fueron D'Anjou y Abate Fetel, siendo a su vez, las hojas jóvenes las más afectadas.

## Conclusiones parciales

El presente trabajo constituye una de las primeras investigaciones locales sobre la sensibilidad de hojas y frutos de las variedades de peral a la enfermedad mancha marrón.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que la edad de fruto tiene influencia sobre la susceptibilidad y que el efecto de la variedad es muy importante, ya que es determinante en el desarrollo de lesiones y el avance de estas. Los resultados indicaron que los frutos jóvenes son más propensos a sufrir infecciones que los maduros, desarrollando mayor número de lesiones y con mayor extensión. Sin embargo, si se producen las lesiones en precosecha, cuando el fruto está en madurez comercial, también se pueden desarrollar severidades importantes.

Los cultivares más sensibles a la enfermedad fueron D'Anjou y Abate Fetel. Les sigue Packham's en orden de importancia y finalmente Williams, con escasa sensibilidad. En los cultivares sensibles, la incidencia de la enfermedad fue mucho mayor en estadios de fruto joven y medio que en madurez comercial, mientras que la severidad fue mucho mayor en el estadio de fruto más joven. D'Anjou y Abate Fetel presentaron un comportamiento similar ante la incidencia y severidad del daño que produce el patógeno, siendo los más susceptibles. La variedad menos susceptible a la enfermedad

es Williams, la cual mostró los menores valores de incidencia y severidad en todos sus estadios de desarrollo de fruto.

El uso de la variable manchas por fruto no es el más indicado para visualizar diferencias entre frutos de distinto tamaño. Si se decidiera utilizar esta variable, debe tenerse el recaudo de elegir frutos de tamaño similar o medir la superficie del fruto.

La infección en hojas indicó que los cultivares más sensibles fueron D'Anjou y Abate Fetel, lo que concuerda con los estudios de campo, ya que en estos dos cultivares se han observado síntomas a nivel de hoja, mientras que en el resto de los cultivares no se registraron. Las hojas jóvenes resultaron ser mucho más sensibles que las viejas, coincidiendo también con las observaciones de campo, en las que las hojas de los brotes jóvenes y en activo crecimiento se observaron más afectadas.

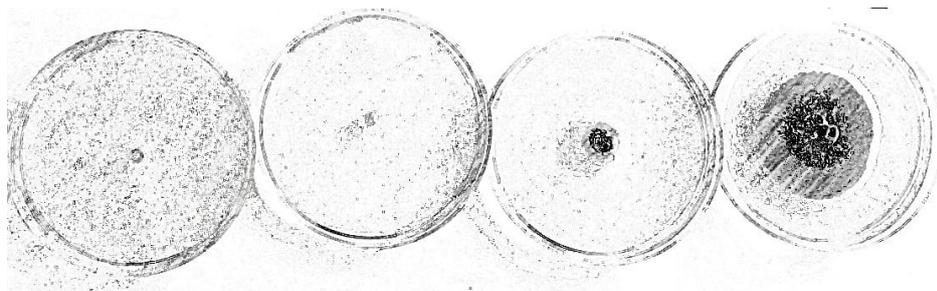
De acuerdo con los resultados obtenidos, D'Anjou y Abate Fetel son las que merecen los mayores esfuerzos de monitoreo y control, ya que tienen mayor probabilidad de verse afectadas por la mancha marrón del peral y de desarrollar lesiones importantes; la variedad Packham's debe monitorearse, pero presenta una susceptibilidad menor y por lo tanto menor probabilidad de sufrir la infección, y finalmente para Williams, cuyas probabilidades de infección son muy bajas.

## Bibliografía

- Blancard, D., Allard, E. & Brest, P. (1989). La Stemphyliose du poirier ou “macules brunes”. *Phytoma* 406, 37–38.
- Cavanni, P. & Ponti, I. (1994) Maculatura bruna del pero: una micopatia sempre d’attualità *Riv di Fruticult*, 12, 37–42.
- Collina, M. (2019). Maculatura bruna del pero: il contributo della ricerca. *Futurpera 2019*, Universidad de Boloña.
- Dobra, A. C., Garcia, L. (2015). Presencia de mancha negra del peral, *Stemphylium vesicarium*, en el Valle Medio del Río Negro, Patagonia Argentina. XXXVIII Congreso Argentino de Horticultura. Bahía Blanca. Buenos Aires. 05-08 de octubre - Página/s: 34(85):73.
- Köhl, J., Groenenboom-de Haas, B. H., Kastelein, P., Rossi, V., & Waalwijk, C. (2009). Quantitative detection of pear- pathogenic *Stemphylium vesicarium* in orchards. *Phytopathology*, 99(12), 1377–1386.
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2006). Brown spot of pear: An emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease*, 90(11), 1368–1375. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1368>.
- Llorente, I., Moragrega, C., Ruz, L., & Montesinos, E. (2012). An update on control of brown spot of pear. *Trees - Structure and Function*, 26(1), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0607-1>
- Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas de la Nación (2016). Informes de Cadenas de Valor: Frutícola - Manzana y Pera. 1–58. <http://economia.gob.ar>.
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., & Vilardell, P. (1995). Susceptibility of selected European pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age. In *Plant Disease* (Vol. 79, Issue 5, pp. 471–473). <https://doi.org/10.1094/PD-79-0471>
- Polfliet, M. (2002). Infection of *Stemphylium* increases every year. *Fruiteelt Den Haag* 92: 16–17.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.

- Tanahashi, M., Minoguchi, C., Yokoyama, K., & Otani, H. (2008). The first report of brown spot of European pear caused by *Stemphylium sp.* in Niigata prefecture Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 74,183.
- Tanahashi M, Okuda S, Miyazaki E, Parada RY, Ishihara A, Otani H, Osaki-Oka K, (2017). Production of host-selective SV- toxins by *Stemphylium sp.* causing brown spot of European pear in Japan. *J Phytopathol* 165(3):189–194. <https://doi.org/10.1111/jph.12549>.
- Temperini, C.V., Tudela, M.A.A., Gimenez, G.N. et al. (2022). Brown spot of pear, an emerging disease in Argentina: identification and pathogenicity characterization of Argentinean *Stemphylium vesicarium* isolates. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02493-y>
- Tudela MAA, Benazzi L, Pose GN, Di Masi SN (2018). Reporte de *Stemphylium vesicarium*, agente causal de la mancha negra en perales. Congreso Argentino de Microbiología. Póster C39, p. 389. Disponible en: <https://sites.google.com/view/camaya2018/programa/libro-de-res%C3%BAmenes>
- Tudela, A. & Di Masi, S. N. (2022). La mancha marrón del peral. Boletín Sanitario Nº 7. INTA Alto Valle. <https://inta.gob.ar/documentos/presencia-de-la-enfermedad-mancha-marron-del-peral>

## Capítulo 7 : Determinación de la sensibilidad de *Stemphylium vesicarium* a distintos fungicidas





## Introducción

La mancha marrón del peral es una enfermedad muy importante en algunas áreas de Europa, donde se emplean diversas estrategias para su control, siendo el empleo de fungicidas la más extendida. Los fungicidas más utilizados son ditiocarbamatos (Tiram y Mancozeb), strobilurinas (Kresoxim-metil, Trifloxistrobina o Piractrostrobina). Otros productos como Captan y Tebuconazol también son muy usados (Brunelli et al., 1997; Llorente 1997; Ponti et al., 1993, 1996; Vilardell 1988; Llorente & Montesinos, 2006; Llorente et al., 2012).

Tradicionalmente las aplicaciones de fungicidas para el control de esta enfermedad se realizaban de manera preventiva cada 7 a 14 días desde caída de pétalos hasta cosecha (Llorente, 1997; Ponti et al., 1993; Ponti et al., 1996; Llorente & Montesinos, 2006).

El primer sistema de pronóstico empleado para el control de la mancha marrón fue el sistema FAST (pronosticador de *Alternaria solani* en tomate), seleccionado por la relación taxonómica y el comportamiento similar de germinación de los conidios de *A. solani* y *Stemphylium vesicarium*. El uso del sistema FAST permitió reducir un 28% de aplicaciones de fungicidas (Montesinos & Vilardell, 1992). Gracias a estudios posteriores, se ajustó un modelo de pronóstico específico para la mancha marrón del peral, llamado BSPcast (Montesinos et al., 1995). El modelo determina el momento en el que las condiciones ambientales son favorables para la infección producida por *S. vesicarium*. El BSPcast se obtuvo a partir de experimentos realizados bajo condiciones ambientales controladas y se basa en una ecuación polinomial que relaciona la gravedad de la enfermedad con la duración del período húmedo y temperatura media de dichos períodos de humedad. Arroja un índice de riesgo acumulado (CR), obtenido de la suma de los valores diarios de riesgo de infección (R) de los últimos 3 días, donde valores de CR de 0,4 o 0,5 se utilizan para la decisión de aplicaciones de fungicidas (Llorente et al., 2012). Fue evaluado y validado en diferentes ensayos de campo en España e Italia bajo una amplia gama de variedades de pera y condiciones climáticas (Llorente et al., 2000). Para aumentar la eficacia del control, se introdujeron modificaciones en el modelo, principalmente el uso de un riesgo de infección diario (R) en lugar del riesgo de infección acumulativo (CR) de 3 días para guiar las aspersiones de fungicidas. Sin embargo, las modificaciones introducidas no dieron como resultado un aumento de la eficacia del control de la enfermedad, en comparación con el sistema original (Llorente et al., 2012). El BSPcast se implementa actualmente como un sistema de alerta en la red agrometeorológica de Servicios de Sanidad Vegetal de Cataluña (España) y del Servicio Fitosanitario, Regional de Emilia-Romagna (Italia), también se está empleado en Portugal, Bélgica y los Países Bajos. La eficacia del control de mancha marrón utilizando BSPcast es similar al que se

consigue con las aplicaciones a calendario fijo, pero proporciona un ahorro promedio de fungicidas del 30 % al 40 % (Llorente et al., 2000).

La resistencia a fungicidas, según FRAC, se refiere a una insensibilidad adquirida y heredable de un hongo a un agente antifúngico específico. El desarrollo de la resistencia a fungicidas es un proceso evolutivo, ya que el fungicida ejerce presión de selección sobre la población del patógeno mientras está matando la población inicial o silvestre pero no a la población alterada o mutante. El uso excesivo o mal uso de un modo de acción fungicida puede acelerar significativamente estos cambios en la población (FRAC, 2019). En 1990 se registró, en Italia, el primer caso de cepas de *S. vesicarium* resistentes a procimidona (dicarboxamida), ocasionando fallas de control en aplicaciones a campo (Brunelli et al., 1997; Collina et al., 2002; Alberoni et al., 2005). Se realizaron estudios para evaluar la posible resistencia cruzada con otras dicarboxamidas, obteniendo que en las áreas que habían tenido un mal manejo de agroquímicos, la procimidona había perdido totalmente su eficacia, mientras que el nivel de resistencia observado para otras dicarboxamidas fue mucho menor (Alberoni et al., 2005). En cuanto a las strobilurinas, a los 8 años de su introducción en Italia para el control de la mancha marrón, su efectividad era muy buena y la sensibilidad de las cepas era comparable con los valores de la línea base (Collina et al., 2007; Alberoni et al., 2010). Durante la temporada de 2006, se produjo una falla importante de control en establecimientos productivos del noreste de Italia, en la región de Emilia-Romagna, relacionado con una fuerte presión de selección. Los estudios realizados confirmaron que las poblaciones de *S. vesicarium* recolectadas en este huerto eran altamente resistentes a las strobilurinas (Collina et al., 2007).

En Europa se han realizado estudios de evaluación de agentes de control biológico contra la mancha marrón del peral, pero aún no se lograron resultados de control eficiente. Se han aplicado preparados de cepas de *Trichoderma koningii* y *T. viride* en árboles, pero la eficacia fue muy baja (Ponti et al., 1993; Llorente et al., 2012). En condiciones de invernadero se lograron resultados prometedores con cepas de *Pseudomonas fluorescens*, pero su actividad de control disminuyó al ser aplicado a campo (Montesinos & Bonaterra 1996; Montesinos et al., 1996; Llorente et al., 2012).

Se ha descrito que la producción de inóculo sexual ocurre principalmente durante el otoño y el invierno cuando se forman pseudotecios en el material vegetal muerto, principalmente en hojarasca de peral (Llorente & Montesinos, 2004), y residuos de malezas (Rossi et al., 2005). Los métodos que tienen cierta eficacia para reducir el inóculo primario son la trituración, la remoción de hojas en invierno, así como la aplicación de productos a base de *Trichoderma sp.* durante el invierno y la primavera. La aplicación de compuestos de cobre y urea en diferentes dosis o momentos durante el

otoño o el invierno no lograron presentar una reducción consistente del número de ascosporas atrapadas durante la temporada (Llorente et al., 2006).

El manejo integrado consiste en combinaciones de eliminación de hojarasca durante el invierno, aplicaciones de agentes de control biológico (fórmulas comerciales de *Trichoderma spp.*) durante el final del invierno y la primavera, y la aplicación de fungicidas a los árboles durante la temporada de crecimiento, programada según el modelo BSPcast. En Europa, estos métodos se han probado por separado o en combinación durante varios años (Llorente et al., 2006; Llorente et al., 2012). Los tratamientos con fungicidas aplicados solos o combinados con métodos de saneamiento son los más efectivos, con una reducción de la incidencia de la enfermedad en la fruta superior al 60% en comparación con el control no tratado. Los métodos de saneamiento, aplicados por sí solos, redujeron la incidencia de la enfermedad en un 30 a 60%, lo cual indica la importancia del manejo del inoculo primario en el control de la mancha marrón del peral (Moragrega et al., 2018).

En Argentina, ningún fungicida tiene registro para el control de la mancha marrón del peral. Actualmente, un reducido grupo de fungicidas cuenta con registro de uso en peral, según Senasa, (2022). Dentro del grupo de fungicidas con Actividad Multisitio (M) se encuentran registrados el sulfato cúprico pentahidratado, el sulfato tribásico de cobre, Mancozeb, Tiram, Ziram, Captan, y Folpet. En el grupo de Inhibidores de la Respiración (C) se encuentran Boscalid y Pyraclostrobin. Dentro del grupo de fungicidas de transducción de señales (E) se encuentra el Fludioxonil, y en el grupo de los de síntesis de proteínas y aminoácidos (D) se encuentra el Pirimetanol.

Edgington et al. (1971) definieron un criterio para asociar una sustancia fungicida con el nivel de fungitoxicidad. Los autores elaboraron una escala, basada en las concentraciones de principios activos que inhibían el 50% de la germinación de esporas (50% concentración inhibitoria - CI50) o en los que controlaban el 50% de la severidad de la enfermedad (concentración efectiva del 50% - EC50). Concentraciones menores a 1 mg L<sup>-1</sup> se consideran altamente tóxicas para el hongo, valores entre 1 y 10 mg L<sup>-1</sup> son moderados, entre 10 y 50 mg L<sup>-1</sup> son levemente fungitóxicos y arriba de 50 mg L<sup>-1</sup>, no tienen efecto tóxico sobre el hongo.

Siendo *Stemphylium vesicarium* un patógeno de reciente detección en la zona, resulta indispensable la generación de conocimiento local para su control.

## Objetivo general del capítulo

Evaluar la efectividad de fungicidas para el control del patógeno a través de experimentos *in vitro* y a campo.

## Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro* el efecto de fungicidas comerciales sobre el crecimiento micelial de cepas de *S. vesicarium*.
2. Evaluar *in vitro* el efecto de fungicidas comerciales sobre la germinación de las esporas de cepas de *S. vesicarium*.
3. Evaluar *in vitro* el efecto de control preventivo y curativo de los fungicidas sobre hojas y frutos.
4. Valorar *in vivo* el control de la enfermedad mediante aplicaciones de fungicidas a campo.

## Materiales y métodos

### Patógeno

Se seleccionaron tres cepas de alta patogenicidad, identificadas como SF23, SF20, y SF8, las cuales fueron previamente caracterizadas en el nivel morfológico, molecular y patogénico.

### Fungicidas

Se utilizaron 4 fungicidas comerciales, tres de ellos contienen un único principio activo y uno consiste en una mezcla de dos activos. Los fungicidas fueron Ziram® 76 WG (Agristar Argentina), que contiene ziram, un fungicida preventivo (Código FRAC M03); Merpan® 83 WP (Adama Argentina), que contiene captan, un fungicida preventivo (Código FRAC M04); y Timorex Gold® 22.25 EC (Syngenta Argentina), un fungicida preventivo y curativo de origen natural (código FRAC 46), que contiene extracto de *Melaleuca alternifolia* al 22,25 % P/V. El fungicida que contiene mezcla de activos fue

Bellis® WG (BASF Argentina) compuesto por piraclostrobin (FRAC Código 11) al 12,8% y boscalid (FRAC Código 7) al 25,2% (Tabla 7.1).

Merpan® (ftalamida) y Ziram® (ditiocarbamato) fueron incluidos en este estudio ya que son productos de actividad multisitio, con baja probabilidad de producción de resistencia y aceptados por SENASA para el cultivo de perales. Interfieren el mecanismo de respiración de los hongos por lo que inhiben la germinación de las esporas y dificultan el crecimiento y desarrollo micelial.

Bellis® cuenta con registro para el control de dicha enfermedad en España, donde se recomienda su uso preventivo cuando haya riesgo de infección o al detectar los primeros síntomas de ésta, repitiendo las aplicaciones, dependiendo de la mayor o menor presión de la enfermedad, y realizando un máximo de tres tratamientos en la temporada, siempre alternando con otros productos de distinto modo de acción, evitando hacer más de dos tratamientos sucesivos.

Timorex® se seleccionó con el fin de contar con una herramienta orgánica. Este producto posee un amplio espectro de acción, empleándose en Chile en el control preventivo y curativo de enfermedades en frutales de carozo (damasco, durazno, nectarino, ciruelo y cerezo) y pepita (manzano). En Argentina, este producto está solo registrado para los cultivos de arándano, frutilla, pimiento, tomate y vid. Está formulado a base del extracto de *Melaleuca alternifolia*, llamado comúnmente “árbol del té”. Causa inhibición del desarrollo de la germinación de esporas, inhibición del crecimiento del micelio y lesión expansiva; inhibición en la producción de esporangios, mediante supresión y erradicación de colonias de los patógenos presentes en los frutos y hojas. Si bien este fungicida no cuenta con registro en el cultivo de peral, se consideró pertinente la prueba de su eficiencia para el control del patógeno.

### Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de *S. vesicarium*

Para la preparación de los medios con fungicida se trabajó con medio PDA (Anexo I), esterilizado en autoclave por 15 min a 121°C. Luego de haber alcanzado unos 40-45 °C, se añadieron las soluciones correspondientes de cada fungicida, hasta obtener el rango de concentraciones de estudio (Tabla 7.1).

Cultivos monospóricos de las tres cepas de *S. vesicarium* se cultivaron en medio PDA en placas Petri y se mantuvieron a 25 °C durante 7 días. Del borde de estas colonias se tomaron discos de 5 mm y se los colocó individualmente en el centro de las placas con fungicida (Alberoni et al., 2005). Se utilizaron placas de Petri con PDA sin fungicida como controles.

Las placas se incubaron a 25 °C y en oscuridad durante 7 días y se registraron los diámetros de las colonias (mm) cada 24 horas. Se usaron tres repeticiones (tres placas por cepa y concentración de fungicida), y el experimento se realizó tres veces.

Tabla 7.1: Formulación y concentraciones de los fungicidas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) utilizados en los ensayos de crecimiento micelial, germinación de conidios, inoculación de frutos *in vitro* y pruebas de control a campo.

Fungicida	Principio activo y formulación	Ensayo			
		Crecimiento micelial	Germinación de esporas	Frutos <i>in vitro</i> (dosis recomendadas)	Ensayos a campo (dosis recomendadas)
Bellis®	Boscalid (252 g kg <sup>-1</sup> ) + Pyraclostrobin (128 g kg <sup>-1</sup> )	0,01, 0,1, 1, 10, 50, 100	0,1, 1, 10, 50, 100	500	500
Ziram®	Ziram (760 g kg <sup>-1</sup> )	0,1, 0,5, 1, 10, 50, 100	0,1, 1, 10, 50, 100	2000	2000
Merpan®	Captan (830 g kg <sup>-1</sup> ) 1)	0,1, 1, 10, 100, 500, 1000	0,1, 1, 10, 100, 500, 1000	2000	NE*
Timorex Gold®	<i>Melaleuca alternifolia</i> extract (222,5 g L <sup>-1</sup> ) 1)	0,1, 1, 10, 100, 500, 1000	0,1, 1, 10, 100, 500, 1000	135	NE*

NE: No evaluado

### Inhibición *in vitro* de la germinación de esporas de *S. vesicarium*

Las cepas se cultivaron en medio AA (Anexo I) en cajas de Petri y se incubaron por 20 días a 20-25 °C y 16 h de fotoperíodo bajo luz azul-negra hasta la esporulación completa (Tanahashi et al., 2017; Temperini et al., 2022). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, bajo flujo laminar, sus superficies se frotaron suavemente con un asa después de agregar 9 mL de ADE y una gota de Tween 20. La suspensión se filtró a través de una gasa y se ajustó a una concentración de  $5 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ .

Las suspensiones se colocaron en tubos de 9 mL y se mezclaron con una suspensión acuosa de cada fungicida, alcanzando una concentración uniforme de conidios de  $1 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  en un volumen final de 4 mL, para cada combinación de fungicida y dosis. La suspensión de conidios sin fungicida fue el tratamiento control. Se usaron tres repeticiones para cada concentración de fungicida. Los tubos se incubaron a 25 °C y cada hora se controló el porcentaje de germinación del tratamiento testigo, tomando alícuotas y contando 100 conidios.

Una vez que el control alcanzó el 100% de germinación, se contaron bajo microscopio óptico los conidios germinados de cada tratamiento. Con los conteos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición de cada tratamiento. El ensayo se realizó dos veces.

### Ensayo *in vitro* sobre frutos

La inoculación de frutos se realizó por aspersion con atomizador manual, aplicando 3 mL de suspensión de esporas por fruto de la cepa SF23 (que previamente fue identificada como altamente patogénica), ajustada a  $5 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  (adaptado de Marchi et al., 1995).

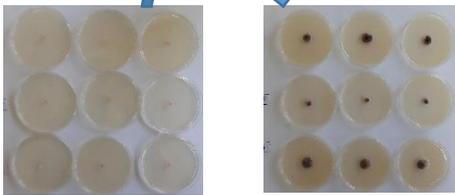
Se realizaron tratamientos preventivos y curativos (Figura 7.1). Para los tratamientos preventivos, los fungicidas se aplicaron en árboles del cultivar D'Anjou, espaciados a 4x4 m, ubicados en el Estación Experimental Agrícola Alto Valle (EEA) del INTA (39°01'45.1"S 67°44'33.5"O), con una fumigadora motorizada (Still-SR 420). Los frutos se recolectaron los días 1, 7 y 15 desde la aplicación, se trasladaron al laboratorio y se inocularon. También se recolectaron frutos que solo fueron tratados con agua, a los que se les aplicó la suspensión de conidios, como tratamientos testigo.

Para los tratamientos curativos, los frutos se tomaron al azar de cinco árboles sin tratar en buenas condiciones nutricionales y sanitarias ubicados en la misma huerta. Los frutos se llevaron al laboratorio y se desinfectaron por inmersión durante un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, y se enjuagaron tres veces con ADE. Una vez secos, se inocularon. Los tratamientos curativos se aplicaron a las 24 horas después de la inoculación, con un atomizador manual.

## Fungicidas y concentraciones ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

			
Bellis® (Boscalid + Pyraclostrobin)	Merpan® (Captan)	Ziram® (Ziram)	Timorex Gold® ( <i>Melaleuca alternifolia</i> extract)
0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100	0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100	0.1, 1, 10, 50, 100	0.1, 1, 10, 100, 500, 1000
Dosis de uso: 2000			

### Crecimiento micelial

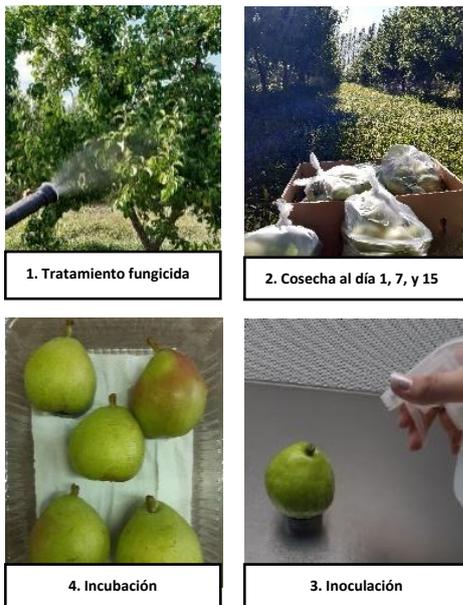


### Germinación

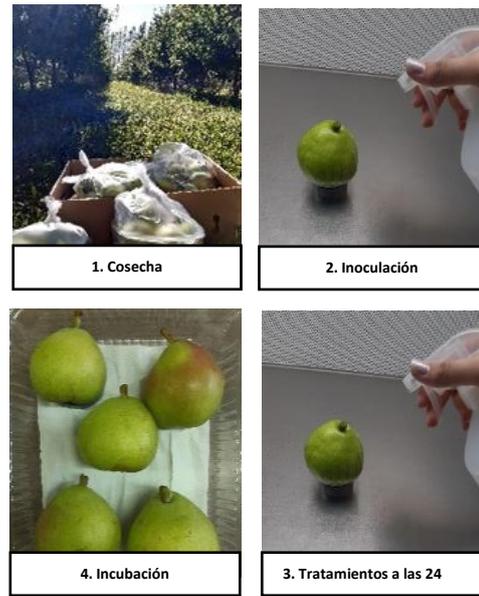


### Ensayos in vitro sobre frutos

#### Tratamientos preventivos



#### Tratamientos curativos



### Ensayos de control a campo



Figura 7.1: Esquema de los ensayos realizados.

Los frutos utilizados como control fueron inoculados y no recibieron tratamiento con fungicida. En ambos ensayos (preventivo y curativo) se utilizaron 20 frutos por tratamiento y tiempo, colocados dentro de cámaras húmedas construidas por un recipiente plástico con soporte individual para cada fruto. Para mantener las condiciones de humedad, el fondo de cada recipiente se cubrió con una toalla de papel, a la que se le aplicó un volumen de agua hasta saturación. Los frutos se incubaron durante 7 días a 25°C, después de lo cual se contó el número de manchas desarrolladas en cada fruto. Los resultados se expresaron como incidencia (porcentaje de frutos afectados) y severidad (número de manchas por fruto).

### Ensayos de control a campo

Se evaluó la eficacia de dos fungicidas (Ziram® y Bellis®) para el control de la enfermedad, en condiciones de campo (Figura 7.1). El estudio se llevó a cabo en árboles del cv. D'Anjou, espaciados a 4x4 m, pertenecientes a un establecimiento productivo con registro previo de la enfermedad, ubicado en 39°04'04.5"S 67°36'15.1"W. Los tratamientos se aplicaron de 1 a 10 días antes de pronóstico de lluvia. Árboles tratados con agua sirvieron como controles. Se emplearon 10 repeticiones de 5 árboles por tratamiento y el ensayo se realizó en dos temporadas consecutivas. La incidencia se determinó por el conteo de 250 hojas por repetición.

### Diseño y análisis estadístico

Los ensayos de crecimiento micelial y germinación emplearon un diseño bifactorial, con tres repeticiones por combinación de dosis de tratamiento y cepa. Las concentraciones efectivas de cada fungicida para inhibir el 50 % del crecimiento del micelio o la germinación de esporas (valores de EC50) se estimaron mediante un enfoque de regresión no lineal con el paquete medrc (Gerhard & Ritz, 2018). Se ajustó un modelo log-logístico no lineal con tres parámetros (LL.3) para generar curvas dosis-respuesta para cada fungicida, considerando a la cepa como efecto aleatorio. Se compararon los valores de EC50 de los distintos fungicidas mediante la función EDcomp() del paquete "drc" (Ritz et al., 2019).

Para los ensayos *in vitro* con frutos, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con estructura factorial, con los factores tratamiento y tiempo de aplicación. Se analizó el impacto del fungicida y el momento de la aplicación sobre la gravedad de la enfermedad (manchas por fruto). Tanto para los

tratamientos curativos como para los preventivos se ajustaron modelos lineales generalizados mixtos, con las variables réplicas y repetición del experimento como efectos aleatorios, para aumentar el poder del análisis.

En el caso de los ensayos a campo, se analizó el efecto del fungicida en la proporción de hojas afectadas en cada tratamiento, considerando el efecto de la temporada. Se ajustó un modelo lineal generalizado, de familia binomial, donde la proporción de hojas afectadas fue la variable respuesta, el tratamiento y la temporada fueron los efectos fijos. Para realizar la comparación de medias se utilizó el test de Tukey.

Para todos los modelos se evaluó la bondad de ajuste. Para la comparación de las medias de los tratamientos se utilizaron los contrastes de Tukey. El análisis se realizó mediante el software R (versión 4.2.3; R Core Team, 2023).

## Resultados

### Inhibición in vitro del crecimiento micelial de *S. vesicarium*

El diámetro medio de colonia de las tres cepas en el tratamiento control a los siete días de incubación fue de  $57,56 \pm 2,01$  mm. Todos los fungicidas estudiados mostraron un aumento de la eficacia de control a medida que aumentó su concentración.

De los fungicidas utilizados, Bellis® fue el que más inhibió el crecimiento del micelio, con valores medios de EC50 de  $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ziram® y Merpan® fueron menos efectivos, con valores medios de EC50 de 6,45 y 24,51 respectivamente. Timorex®, requirió mayores concentraciones para inhibir el crecimiento micelial, con valores promedio de EC50 de 112,84 (Tabla 7.2).

Los valores de EC50 de los cuatro los fungicidas fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0,0001$ ).

En la Figura 7.2 se pueden apreciar los diámetros de colonia de la cepa SF23 a los 7 días de incubación en las distintas concentraciones de fungicidas utilizadas y en la Figura 7.3 las curvas dosis-respuesta de los fungicidas para el crecimiento micelial.

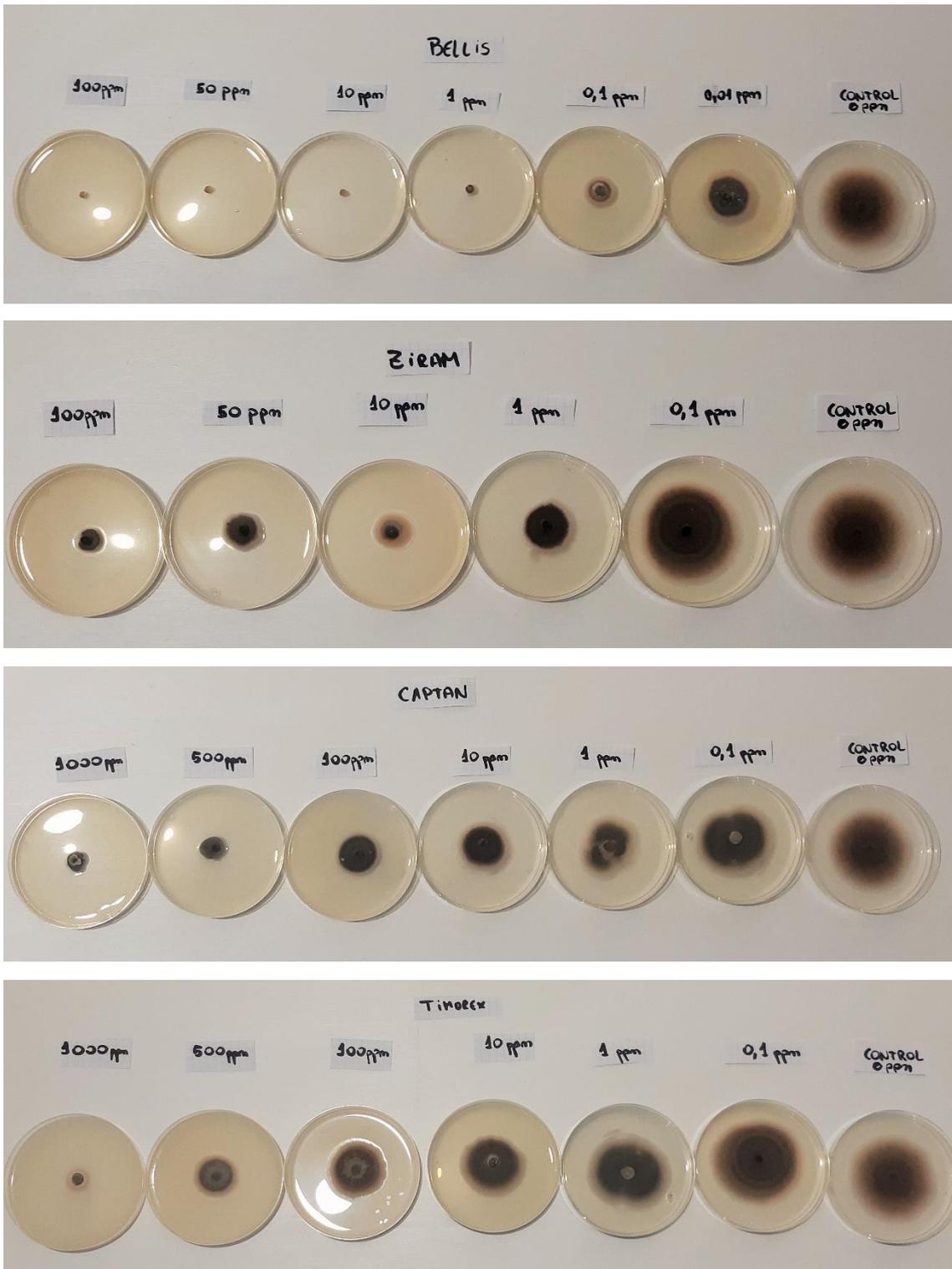


Figura 7.2: Crecimiento micelial a los 7 días de incubación en las distintas concentraciones de cada fungicida.

## Inhibición in vitro de la germinación de esporas de *S. vesicarium*

La germinación media en el control fue del 100%. El tratamiento con Bellis® fue el que requirió menores concentraciones para inhibir la germinación conidial, con un valor medio de EC50 de 0,02 µg mL<sup>-1</sup>.

Ziram® y Merpan® presentaron valores medios de EC50 de 0,15 y 1,13 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Timorex® fue el producto menos efectivo contra la germinación conidial, presentando un EC50 medio de 289.03 (Tabla 7.2).

Los valores de EC50 obtenidos para los cuatro fungicidas mostraron diferencias significativas (los valores de *p* de estas comparaciones fueron < 0,0001).

Tabla 7.2: Concentración efectiva 50 (µg mL<sup>-1</sup>) de los fungicidas para el crecimiento micelial y germinación de esporas de *S. vesicarium*. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey

Fungicida	Ingrediente activo y grupo químico	Crecimiento micelial (EC50 ± DE)	Germinación (EC50 ± DE)
Bellis®	Boscalid (carboxamida) + Pyraclostrobin (stobilurina)	0,029 ± 0,00 <b>a</b>	0,02 ± 0,00 <b>a</b>
Ziram®	Ziram (ditiocarbamato)	6,45 ± 0,61 <b>b</b>	0,15 ± 0,03 <b>b</b>
Merpan®	Captan (ftalamida)	24,51 ± 1,62 <b>c</b>	1,13 ± 0,02 <b>c</b>
Timorex®	Extracto de <i>Melaleuca alternifolia</i> (monoterpenos monocíclicos)	112,84 ± 22,16 <b>d</b>	289,03 ± 34,06 <b>d</b>

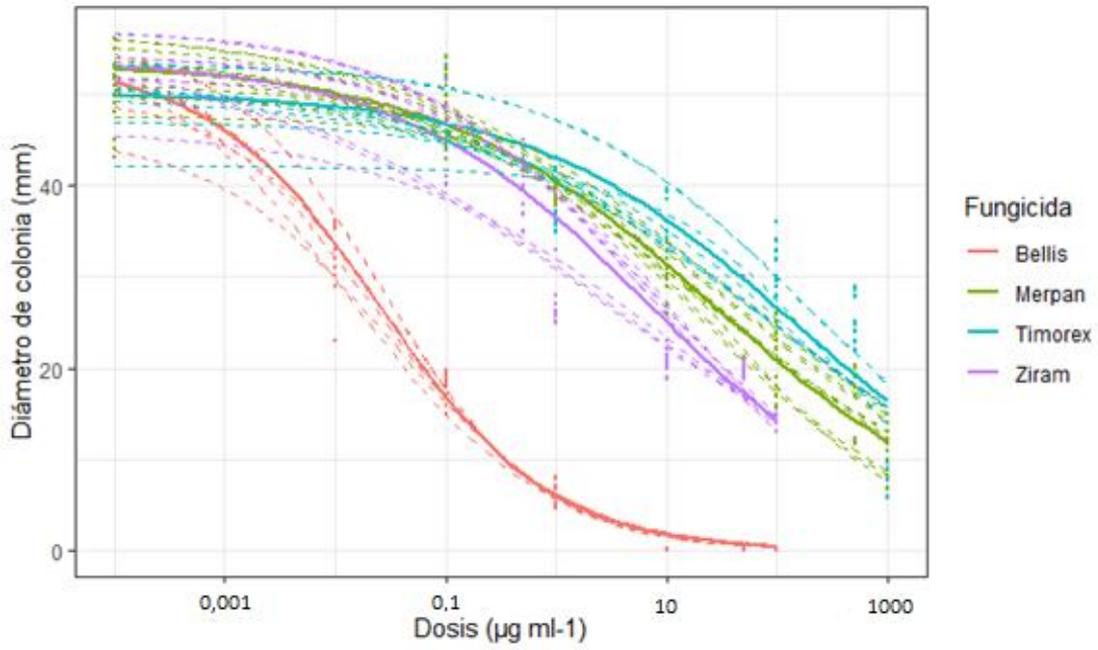


Figura 7.3: Curvas de dosis-respuesta de los fungicidas Bellis®, Ziram®, Merpan® y Timorex® para el crecimiento micelial de los aislamientos de *S. vesicarium*.

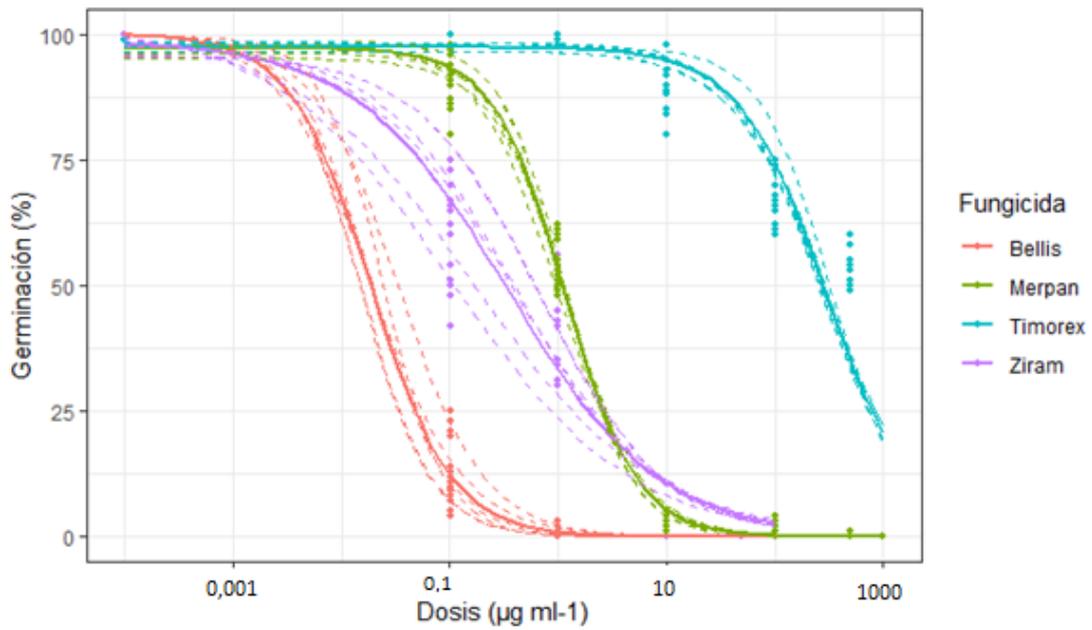


Figura 7.4: Curvas de dosis-respuesta de los fungicidas Bellis®, Ziram®, Merpan® y Timorex® para la germinación conidial de los aislamientos de *S. vesicarium*.

## Ensayo in vitro sobre frutos

### Tratamientos preventivos

Los frutos control presentaron un 100% de incidencia, con una severidad media de 76 manchas por fruto.

En el tratamiento con Bellis<sup>®</sup>, los frutos inoculados el día 1 (24 horas después de la aplicación del tratamiento), presentaron un 90% de frutos sin manchas. Los frutos inoculados en los días 7 y 15 mostraron un incremento en la incidencia del 75 y 80 % respectivamente. Sin embargo, la mayoría de los frutos afectados presentaron menos de 5 manchas cada uno.

Los frutos tratados con Captan<sup>®</sup> e inoculados el día 1 mostraron una incidencia del 45 %, y frutos afectados presentaron menos de 5 manchas. Los frutos inoculados el día 7 presentaron una incidencia del 60 %, con la mayor proporción de frutos afectados con menos de 5 manchas, mientras que los inoculados el día 15, presentaron un 80 % de incidencia y una severidad de más de 5 manchas por fruto.

Con respecto al tratamiento con Ziram<sup>®</sup>, los frutos inoculados en los días 1 y 7 presentaron 55 y 60 % de incidencia, mientras que a los 15 días todos los frutos inoculados presentaron alguna mancha (55% hasta 5 manchas y el 45% restante más de 5 manchas).

Todos los frutos tratados con Timorex<sup>®</sup> presentaron más de 5 manchas cada uno, en todos los tiempos de inoculación, al igual que los frutos control.

El análisis estadístico indicó que la severidad (número de manchas por fruto) presentó diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en diferentes días, según los resultados del ANOVA ( $p < 0.0001$ ). Todas las combinaciones de tratamientos se sometieron al test de Tukey, anidado por el factor tiempo entre aplicación e inoculación. Cuando la inoculación se realizó el día 1, el tratamiento más eficiente para disminuir la gravedad de la enfermedad fue Bellis<sup>®</sup> (grupo a), seguido de Merpan<sup>®</sup> (ab), y Ziram<sup>®</sup> (grupo b), mostrando una reducción de entre 99 y 98 % de manchas por fruto. Timorex<sup>®</sup> mostró la menor eficiencia (grupo c), sin embargo, presentó diferencias significativas con respecto a los frutos no tratados, logrando una reducción del 73,7% de las manchas en los frutos (Tabla 7.3).

En cuanto a los frutos inoculados el día 7, Bellis<sup>®</sup>, Merpan<sup>®</sup> y Ziram<sup>®</sup> (a) fueron los tratamientos más eficientes, mostrando una reducción de aproximadamente el 97 % de la severidad de la enfermedad, con diferencias significativas con respecto a Timorex<sup>®</sup> (b) y al control (c), pero no entre ellos.

Timorex® logró reducir la gravedad de la enfermedad en un 28,5 %. Se obtuvieron resultados similares para los tratamientos en el día 15, sin embargo, la reducción en la severidad de la enfermedad fue menor. En la Figura 7.5 se puede observar el número de manchas que se produjeron en cada tratamiento.

Tabla 7.3 : Eficacia de tratamientos preventivos en peras D'Anjou, aplicados 1, 7 y 15 días antes de la inoculación con la cepa SF23 de *S. vesicarium*. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey, anidado por tiempo.

<b>Tiempo entre el tratamiento y la inoculación</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Incidencia, porcentaje de frutos afectados (media ± DE)</b>	<b>Severidad, manchas por fruto (media ± DE)</b>	<b>Control de severidad (%)</b>	<b>Grupo</b>
<b>1</b>	Bellis®	12,50 ± 5,23	0,12 ± 0,06	99,8	<b>a</b>
	Merpan®	45,00 ± 7,87	0,50 ± 0,14	99,3	<b>ab</b>
	Ziram®	60,00 ± 7,75	1,11 ± 1,23	98,5	<b>b</b>
	Timorex®	100,00 ± 0,00	19,44 ± 1,33	73,7	<b>c</b>
	Control	100,00 ± 0,00	73,85 ± 3,22	0	<b>d</b>
<b>7</b>	Bellis®	67,50 ± 7,41	2,79 ± 0,41	96,3	<b>a</b>
	Merpan®	70,00 ± 7,25	2,32 ± 0,36	96,9	<b>a</b>
	Ziram®	57,50 ± 7,82	1,49 ± 0,28	98,0	<b>a</b>
	Timorex®	100 ± 0,00	54,18 ± 2,60	28,5	<b>b</b>
	Control	100 ± 0,00	75,95 ± 3,29	0	<b>c</b>
<b>15</b>	Bellis®	82,5 ± 6,01	4,31 ± 0,54	94,6	<b>a</b>
	Merpan®	80,00 ± 6,32	10,29 ± 1,26	87,1	<b>b</b>
	Ziram®	95,00 ± 3,45	6,12 ± 0,66	92,3	<b>ab</b>
	Timorex®	100,00 ± 0,00	57,50 ± 2,71	28,0	<b>c</b>
	Control	100,00 ± 0,00	79,87 ± 3,41	0	<b>d</b>

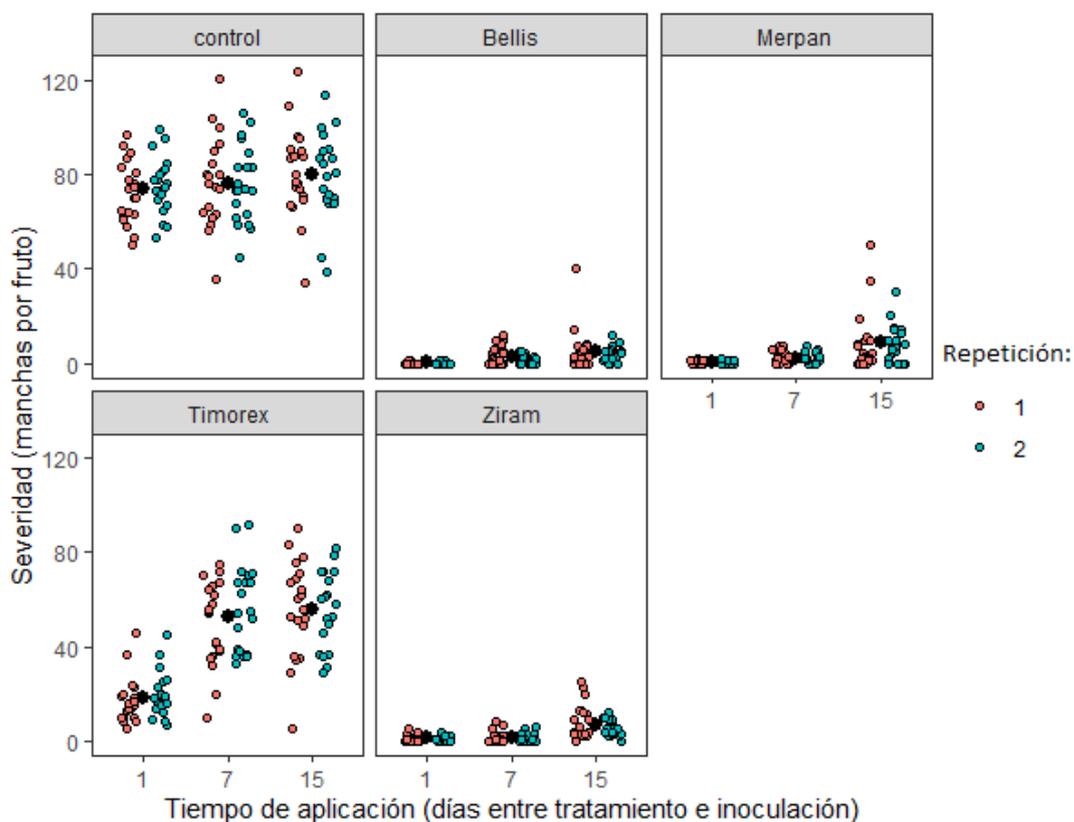


Figura 7.5: Severidad (manchas por fruto) en los tratamientos preventivos con Bellis®, Merpan®, Ziram®, y Timorex® en peras D'Anjou, aplicados 1, 7, y 15 días antes de la inoculación con la cepa SF23 de *S. vesicarium*, en las repeticiones 1 y 2 del ensayo.

### Tratamientos curativos

Los frutos inoculados que no recibieron ningún tratamiento fungicida presentaron un 100 % de incidencia, con un promedio de 28 manchas por fruto. Los resultados indicaron que, de los frutos tratados con fungicidas, Timorex® fue el que presentó mayor severidad. La incidencia fue del 90% en el caso de Bellis®, 95% para Merpan® y Ziram®, y 100 % en el caso de Timorex®. En la Figura 7.6 se puede apreciar el número de manchas por fruto por tratamiento y repetición del ensato.

Según ANOVA, los tratamientos tuvieron un efecto significativo ( $p < 0,0001$ ), pero la repetición del ensayo no tuvo significancia, por lo que los datos se analizaron juntos. El test de Tukey indicó que los fungicidas presentaron diferencias significativas con el control, siendo Ziram®, Merpan® y Bellis® los

más efectivos (Tabla 7.4). El tratamiento con Bellis® logró una reducción de la severidad del 82,8 %, Ziram® del 81,4 %, Merpan® del 80,4 % (a) y Timorex® del 37,2 % (b).

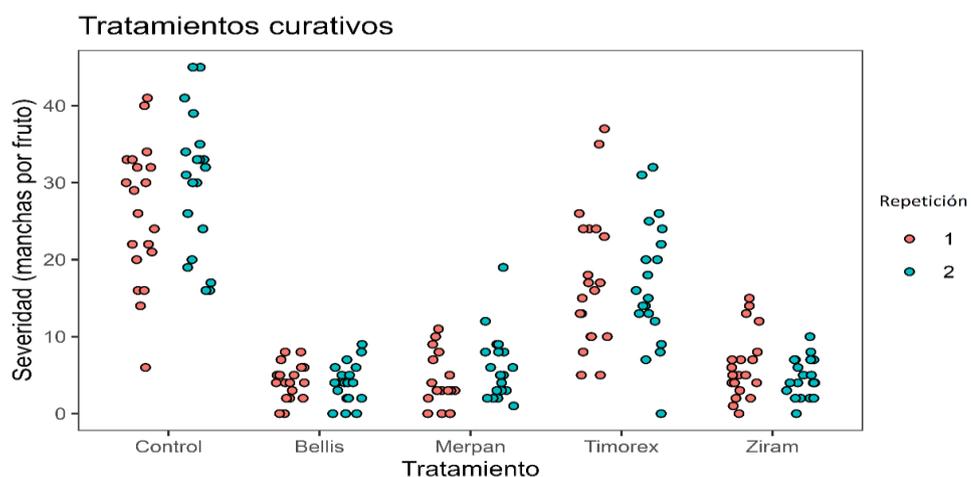


Figura 7.6: Severidad (manchas por fruto) registrada en los tratamientos curativos en peras D'Anjou, aplicados 24 horas después de la inoculación, para las repeticiones del ensayo.

Tabla 7.4: Eficacia de tratamientos curativos en peras D'Anjou, aplicados a las 24 horas después de la inoculación con la cepa *S. vesicarium* SF23. Las medias de severidad seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

Tratamiento	Incidencia, porcentaje de frutos afectados (media ± DE)	Severidad, manchas por fruto (media ± DE)	Control de severidad (%)	Grupo
Bellis®	90,00 ± 4,74	4,80 ± 0,44	82,8	<b>a</b>
Merpan®	97,50 ± 2,68	5,47 ± 4,80	80,4	<b>a</b>
Ziram®	95,00 ± 3,44	5,18 ± 4,64	81,4	<b>a</b>
Timorex®	97,50 ± 2,46	17,53 ± 1,32	37,2	<b>b</b>
Control	100,00 ± 0,00	27,95 ± 1,96	0	<b>c</b>

## Ensayos a campo

No se detectaron síntomas de infección natural por *S. vesicarium* en los frutos debido a los factores ambientales ligeramente predisponentes. Sin embargo, dado que los síntomas si se detectaron en las hojas, se pudo determinar la proporción de hojas afectadas.

El modelo ajustado para la proporción de hojas afectadas mostró que hubo una interacción significativa entre el tratamiento fungicida y la temporada. En la primera temporada (2018-2019), Bellis® y Ziram® lograron reducciones del 42,6 % y 56,5 % en la incidencia de la enfermedad en comparación con el control, respectivamente. Mientras que en la segunda temporada (2019-2020), Bellis® y Ziram® presentaron redujeron la incidencia en un 88,5% y 69,3%, respectivamente (Tabla 7.5).

Tabla 7.5: Eficacia de los fungicidas Bellis® y Ziram® aplicados en el campo durante dos temporadas para el control de mancha marrón del peral, en árboles del cv. D'Anjou. Las medias de incidencia seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey, anidado por temporada.

Tratamiento	Temporada	Incidencia, porcentaje de hojas afectadas (media ± DE)	Control de incidencia (%)	Grupo
Bellis®	1	2,48 ± 1,26	42,6	a
Ziram®		1,88 ± 0,71	56,5	a
Control		4,32 ± 2,04	0	b
Bellis®	2	1,08 ± 0,53	88,5	a
Ziram®		2,88 ± 1,86	69,2	b
Control		9,80 ± 4,54	0	c

Según el test de Tukey, en la primera temporada los tratamientos Ziram® y Bellis® tuvieron un efecto similar, mientras que en la segunda temporada Bellis® fue más eficaz que Ziram® en la disminución de los síntomas (Figura 7.7).

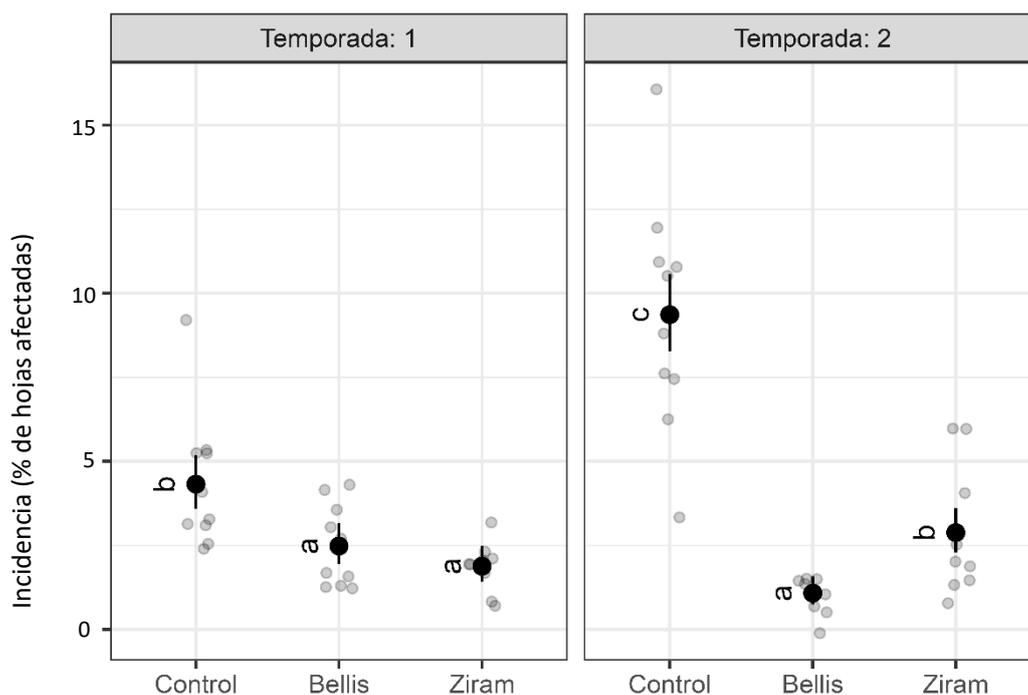


Figura 7.7: Efecto de la aplicación preventiva de los fungicidas a campo. Incidencia (en valores de porcentaje de hojas afectadas) según tratamiento y temporada. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes según el test de Tukey, anidado por temporada.

## Discusión

La mancha marrón del peral es una enfermedad de reciente aparición en la zona del Alto Valle de Río Negro, y debido a que no existían hasta el momento estudios locales sobre su control, se decidió realizar esta investigación. Se buscaron productos químicos que inhiban la germinación de los conidios, el crecimiento del micelio, y reduzcan la aparición y desarrollo de síntomas en frutos y hojas.

Según los valores de EC50 obtenidos y siguiendo los criterios definidos por Edgington et al. (1971), se puede afirmar que, para la inhibición del crecimiento micelial, el único fungicida altamente tóxico fue Bellis®; Ziram® fue moderadamente tóxico; Merpan® fue levemente tóxico; y Timorex® no tuvo efecto tóxico sobre *S. vesicarium*. En cuanto a la inhibición de la germinación de esporas, Bellis®, Ziram® y Merpan® fueron altamente tóxicos para el hongo, mientras que Timorex® no fue tóxico.

Los fungicidas evaluados en este trabajo tienen diferentes modos de acción, el pyraclostrobin, un componente de Bellis®, es un inhibidor externo de la quinona (QoI), que inhibe la respiración mitocondrial al bloquear el transporte de electrones en el complejo citocromo bc1 (complejo III) (FRAC, 2021). Los QoIs controlan una variedad de patógenos fúngicos mediante la inhibición de la germinación de esporas y el crecimiento del micelio (Anke, 1995; Bartlett et al., 2002). Boscalid, el otro componente de Bellis®, es un inhibidor de la succinato deshidrogenasa (FRAC, 2021), es eficaz contra diferentes etapas del desarrollo fúngico, principalmente contra la germinación de esporas, el alargamiento del tubo germinativo, pero también inhibe otras etapas, como la formación de aspersorios y el crecimiento del micelio (Stammler, 2008). El efecto penetrante de este fungicida podría explicar la alta sensibilidad in vitro que presentaron las cepas de *S. vesicarium*, tanto en la germinación de conidios como en el crecimiento del micelio. Hay registros de casos de resistencia a strobilurinas como kresoxim-metil, trifloxistrobin, y piraclostrobin en perales italianos (Collina et al., 2007; Alberoni et al., 2010). De acuerdo con los resultados obtenidos, las cepas estudiadas no mostraron resistencia al fungicida que contenía strobilurina. Sin embargo, si el objetivo fuera comprobar que no existe resistencia en las cepas locales, un estudio a nivel poblacional sería el más indicado. Merpan® (que contiene captan) es un fungicida no penetrante, con actividad multisitio (FRAC, 2021), cuyo modo de acción se basa en la reacción con tioles (Gordon, 2010). Inhibe la germinación de conidios al interrumpir la respiración, que convierte la glucosa en piruvato (Hochstein y Cox, 1956; Gur et al., 2020). Esto podría explicar las diferencias observadas en este trabajo entre los valores de EC50 de germinación de esporas y crecimiento micelial. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gur et al. (2020) para la germinación de conidios y crecimiento micelial de *Alternaria alternata f.sp. mali*. Ziram también es un fungicida no penetrante con actividad multisitio (FRAC, 2021), que actúa interfiriendo con las enzimas involucradas en el proceso de respiración e inhibiendo la germinación de esporas (Dattatray et al., 2020). De acuerdo con los resultados obtenidos, Ziram® alcanzó valores de EC50 más bajos que Merpan® para ambos ensayos. Estos dos últimos fungicidas, se incluyeron en el presente estudio debido a su naturaleza multisitio y al hecho de que los hongos no pueden desarrollar fácilmente resistencia a ellos. Timorex® (que contiene extracto de *Melaluca alternifolia*) causa la ruptura de la membrana celular fúngica (FRAC, 2021) y se recomienda contra un amplio espectro de ascomicetes y enfermedades bacterianas de las plantas. La motivación para incluir este fue su naturaleza orgánica y no generadora de resistencia, pero sus resultados en la germinación de esporas y el control del crecimiento micelial mostraron una capacidad de inhibición limitada frente a las cepas de *S. vesicarium* utilizadas.

La eficacia de los tratamientos preventivos y curativos contra el desarrollo de la mancha marrón se comprobó con ensayos de inoculación in vitro sobre frutos. Todos los fungicidas no penetrantes

deben ser considerados agentes preventivos o protectores, y algunos fungicidas penetrantes también pueden tener acción preventiva o protectora. Los fungicidas penetrantes, como Bellis<sup>®</sup>, son capaces de inhibir el crecimiento fúngico dentro de los tejidos vegetales antes de que se observen síntomas y signos, actúan principalmente durante el período de incubación paralizando el proceso infeccioso (Bartlett et al., 2002; Amaro et al., 2020; Carmona et al., 2020). En el presente estudio se evaluaron fungicidas con diferentes modos de acción para establecer la mejor estrategia de control de la enfermedad. En las pruebas realizadas, los tratamientos preventivos lograron reducir significativamente la incidencia y la severidad de la infección de mancha marrón, mientras que los tratamientos curativos no fueron igualmente efectivos. El tratamiento más efectivo fue Bellis<sup>®</sup> aplicado preventivamente un día antes de la inoculación. Estos resultados fueron razonables debido a su modo de acción penetrante. La efectividad mostrada por Merpan<sup>®</sup> y Ziram<sup>®</sup> podría atribuirse a su actividad multisitio y capacidad para inhibir la germinación de las esporas. En cuanto a la incidencia, no hubo diferencias entre los frutos tratados con Timorex<sup>®</sup> y los frutos control. Sin embargo, los valores de severidad indican que los frutos tratados con Timorex<sup>®</sup> presentaron menos manchas que los frutos no tratados.

Los resultados mostraron que, si bien los tratamientos lograron reducir el nivel de la enfermedad, su efectividad se redujo a medida que transcurrió el tiempo desde la aplicación, posiblemente debido a la degradación natural del producto. Según Llorente (1997), los fungicidas aplicados curativamente son ineficaces para el control de la enfermedad. Esto puede explicarse por la liberación de toxinas SV que ocurre después de la germinación (Singh et al., 1999). En consecuencia, si se aplica el fungicida una vez que ya se ha producido la infección, se inhibe la germinación o alargamiento del tubo germinativo, pero si ya se ha liberado la toxina, se provocará inevitablemente la necrosis (Llorente 1997; Llorente & Montesinos, 2006; Singh et al., 1999). Sin embargo, si no se pudieron realizar tratamientos preventivos, sería necesario evaluar la posible utilidad de un tratamiento curativo, aunque no sea el momento más indicado. Los niveles de reducción de la enfermedad obtenidos en este trabajo por los tratamientos curativos no fueron los adecuados, coincidiendo con Llorente & Montesinos, 2006. No redujeron la incidencia de la enfermedad, pero sí lograron una reducción de la severidad del 50 %. Si consideramos la importancia del manejo del inóculo, una aplicación curativa podría lograr una reducción considerable. Se sabe que la velocidad de germinación de las esporas de *S. vesicarium* depende de la temperatura y disponibilidad de agua en el tejido vegetal (Montesinos et al., 1995; Llorente & Montesinos, 2006). De esta forma, si las temperaturas son bajas, la germinación es más lenta y los tratamientos curativos podrían tener efectos significativos en la reducción de los niveles de la enfermedad. Los altos niveles de infección observados en los ensayos *in vitro* sobre frutos se debieron a las condiciones favorables de incubación y a la cantidad de inóculo

utilizada. Ponti et al. (1993) demostraron que en condiciones climáticas muy predisponentes y con un alto nivel de inóculo, es muy difícil lograr un control 100 % efectivo, aún con el mejor manejo de las aplicaciones de fungicidas. Según Llorente & Montesinos (2006), para que la infección ocurra se requiere un mínimo de 6 h de humedad a la temperatura óptima de 20 - 25 °C.

Los resultados obtenidos en los ensayos de campo indicaron un adecuado nivel de control de los tratamientos con Bellis® y Ziram®, presentando diferencias significativas con frutos no tratados. El control logrado por el fungicida de contacto y el penetrante fue similar en la primera temporada. En esta temporada, las condiciones predisponentes se presentaron a los 10 días de aplicados los tratamientos. Si esto es comparado con los resultados de los tratamientos preventivos *in vitro*, los resultados de ambas pruebas indicaron que los tratamientos preventivos con fungicidas penetrantes y no penetrantes tuvieron una eficacia similar. En la segunda temporada, el nivel de la enfermedad en el tratamiento control fue mayor que en la primera, y Bellis® presentó una mayor disminución en la incidencia de la enfermedad que Ziram®. En las dos temporadas analizadas, la temperatura fue inferior a la ideal para que se presentara la enfermedad, por lo que no se registraron daños en frutos. Sin embargo, se pudieron establecer diferencias a partir de la proporción de hojas afectadas en los distintos tratamientos.

Los resultados presentados en este trabajo son los primeros sobre la eficacia de control de diferentes fungicidas contra cepas locales de *S. vesicarium*, los cuales pueden ser utilizados para un manejo más eficiente de la enfermedad en la región del Alto Valle. Sin embargo, sería interesante continuar con los estudios de campo, con el objetivo de probar fungicidas de diferentes modos de acción en condiciones climáticas más predisponentes para la enfermedad.

## Conclusiones parciales

Este estudio permitió identificar a Bellis<sup>®</sup>, Ziram<sup>®</sup>, y Merpan<sup>®</sup> como posibles herramientas de manejo de la mancha marrón del peral. Bellis<sup>®</sup> fue el fungicida más eficaz para prevenir la germinación de esporas y el crecimiento del micelio, demostrando EC50 menores que el resto. Ziram<sup>®</sup>, fue el segundo mejor.

Los tratamientos preventivos fueron los más efectivos para reducir la incidencia y la severidad de la mancha marrón. Si una estrategia curativa fuera la única posibilidad, los tratamientos deberían aplicarse lo antes posible luego de que ocurrieran las condiciones predisponentes para la enfermedad.

Debido a que resulta fundamental el uso racional de los agroquímicos a fin de evitar la aparición de cepas resistentes, es necesario contar con una variedad de grupos químicos que permita efectuar las rotaciones correspondientes. Por esto, los estudios de control a campo deben continuar en el área de estudio, a fin de obtener más información sobre la efectividad de los fungicidas evaluados y también de otros principios activos.

Debido a la importancia económica de la producción de pera en la zona del Alto Valle, y al hecho de que la generación de conocimiento local es crucial, se planea continuar con ensayos de control de campo y análisis de sensibilidad a nivel de población de aislamientos.

## Bibliografía

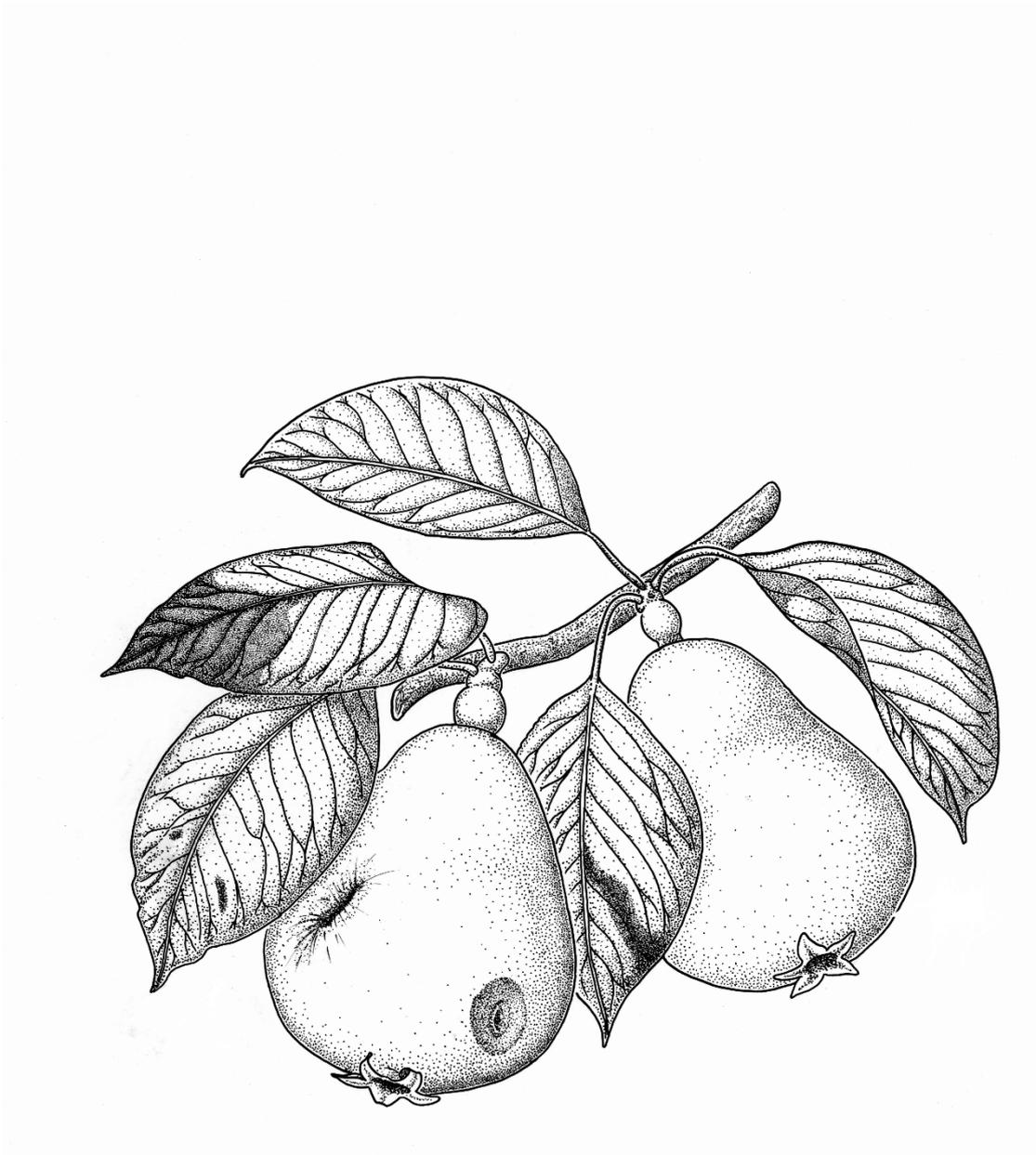
- Alberoni, G., Collina, M., Pancaldi, D., & Brunelli, A. (2005). Resistance to dicarboximide fungicides in *Stemphylium vesicarium* of Italian pear orchards. *European Journal of Plant Pathology*, 113(2), 211–219. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-2332-3>.
- Alberoni, G., Cavallini, D., Collina, M. & Brunelli, A. (2010). Characterization of the first *Stemphylium vesicarium* isolates resistant to strobilurins in Italian pear orchards. *European Journal of Plant Pathology* 126(4):453–457. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9559-3>.
- Amaro, A., Baron, D., Ono, E., & Domingos, R. (2020). Physiological effects of strobilurin and carboxamides on plants: an overview. *Acta Physiologiae Plantarum*. 42. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2991-x>.
- Anke, T. (1995). The antifungal strobilurins and their possible ecological role. *Can. J. Bot.* 73 (S1), 940–945.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest management science*, 58(7), 649–662. <https://doi.org/10.1002/ps.520>.
- Brunelli, A., Gherardi, I. & Adani, N. (1997). Reduced sensitivity of *Stemphylium vesicarium*, causal agent of pear brown spot, to dicarboximide fungicides. *Informatore Fitopatologico* 47: 44–48.
- Collina, M., Alberoni, G., & Brunelli, A. (2007). First occurrence of strobilurin-resistant isolates of *Stemphylium vesicarium* in an Italian pear orchard. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 72(4), 735–738.
- Collina, M., Gherardi, I. & Brunelli, A. (2002). Acquired resistance of *Stemphylium vesicarium* to procymidone on pear in Italy. *Acta Horticulturae*. 547-549. 10.17660/ActaHortic.2002.596.93.
- Dattatray, K.P., Abasaheb, M.M., Suresh, P.R., Vuttal, V.B., Gulab, S.S., & Schola, R. (2020). Effect of ziram on seed germination and seedling growth in mung bean. *International Journal of creative research throughs*. <https://ijcrt.org/papers/IJCRT2007468.pdf>
- FRAC. (2019). Modo de acción: Clasificación de fungicidas y bactericidas según el modo de acción, 1, 28. <http://www.dimune.com/assets/bionox.pdf>
- FRAC. (2021). FRAC Code List ©\* 2021: Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). *Fungicide Resistance Action Committee*, 17. <https://www.frac.info/docs/default->

[source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?Sfvrsn=f7ec499a\\_2](source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?Sfvrsn=f7ec499a_2)

- Edgington, L.V., Khew, K.L., Barrow, G.L., (1971). Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology* 61:42-44.
- Gordon, Elliot. (2010). Captan and Folpet. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00090-2>.
- Hochstein, P., & Cox, C.E. (1956). Studies on the fungicidal action of N-(Trichloromethylthio)-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide (captan). *American Journal of Botany*, 43, 437-441.
- Llorente, I. (1997). Development of an infection forecasting model for *Stemphylium vesicarium*. Evaluation, validation and implementation on experimental plots in commercial pear orchards. Ph.D. thesis. University of Girona, Girona.
- Llorente, I., Vilardell, P., Bugiani, R., Gherardi, I. & Montesinos, E. (2000). Evaluation of BSPcast disease warning system in reduced fungicide use programs for management of brown spot of pear. *Plant Disease* 84, 631-637. DOI: [10.1094/PDIS.2000.84.6.631](https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.6.631)
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2004). Development and field evaluation of a model to estimate the maturity of pseudothecia of *Pleospora allii* on pear. *Plant Disease* 88(2), 215-219. [10.1094/PDIS.2004.88.2.215](https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.215).
- Llorente, I. & Montesinos, E. (2006). Brown spot of pear: An emerging disease of economic importance in Europe. *Plant Disease*, 90(11), 1368–1375. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1368>
- Llorente, I., Moragrega, C., Ruz, L., & Montesinos, E. (2012). An update on control of brown spot of pear. *Trees - Structure and Function*, 26(1), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0607-1>
- Marchi, A., Folchi, A., Pratella, G. C., & Caccioni, D. (1995). In vitro relationship between dithiocarbamate residue and *Stemphylium vesicarium* infection on pear fruit. *Crop Protection*, 14(4), 321–326. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(95\)00001-3](https://doi.org/10.1016/0261-2194(95)00001-3)
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Ophir, Y., Beer, S.V. (1996). Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. *Phytopathology* 86:856–863.
- Montesinos, E. & Vilardell, P. (1992). Evaluation of FAST as a forecasting system for scheduling fungicide sprays for control of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Plant Disease* 76(12), 1221. <https://doi.org/10.1094/pd-76-1221>
- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P., Bonaterra, A., Ponti, I., Bugiani, R., Cavanni, P., & Brunelli, A. (1995). Development and evaluation of an infection model for

- Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration. *Phytopathology* 85:586-592.
- Moragrega, C., Puig, M., Ruz, L., Montesinos, E., & Llorente, I. (2018). Epidemiological features and trends of brown spot of pear disease based on the diversity of pathogen populations and climate change effects. *Phytopathology*, 108(2), 223–233. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0079-R>
  - Ponti, I., Brunelli, A., Tosi, C., Cavallini, G. & Mazzini, F. (1996). Chemical control trials on pear brown spot (*Stemphylium vesicarium*). In: *Atti Giornate Fitopatologiche 1996 vol. 2* (pp.165–172).
  - Ponti, I. & Laffi, F. (1993). *Malattie crittogamiche delle piante da frutto*, Edizioni L'Informato. Agrario: Verona, Italy.
  - Rossi, V., Patteri, E., Giosué, S., & Bugiani, R. (2005). Growth and sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology*, 111(4), 361–370. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-5273-3>
  - Stammler, G. (2008). Mode of action, biological performance and latest monitoring results of boscalid sensitivity. Abstracts of the 18<sup>th</sup> Symposium of Research Committee on Fungicide Resistance.
  - Senasa (2022). Límites máximos de residuos permitidos. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/productosveterinarios-fitosanitarios-y-fertilizantes/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal>
  - Singh, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H., & Kohmoto, K. (1999). Purification and biological characterization of host-specific SV-toxins from *Stemphylium vesicarium* causing brown spot of European pear. *Phytopathology*, 89(10), 947–953. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.10.947>
  - Tanahashi M, Okuda S, Miyazaki E, Parada RY, Ishihara A, Otani H, Osaki-Oka K, (2017). Production of host-selective SV- toxins by *Stemphylium sp.* causing brown spot of European pear in Japan. *J Phytopathol* 165(3):189–194. <https://doi.org/10.1111/jph.12549>.
  - Temperini, C.V., Tudela, M.A.A., Gimenez, G.N. et al. (2022). Brown spot of pear, an emerging disease in Argentina: identification and pathogenicity characterization of Argentinean *Stemphylium vesicarium* isolates. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02493-y>
  - Vilardell, P. (1988). *Stemphylium vesicarium* en plantaciones de peral. *Fruticultura profesional* 18, 51–55.

## Consideraciones finales y perspectivas





En esta tesis se realizó la caracterización de la enfermedad conocida como mancha marrón del peral, así como de su agente causal, *Stemphylium vesicarium*.

Se identificó morfológica y molecularmente al patógeno, constituyendo la primera identificación molecular de *S. vesicarium* sobre perales en Argentina.

Se confirmó el ciclo de vida del patógeno en el área del Alto Valle. Se logró caracterizar la formación y evolución de sus estructuras invernantes en los restos vegetales de peral. Los pseudotecios se desarrollan en hojas durante el invierno, beneficiados por las temperaturas bajas y la humedad alta. A partir de los meses de octubre y noviembre existe una cantidad considerable de ascosporas maduras. Las ascosporas se encuentran disponibles hasta la época de cosecha y el período posterior a la misma.

Se verificó la formación de inóculo sexual y asexual sobre restos herbáceos. Las malezas muertas presentes en el suelo del monte frutal podrían constituir una importante fuente de inóculo.

Se realizó un seguimiento del desarrollo de la enfermedad por cuatro años, logrando determinar que la intensidad de precipitación y el número de horas de hoja mojada son los parámetros que más influyen en el desarrollo de la enfermedad.

De los monitoreos realizados en campos de perales, se puede concluir que las variedades más afectadas fueron Abate Fetel y D'Anjou, presentándose en ellas síntomas a nivel de fruto y de hoja, desarrollando estas últimas la típica mancha en forma de "V". En árboles de la variedad Packham's, menos sensible que las dos anteriores, se vieron afectados los frutos y en muy baja proporción sus hojas. Mientras que en Williams prácticamente no se registraron síntomas.

En los ensayos *in vitro* se demostró que las principales variedades de peral cultivadas en Argentina presentan diferentes susceptibilidades a la enfermedad. La principal variedad cultivada en la zona, Williams, es poco sensible a la enfermedad, Packham's es medianamente sensible, mientras que D'Anjou y Abate Fetel son muy sensibles. Además, se verificó que la edad de los tejidos vegetales tiene influencia sobre la susceptibilidad, siendo los estadios de fruto más pequeño, los más susceptibles, así como las hojas jóvenes de los brotes en crecimiento. Sin embargo, las variedades que son sensibles pueden ser afectadas por la enfermedad en cualquier momento de su desarrollo.

Se lograron seleccionar tres fungicidas para el manejo de la enfermedad: Bellis®, Ziram®, y Merpan®, así como también, confirmar que el uso preventivo de los mismos es el más eficiente.

Se determinó que los aislamientos locales podrían producir las toxinas hospedador específico, causantes de la necrosis venosa que da a la enfermedad el síntoma característico.

Los bioensayos de toxicidad indicaron la posible producción de compuestos tóxicos.

*Stemphylium vesicarium* presenta su máximo crecimiento en el rango de 25-30 °C. Temperaturas elevadas resultan limitantes, ya que a los 37 °C el crecimiento se detuvo. A temperatura de conservación en postcosecha (0 °C), el hongo es capaz de crecer, aunque con un avance más lento. La actividad de agua ( $a_w$ ) que posibilita el óptimo desarrollo de *S. vesicarium* es de 0,99. A medida que se disminuye el valor de  $a_w$  el crecimiento disminuye, pero no se detiene hasta 0,88.

Se verificó que el medio de cultivo agar V8 fue el mejor para la producción de inóculo del patógeno, ya que la producción de conidios fue la más abundante. El segundo mejor medio de cultivo AA, en el cual la esporulación también resultó muy abundante, constituyendo una alternativa adecuada. El medio de cultivo basado en el sustrato natural (pulpa de pera), así como PZA y PDA, no se consideran aptos para producir conidios en cantidades suficientes.

Considerando que es muy importante adoptar medidas preventivas de control para lograr un manejo adecuado de la mancha marrón del peral, se continuará con el análisis de registros climatológicos y con el monitoreo de la enfermedad, a fin de lograr la validación o adaptación del modelo BSPcast a nivel local, o el desarrollo de un modelo predictivo propio.

Estudios futuros podrían evaluar el efecto de la aplicación de formulados de *Trichoderma* para el control del inóculo primario de la enfermedad, además de la evaluación del uso de otros compuestos orgánicos y de síntesis para el manejo de la enfermedad.

Se trabajará en confirmar de la producción de las toxinas SV por los aislamientos locales, así como la determinación de otros metabolitos secundarios, con el fin de establecer el potencial fitotóxico del patógeno y el riesgo que los metabolitos podrían representar para la salud humana.

## Publicación de Resultados

### Presentaciones a congresos nacionales e internacionales

-**Tudela M.A.A.**, Benazzi L., Pose G.N., Di Masi, S.N. Reporte de *Stemphylium vesicarium*, agente causal de la mancha negra en perales. Congreso Argentino de Microbiología (CAMAYA 2018). Póster C39, pág. 389. Disponible en: <https://sites.google.com/view/camaya2018/programa/libro-de-res%C3%BAmenes>

-Temperini C., **Tudela, M.A.A.**, Di Masi S.N., Pose G.N. Fitotoxicidad de aislamientos de *Stemphylium vesicarium* obtenidos desde ambientes rurales y cultivos de la región del Alto Valle de Río Negro. Congreso Argentino de Microbiología (CAM 2019). Resumen VI 109, pág. 295. Disponible en: <https://rid.unrn.edu.ar/handle/20.500.12049/5751>

-**Tudela M.A.A.**, Di Masi SN, Pose GN. Evolución de las estructuras invernantes de *Pleospora herbarum*, fase sexual de *Stemphylium vesicarium*, en perales del Alto Valle de Río Negro, Argentina. V Congreso Argentino de Fitopatología (CAF 2021). <https://drive.google.com/file/d/1J8OmiWSCjgd13-MQfTtTxK7U85nijiaO/view>.

-**Tudela M.A.A.**, Di Masi SN, Pose GN. Evaluación de malezas como fuente de inóculo de la Mancha marrón del peral. III Reunión Argentina de Micología (2022).

### Publicaciones en revistas con referato internacional

-**Tudela, M.A.A.**, Di Masi; Giménez G.N., Di Masi, S.N., Pose, G.N., Basanta, M.E. (2023). Susceptibility of South American pear cultivars to brown spot of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. Journal of Plant Diseases and Protection. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00783-z>.

-Temperini C.V., **Tudela M.A.A.**, Giménez G.N. et al. (2021). Brown spot of pear, an emerging disease in Argentina: identification and pathogenicity characterization of Argentinean *Stemphylium vesicarium* isolates. European Journal of Plant Pathology. <https://doi.org/10.1007/s10658-022-02493-y>

-**Tudela M.A.A.**, Lutz M.C., Giménez G.N., Del Brío D., Di Masi S.N., Pose G.N., Molina J.P.E. (2023). Efficacy of fungicides against brown spot of pear in Argentina. Crop Protection Journal.

## Otras publicaciones

-**Tudela, M.A.A.**, Di Masi, S.N. 2022. La mancha marrón del peral. Boletín Sanitario N° 7. INTA Alto Valle. <https://inta.gob.ar/documentos/presencia-de-la-enfermedad-mancha-marron-del-peral>.

-**Tudela, M.A.A.**, Di Masi, S.N., Lago, Jonatan. 2023. Balance fitosanitario: enfermedades de relevancia temporada 2022-2023. Revista Fruticultura y Diversificación N.º 93. INTA Ediciones

## Anexos



## Anexo I: Composición de medios de cultivo y soluciones

### Medios de cultivo

---

<b>Agar Agua (AA)</b>	
Agar agar Merk®	20 g
Agua destilada	1 L

---

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

---

---

<b>Agar Papa Dextrosa (PDA)</b>	
Agar papa glucosado Merk®	39 g
Agua destilada	1 L

---

Preparación: 39 g de polvo por litro de agua. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. El pH final es de 5,6.

---

---

<b>Agar Papa Zanahoria (PZA)</b>	
Papa	20 g
Zanahoria	20 g
Agar agar Merk®	20 g
Agua destilada	1 L

---

Preparación: Cortar los vegetales sin pelar y hervirlos en 0,5 L de agua destilada durante 20-30 min. Filtrar y llevar a volumen final de 1 L. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

---

---

**Agar V8 (V8)**

---

Jugo V8 Campbell's	200 mL
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Agar agar Merk®	20 g
Agua destilada	1 L

---

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

---

---

**Agar Pulpa de pera (APP)**

---

Pulpa de pera	200 g
Agar agar Merk®	20 g
Agua destilada	1 L

---

Preparación: Pelar y procesar la pulpa de pera. Agregar el agar y llevar a volumen final de 1 L. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

---

---

**Agar Diclorán Cloranfenicol Peptona (DCPA)**

---

Peptona	15 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Cloranfenicol	0,1 g
Diclorán 0,1% solución en etanol	1 mL
Agar agar Merk®	15 g
Agua destilada	1 L

---

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

---

---

**Medio Sacarosa Diclorán (DRYES)**

---

Sacarosa	150 g
Diclorán 0,2% solución en etanol	1 mL
Cloranfenicol	0,1 g
Rosa de bengala (5% p/v)	0,5 mL
Extracto de levadura	20 g
Agar agar Merk®	15 g
Agua destilada	1 L
Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. El pH final es de 5,6.	

---

---

**Medio Extracto de levadura Sacarosa (YES)**

---

Sacarosa	15 g
Extracto de levadura	2 g
Agua destilada	1 L
Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.	

---

---

**Medio Richard's modificado**

---

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g
KNO <sub>3</sub>	10 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,5 g
FeCl <sub>3</sub>	0,02 g
Glucosa	25 g
Extracto de levadura	1 g
Agua destilada	1 L
Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.	

---

## Soluciones

---

<b>Buffer TBE (5X)</b>	
Ácido bórico	27,5 g
Tris-Base	54 g
EDTA 0,5 M (Ph8)	20 mL
Agua destilada	980mL

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Almacenar en frasco color caramelo a temperatura ambiente y diluir con agua destilada para obtener la solución 0,5X.

---

---

<b>EDTA 0,5M (pH 8)</b>	
EDTA.2H <sub>2</sub> O	186,1 g
Agua destilada	1 L

Disolver la sal en 800 mL de agua destilada y ajustar el volumen con granallas de NaOH a pH 8. Luego completar a volumen de 1 L.

---

---

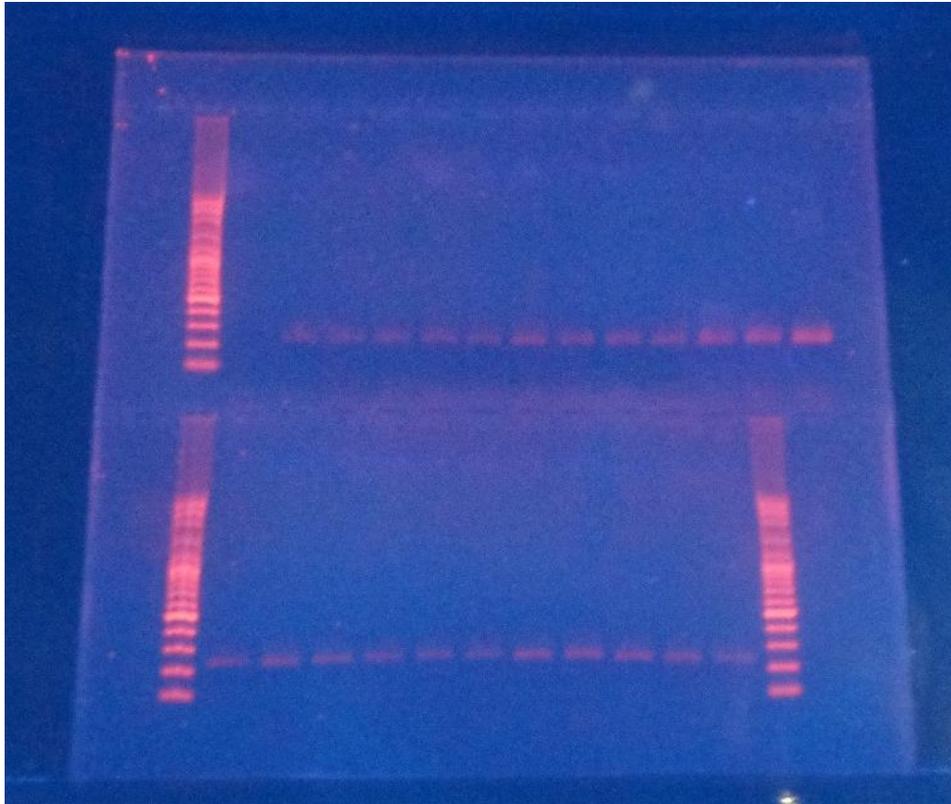
<b>Buffer de carga Sacarosa Azul de Bromofenol (6X)</b>	
Sacarosa	4 g
Azul de Bromofenol	0,025 g
Agua destilada	10 mL

Diluir los componentes en agua destilada y filtrar con papel de filtro Whatman N° 1. Conservar a 4 °C.

---

## Anexo II: Geles, secuencias de genes y cromatogramas

### Gel



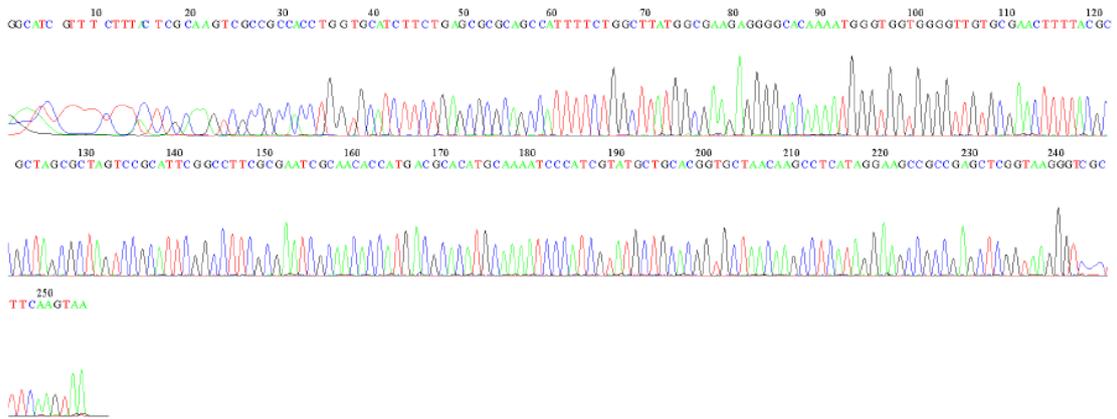
Corrida electroforética de los fragmentos amplificados del gen de EF1  $\alpha$  por PCR de aislamientos de *Stemphylium vesicarium*. Peine superior: marcador ladder de 100 bp; control negativo; muestras SF4, SF5, SF8, SF9, SF13, SF14, SF19, SF20, SF21, SF22, SF23, y SF24. Peine inferior, Marcador ladder de 100 bp; Muestras SL22, SL35, SL27, SL39, SL40, SL61, SL62, SL63, SL65, SL68, SL70; y marcador ladder de 100 bp.

Secuencias de EF1  $\alpha$

***Stemphylium vesicarium*-Aislamiento SF4**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCCA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCGCTTCAAGTAA

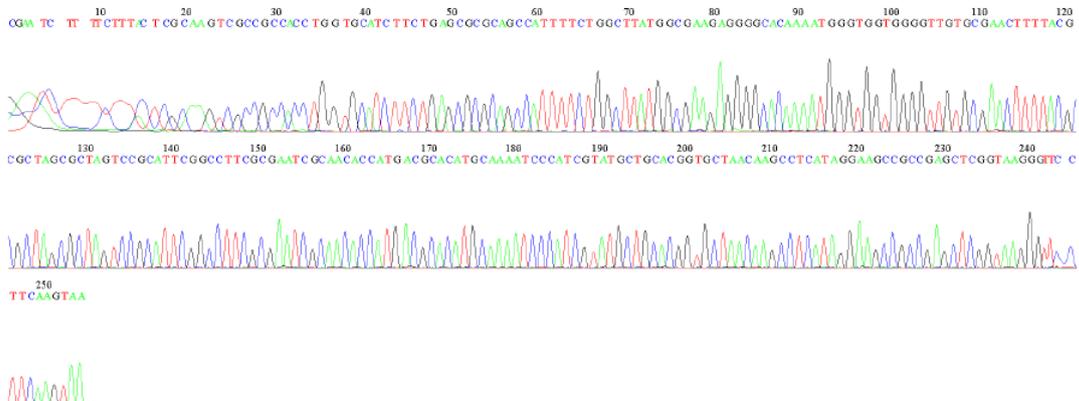
File: S4\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:2574 A:3607 C:5879 T:3349  
Sample: S4\_EF1-728F Lane: 15 Base spacing: 14.852185 255 bases in 3137 scans Page 1 of 1



***Stemphylium vesicarium* - Aislamiento SF5**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCCA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTAA

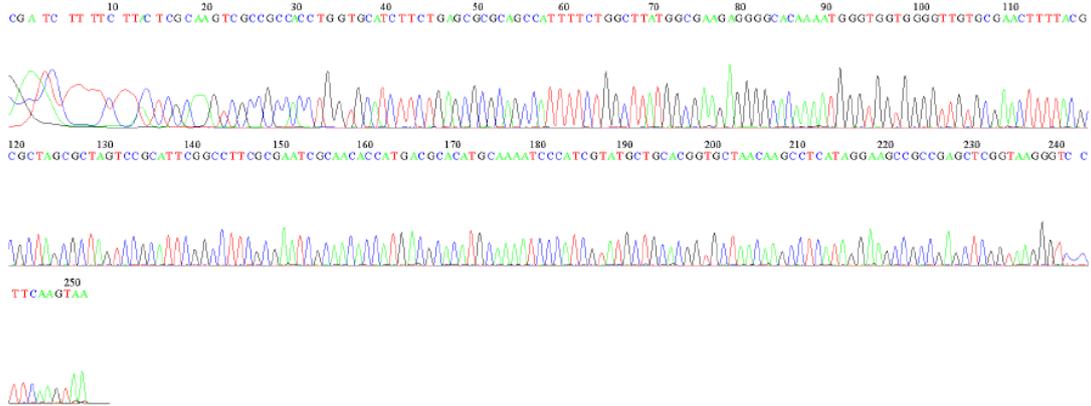
File: S5\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:1466 A:2053 C:2922 T:1606  
Sample: S5\_EF1-728F Lane: 13 Base spacing: 14.784522 255 bases in 3139 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SF8**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCCTTCGGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTCCCTTCAAGTAA

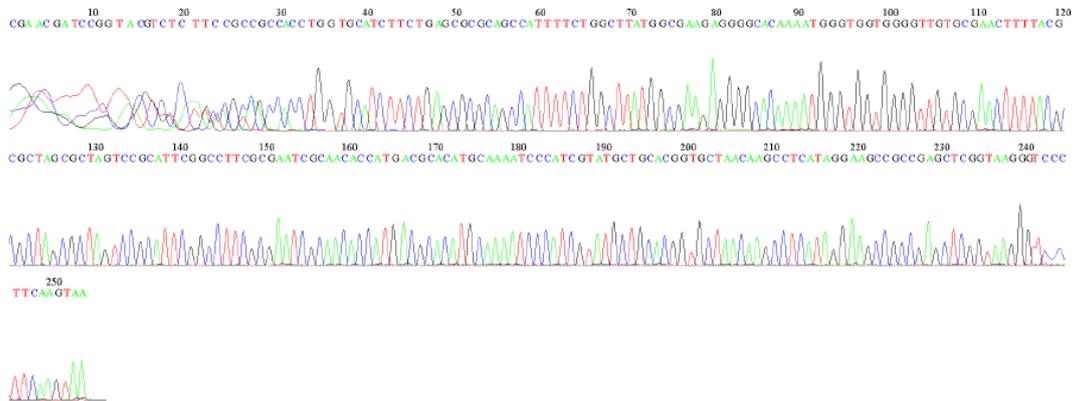
File: S8\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:2540 A:3464 C:5449 T:2800  
Sample: S8\_EF1-728F Lane: 11 Base spacing: 14.858639 252 bases in 3140 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SF9**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCCTTCGGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTCCCTTCAAGTAA

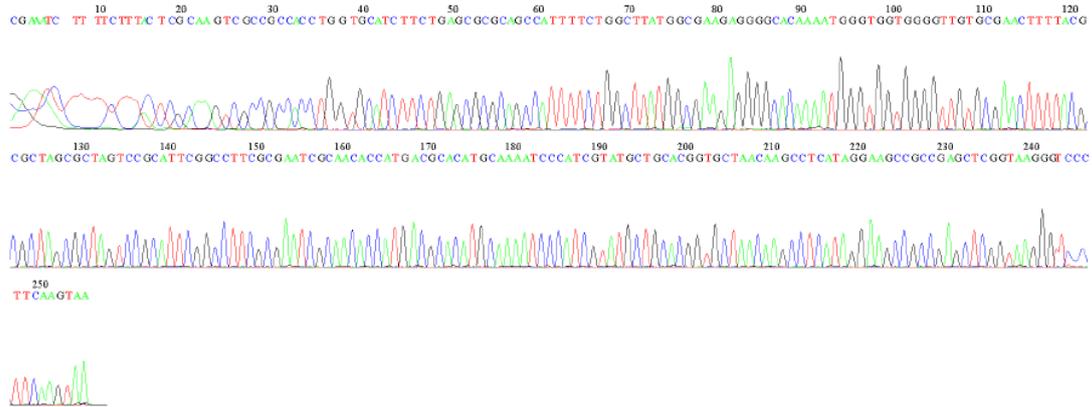
File: S9\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:2088 A:2887 C:4405 T:2534  
Sample: S9\_EF1-728F Lane: 9 Base spacing: 14.819865 254 bases in 3138 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SF13**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGTCCTTCAAGTAA

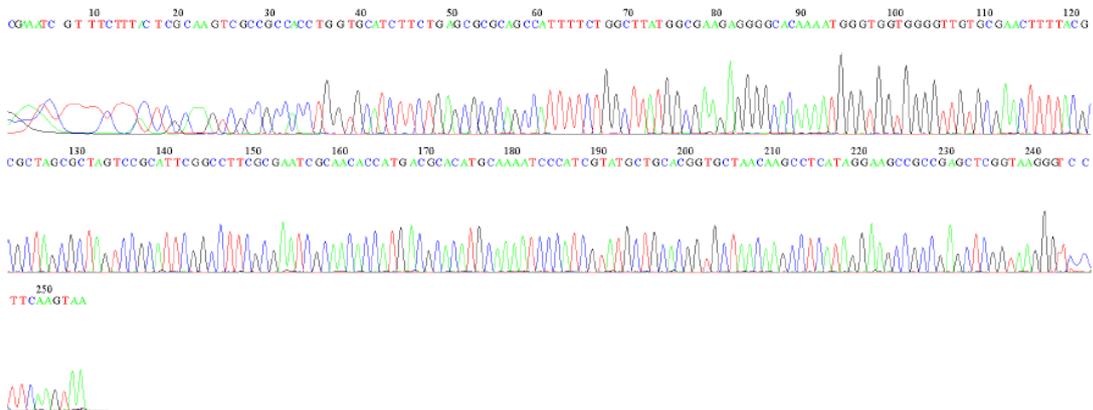
File: S13\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:1495 A:2265 C:3640 T:1806  
Sample: S13\_EF1-728F Lane: 7 Base spacing: 14.959701 256 bases in 3135 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SF19**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTCCCTTCAAGTAA

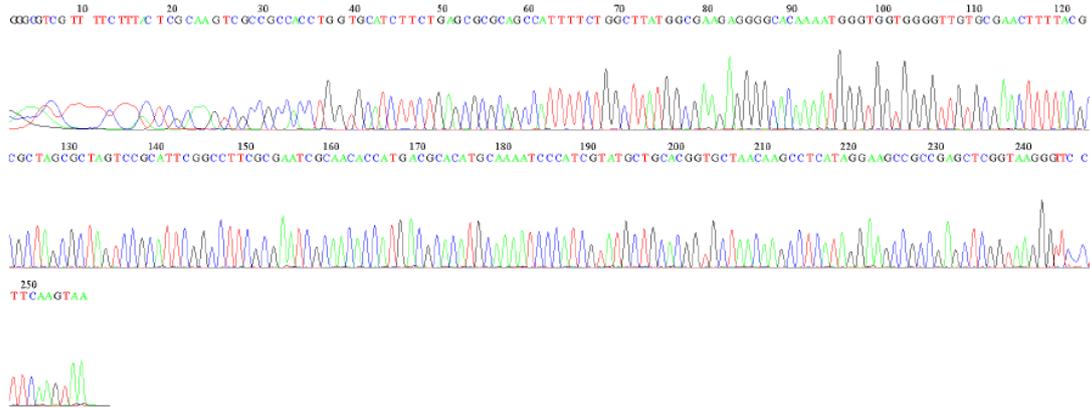
File: S19\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:2098 A:2769 C:4170 T:2491  
Sample: S19\_EF1-728F Lane: 3 Base spacing: 15.066923 255 bases in 3139 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SF20**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTAA

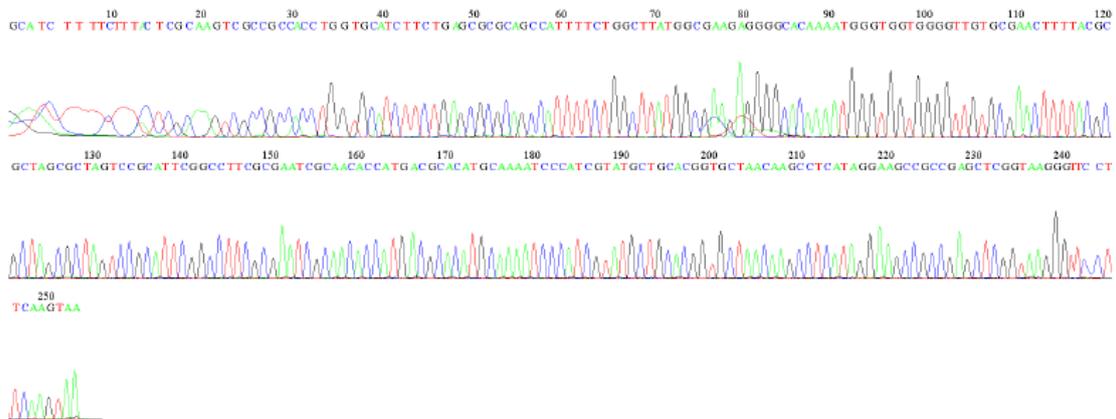
File: S20\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:1264 A:1741 C:2570 T:1519  
Sample: S20\_EF1-728F Lane: 1 Base spacing: 15.108931 257 bases in 3139 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SF21**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTAA

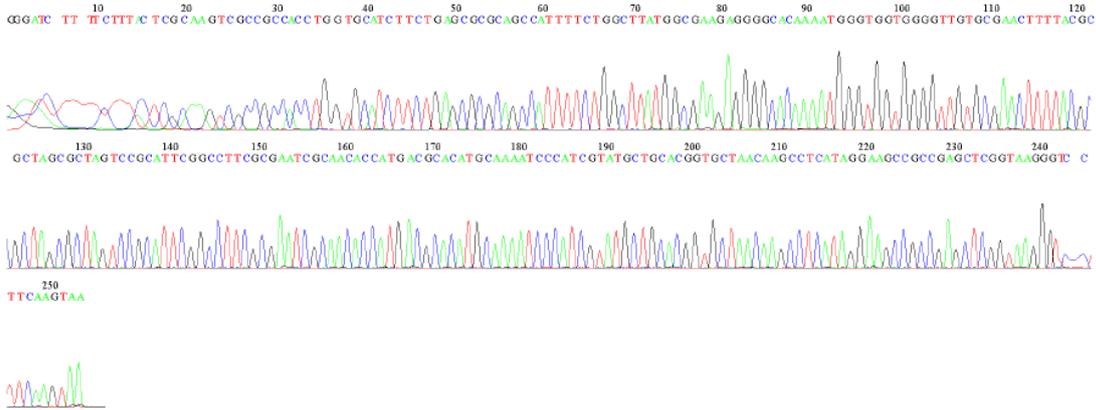
File: S21\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:1095 A:1603 C:3074 T:1308  
Sample: S21\_EF1-728F Lane: 16 Base spacing: 15.004484 254 bases in 3126 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL22**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTTCGGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTCCTTCAAGTAA

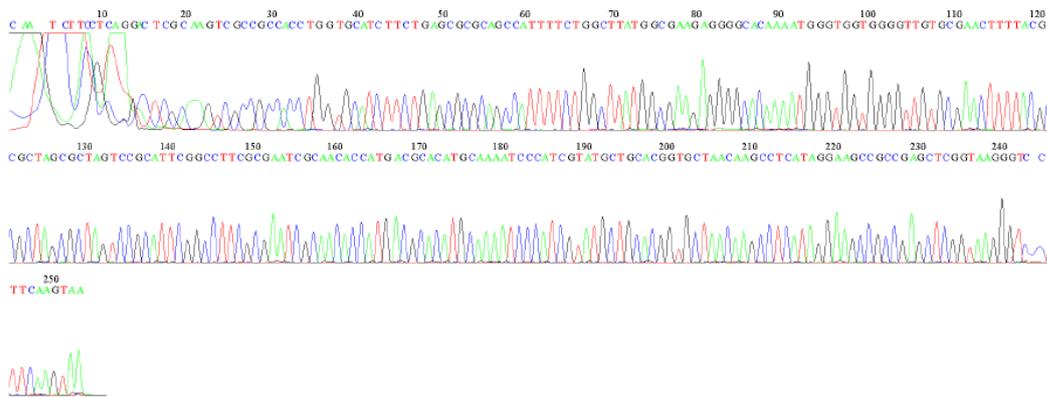
File: S22\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:2877 A:4235 C:6221 T:3393  
Sample: S22\_EF1-728F Lane: 14 Base spacing: 14.816434 254 bases in 3136 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SF23**

GTCGCCGCCACCTGGTGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGG  
GTGGTGGGGTTGTGCGAACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTTCGGCCTTCGCGAATCGCAACACCATCGA  
CGCACATGCAAATCCCATCGTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGG  
GTCCTTCAAGTAA

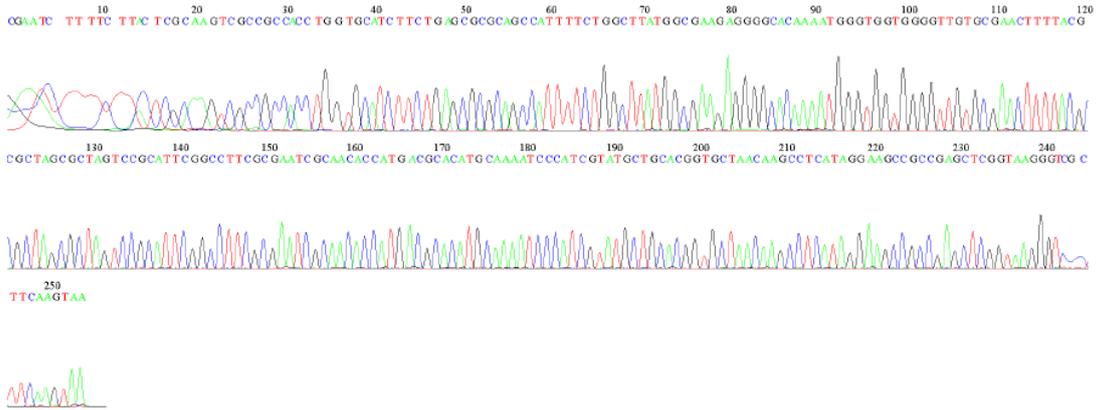
File: S23\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:2290 A:3352 C:4612 T:2523  
Sample: S23\_EF1-728F Lane: 12 Base spacing: 14.843382 254 bases in 3140 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SF24**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTGGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCGTTCAAGTAA

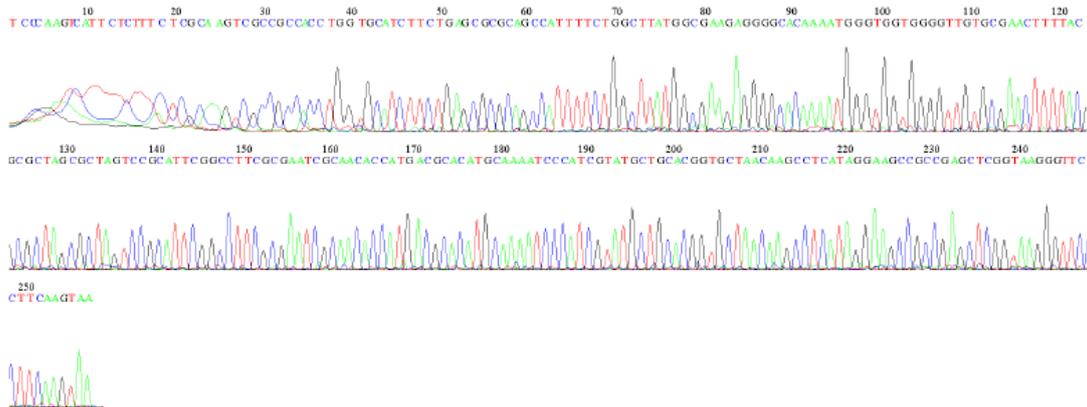
File: S24\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2018/5/21 19:39:15 Signal G:2758 A:4130 C:6681 T:3311  
Sample: S24\_EF1-728F Lane: 10 Base spacing: 14.892696 254 bases in 3137 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL35**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTGGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTAA

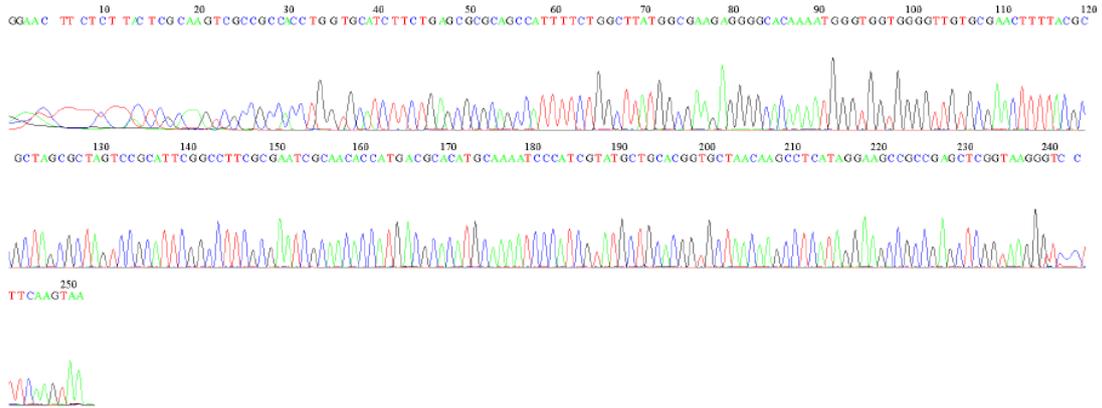
File: S35\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2020/6/16 0:4:21 Signal G:614 A:447 C:691 T:482  
Sample: S35\_EF1-728F Lane: 15 Base spacing: 14.49229 258 bases in 3131 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL37**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTCCTTCAAGTAA

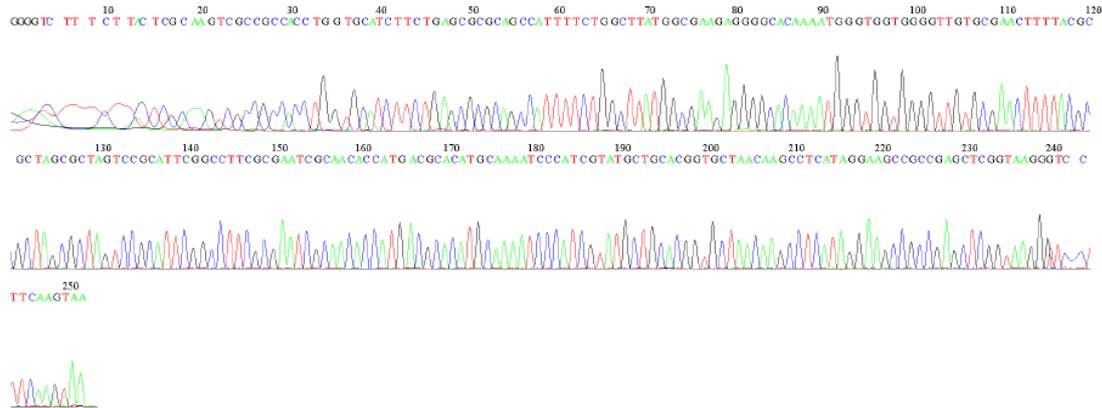
File: S37\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2020/6/16 0:4:21 Signal G:5752 A:4618 C:7341 T:5108  
Sample: S37\_EF1-728F Lane: 11 Base spacing: 14.314365 252 bases in 3119 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL39**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTCCTTCAAGTAA

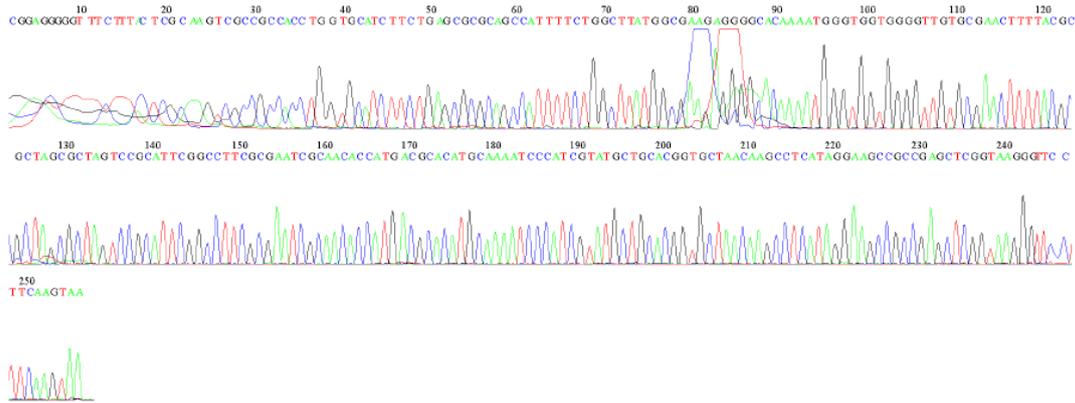
File: S39\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2020/6/16 0:4:21 Signal G:5153 A:4424 C:7230 T:5361  
Sample: S39\_EF1-728F Lane: 7 Base spacing: 14.387768 252 bases in 3120 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL40**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTAA

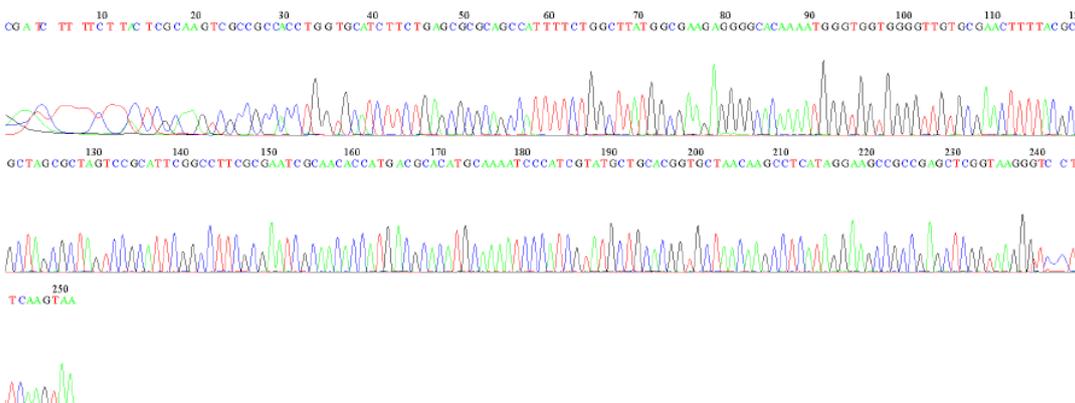
File: S40\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2020/6/16 0:4:21 Signal G:2755 A:2420 C:4794 T:3531  
Sample: S40\_EF1-728F Lane: 5 Base spacing: 14.438709 257 bases in 3120 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL61**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTAA

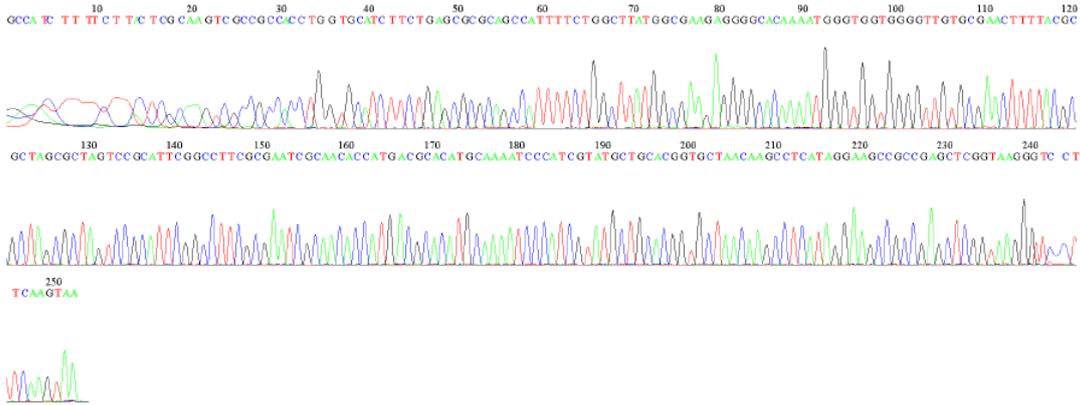
File: S61\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2020/6/16 0:4:21 Signal G:5448 A:4805 C:8132 T:5741  
Sample: S61\_EF1-728F Lane: 3 Base spacing: 14.597369 252 bases in 3113 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL62**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTCCTTCAAGTAA

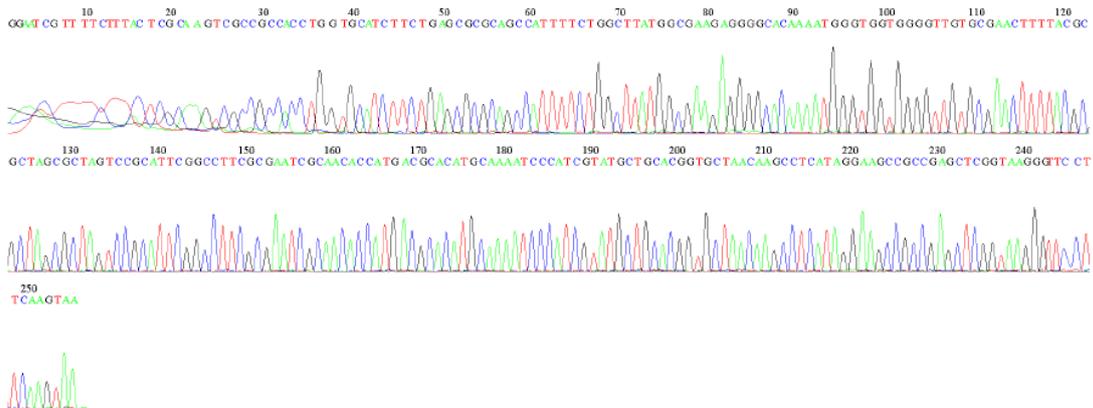
File: S62\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2020/6/16 0:4:21 Signal G:3943 A:3164 C:5771 T:3626  
Sample: S62\_EF1-728F Lane: 1 Base spacing: 14.74402 253 bases in 3115 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL63**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTCCTTCAAGTAA

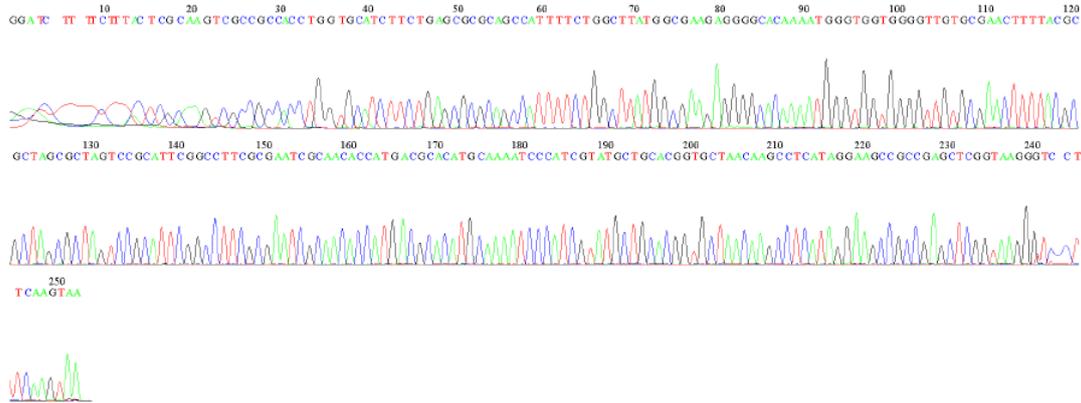
File: S63\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2020/6/16 0:4:21 Signal G:2560 A:2021 C:3014 T:2180  
Sample: S63\_EF1-728F Lane: 16 Base spacing: 14.322972 256 bases in 3112 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL65**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTCTTCAAGTAA

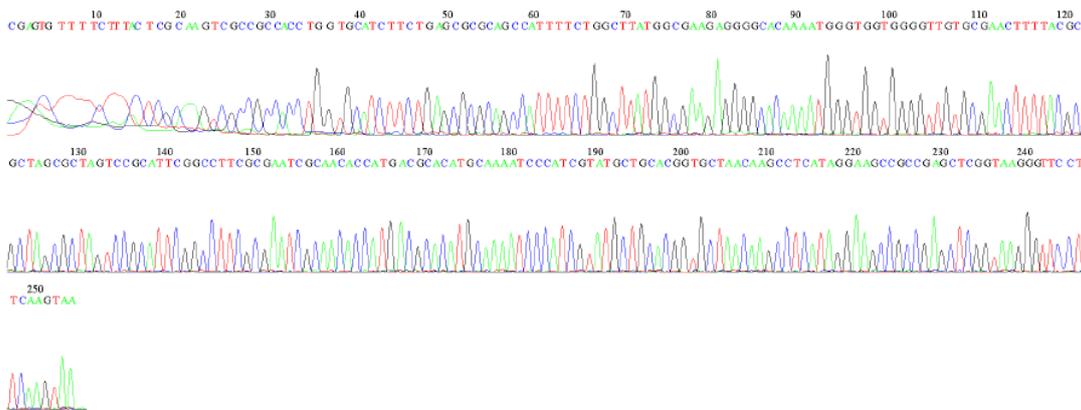
File: S65\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2020/6/16 0:4:21 Signal G:4889 A:3858 C:6358 T:4230  
Sample: S65\_EF1-728F Lane: 14 Base spacing: 14.358308 253 bases in 3115 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL68**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTCCGGCCTTCGCGAATCGCAACACCATGACGCACATGCAAAAATCCCAT  
TATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTCTTCAAGTAA

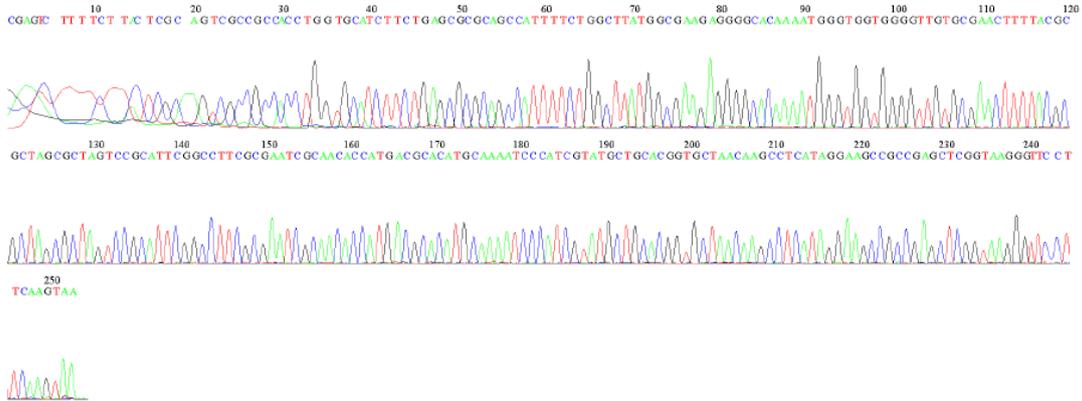
File: S68\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2020/6/16 0:4:21 Signal G:1801 A:1326 C:2232 T:1403  
Sample: S68\_EF1-728F Lane: 12 Base spacing: 14.238698 255 bases in 3111 scans Page 1 of 1



**Stemphylium vesicarium - Aislamiento SL70**

TGCATCTTCTGAGCGCGCAGCCATTTTCTGGCTTATGGCGAAGAGGGGCACAAAATGGGTGGTGGGGTTGTGCGA  
ACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCGCATTTCGGCCTTCGCGAATCGCAACCCATGACGCACATGCAAAAATCCCATC  
GTATGCTGCACGGTGCTAACAAGCCTCATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTAA

File: S70\_EF1-728F.ab1 Run Ended: 2020/6/16 0:4:21 Signal G:2431 A:2070 C:3379 T:2139  
Sample: S70\_EF1-728F Lane: 10 Base spacing: 14.242323 253 bases in 3113 scans Page 1 of 1



### Anexo III: Tablas de resultados

Tabla 1: Patogenicidad de los aislamientos sobre las hojas de las cuatro variedades de pera, inoculadas con suspensiones conidiales ajustadas a  $1 \times 10^5$ . Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

Aislamiento	Cultivares											
	Williams		Packham's		D'Anjou		Abate Fetel					
	Manchas/cm <sup>2</sup>	% Área	Manchas/cm <sup>2</sup>	% Área	Manchas/cm <sup>2</sup>	% Área	Manchas/cm <sup>2</sup>	% Área				
SF4	0	0,00± 0,00	f	0	0,00± 0,00	f	2,1	25,33 ±5,51	b	2,2	26,23 ± 0,85	b
SF5	0,3	0,02± 0,01	f	0	0,00± 0,00	f	0,9	3,25± 0,23	e	0,5	2,97± 0,97	e
SF8	0,3	0,11± 0,32	f	0,2	0,05± 0,14	f	2	3,36± 2,88	e	1,8	3,51± 1,55	e
SF9	0	0,00± 0,00	f	0	0,00± 0,00	f	3,1	27,50 ±2,41	b	0,6	25,33 ±0,76	b
SF13	0	0,00± 0,00	f	0	0,00± 0,00	f	3,7	29,24 ±0,71	b	3,1	26,63 ±1,18	b
SF19	0	0,00± 0,00	f	0	0,00± 0,00	f	2,5	28,07 ±0,90	b	2,4	27,37 ±0,80	b
SF20	0,4	0,11± 0,22	f	0,1	0,03± 0,08	f	1,6	1,43± 1,32	f	1,1	2,68± 0,89	e
SF21	0,2	0,09± 0,05	f	0	0,00± 0,00	f	2,9	15,23 ±0,87	c	1,9	10,83 ±1,52	d
SL22	0,1	0,02± 0,06	f	0,6	0,25± 0,38	f	0,7	3,28± 1,97	e	0,4	2,35± 0,97	e
SF23	0,3	0,08± 0,24	f	0,4	0,14± 0,32	f	2,4	8,17± 3,42	d	3,4	9,14± 5,23	d
SF24	0	0,00± 0,00	f	0	0,00± 0,00	f	3,1	30,77 ±1,32	a	2,5	26,10 ±0,60	b
SL35	0	0,00± 0,00	f	0,1	0,08± 0,01	f	2,9	26,40 ±0,70	b	2,6	23,10 ±0,79	b
SL37	0	0,00± 0,00	f	0,1	0,00± 0,00	f	2,1	26,33 ±2,08	b	2	28,43 ±1,65	b
SL39	0	0,00± 0,00	f	0,5	0,00± 0,00	f	3,3	31,60 ±1,45	a	3,7	35,67 ±3,35	a
SL40	0	0,00± 0,00	f	0,1	0,00± 0,00	f	1,2	20,57 ±7,81	b	1,8	16,23 ±0,75	c
SL61	0	0,00± 0,00	f	0,1	0,11± 0,16	f	1,5	26,30 ±1,20	b	1,8	26,53 ±1,37	b
SL62	0,2	0,37± 0,35	f	0,5	0,00± 0,00	f	1,8	6,20± 3,90	e	1,9	3,74± 1,84	e
SL63	0	0,00± 0,00	f	0,3	0,00± 0,00	f	3,2	31,43 ±1,16	a	2,9	31,93 ±2,29	a
SL65	0	0,00± 0,00	f	0	0,00± 0,00	f	0,9	4,67± 0,57	e	0,3	4,10± 0,36	e
SL68	0,1	0,02± 0,05	f	0,1	0,21± 0,06	f	2,3	28,13 ±1,42	b	1,3	26,23 ±0,93	b

<b>SL70</b>	0,2	0,25± 0,30	<b>f</b>	0,2	0,07± 0,20	<b>f</b>	1,1	6,51± 6,23	<b>e</b>	0,4	4,75± 4,56	<b>e</b>
<b>Promedio por cultivar</b>	<b>0,1</b>	<b>0,09</b> ±		<b>0,15</b>	<b>0,06</b> ±		<b>2,15</b>	<b>13,38</b> ±		<b>1,83</b>	<b>12,6</b> ±	
		<b>0,22</b>			<b>0,18</b>			<b>11,64</b>			<b>11,41</b>	

Tabla 2: Toxicidad de los extractos crudos de los aislamientos sobre las hojas de los cultivares Williams, Packham's, D'Anjou y Abate Fetel. Los resultados se expresan como porcentaje de área foliar afectada por necrosis. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí según el test de Tukey.

Aislamiento	Cultivares											
	Williams			Packham's			D'Anjou			Abate Fetel		
	% Área afectada			% Área afectada			% Área afectada			% Área afectada		
<b>SF4</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	17,70±2,72	<b>a</b>	9,38±6,01	<b>b</b>				
<b>SF5</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	5,17±0,25	<b>c</b>	6,59±2,45	<b>c</b>				
<b>SF8</b>	1,66±1,00	<b>d</b>	3,52±3,21	<b>c</b>	5,79±1,54	<b>c</b>	9,18±2,49	<b>b</b>				
<b>SF9</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	5,01±0,48	<b>c</b>	5,23±2,14	<b>c</b>				
<b>SF13</b>	0,0±0,1	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	7,86±2,55	<b>b</b>	5,08±0,77	<b>c</b>				
<b>SF19</b>	0,0±0,2	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	11,60±2,31	<b>a</b>	12,99±9,87	<b>a</b>				
<b>SF20</b>	1,25±1,77	<b>d</b>	1,18±0,44	<b>d</b>	9,72±1,27	<b>b</b>	13,22±3,92	<b>a</b>				
<b>SF21</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	6,41±0,96	<b>c</b>	5,34±1,01	<b>c</b>				
<b>SL22</b>	1,03±0,46	<b>d</b>	5,67±4,12	<b>c</b>	9,85±2,04	<b>b</b>	13,97±7,66	<b>a</b>				
<b>SF23</b>	1,84±1,30	<b>d</b>	2,32±1,04	<b>d</b>	12,55±3,66	<b>a</b>	9,13±1,54	<b>b</b>				
<b>SF24</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	5,23±1,53	<b>c</b>	5,52±2,13	<b>c</b>				
<b>SL35</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	5,20±1,10	<b>c</b>	5,33±1,37	<b>c</b>				
<b>SL37</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	9,00±4,09	<b>b</b>	5,14±0,7	<b>c</b>				
<b>SL39</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	5,50±1,57	<b>c</b>	5,06±1,29	<b>c</b>				
<b>SL40</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	7,87±3,90	<b>b</b>	5,26±0,87	<b>c</b>				
<b>SL61</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	6,57±2,41	<b>c</b>	6,00±0,17	<b>c</b>				
<b>SL62</b>	1,73±1,11	<b>d</b>	1,66±0,56	<b>d</b>	6,93±1,72	<b>c</b>	7,56±0,93	<b>b</b>				
<b>SL63</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	14,20±1,71	<b>a</b>	7,75±7,68	<b>b</b>				
<b>SL65</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	5,20±0,56	<b>c</b>	5,20±0,23	<b>c</b>				

<b>SL68</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	0,0±0,0	<b>d</b>	9,53±3,76	<b>b</b>	9,07±4,07	<b>b</b>
<b>SL70</b>	1,20±0,3 6	<b>d</b>	3,99±1,78	<b>c</b>	5,51±1,35	<b>c</b>	9,66±4,39	<b>b</b>
<b>Promedio por cultivar</b>	<b>0,79±1,0 8</b>		<b>1,68±2,52</b>		<b>8,24±3,69</b>		<b>8,70±4,70</b>	

#### Anexo IV: Datos climatológicos

La información sobre los resúmenes mensuales de los parámetros meteorológicos pertenecientes a la Estación Meteorológica de la EEA Alto Valle de INTA (Contralmirante Guerrico) se encuentra disponibles en las siguientes direcciones electrónicas:

##### Año 2017

[https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2017/completo\\_2017.pdf](https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2017/completo_2017.pdf)

##### Año 2018

[https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2018/completo\\_2018.pdf](https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2018/completo_2018.pdf)

##### Año 2019

[https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2019/completo\\_2019.pdf](https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2019/completo_2019.pdf)

##### Año 2020

[https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2020/completo\\_2020.pdf](https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2020/completo_2020.pdf)

##### Año 2021

[https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2021/completo\\_2021.pdf](https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2021/completo_2021.pdf)

##### Año 2022

[https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2022/completo\\_2022.pdf](https://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/10/resumen/2022/completo_2022.pdf)