

**DINÁMICA DE *Diaporthe caulivora* EN FUENTES DE INÓCULO:
RASTROJOS Y MALEZAS, Y PERÍODOS DE PROTECCIÓN
FRENTE AL CANCRO DEL TALLO DE SOJA**

Germán Schlie

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al título
de **MAGISTER SCIENTAE EN PRODUCCIÓN VEGETAL**

Orientación: Fitopatología

Área Ciencias de las Plantas y Recursos Naturales

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DE PLATA

**Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP –
Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA**

Octubre, 2017

**DINÁMICA DE *Diaporthe caulivora* EN FUENTES DE INÓCULO:
RASTROJOS Y MALEZAS, Y PERÍODOS DE PROTECCIÓN
FRENTE AL CANCRO DEL TALLO DE SOJA**

Germán Schlie

Directora: Dra. Azucena del Carmen Ridao

Asesora: Lic. Biol. Marina Rosa Alejandra Montoya (M. Sc.)

Asesora: Dr. Facundo Quiroz

**DINÁMICA DE *Diaporthe caulivora* EN FUENTES DE INÓCULO:
RASTROJOS Y MALEZAS, Y PERÍODOS DE PROTECCIÓN
FRENTE AL CANCRO DEL TALLO DE SOJA**

Germán Schlie

Aprobada por:

Evaluador: Pedro A. Balatti

Evaluador: Antonio J. G. Ivancovich

Evaluador: Maria Eugenia Bazzalo

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, Gilda y Jorge por el apoyo y la motivación constante que me dieron durante esta etapa.

A mi directora de tesis, Azucena Ridaó, que me orientó y aconsejó, poniendo a mi disposición toda su capacidad académica y humana.

A mis asesores, Marina Montoya y Facundo Quiroz por su tiempo, buena voluntad y optimismo en todo el proceso de gestación de la tesis.

A mis amigos, María Clara, Joaquín, Francisco y Mauro por la incansable ayuda y excelente predisposición hacia este trabajo.

A Verónica Ispizúa, quien me ayudó y brindó sus conocimientos y tiempo en momentos claves de este trabajo.

A todo el grupo de patología vegetal, Julia, Eva, Caro, Carla, Nacho, Silvio y Choco por su calidez humana y amistad.

A mis amigos del casino dormitorio por su amistad, compañerismo y hacer que la lejanía de casa no se sintiera tanto.

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
INTRODUCCIÓN.....	1-4
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	5
CAPÍTULO 1. Dinámica del rastrojo de soja como fuente de inóculo de <i>Diaporthe caulivora</i>	6-30
1. Introducción.....	6-8
2. Materiales y métodos.....	9-15
Identificación mediante PCR-RFL de aislamientos de <i>Diaporthe/Phomopsis</i> obtenidos de los rastrojos.....	12-15
3. Resultados.....	16-25
Identificación mediante PCR-RFL de aislamientos de <i>Diaporthe/Phomopsis</i> obtenidos de los rastrojos.....	21-25
4. Discusión.....	26-29
5. Conclusiones.....	30
CAPÍTULO 2. Malezas invernales como fuente de inóculo de <i>Diaporthe caulivora</i>	31-42
1. Introducción.....	31-32
2. Materiales y métodos.....	33-37
3. Resultados.....	38-39
4. Discusión.....	40-41
5. Conclusiones.....	42
CAPÍTULO 3. Periodo de protección frente a <i>Diaporthe caulivora</i> agente causal del cancro del tallo de la soja.....	43-57
1. Introducción.....	43-44
2. Materiales y métodos.....	45-48

3. Resultados.....	49-53
Variables meteorológicas relacionadas con el desarrollo del CTS...	49-50
Ensayo campaña 2015/2016.....	51
Ensayo campaña 2016/2017.....	52-53
4. Discusión.....	54-56
5. Conclusiones.....	57
CONCLUSIONES GENERALES.....	58-59
BIBLIOGRAFÍA.....	60-67
ANEXO.....	68-71

ÍNDICE DE TABLAS

<p>Tabla 1. Aislamientos punta de hifa del complejo <i>Diaporthe/Phomopsis</i> provenientes de la incubación de rastrojo de soja con síntomas de cancro del tallo por <i>D. caulivora</i>, naturalmente infectado: Código, año de recolección del rastrojo, origen geográfico y cultivar de soja afectado.....</p>	12
<p>Tabla 2. Efecto del periodo de permanencia (Jn – Ag: junio-agosto de 2015, Jn – Oct: junio-octubre de 2015, Jn – Dic: junio-diciembre de 2015 y Jn – Feb: junio 2015-febrero 2016) en el campo de la Unidad Integrada Balcarce, de rastrojo de soja naturalmente infectado por <i>Diaporthe caulivora</i> sobre el porcentaje de peritecios esporulados desarrollados durante 5, 13 y 26 días de incubación (T1, T2 y T3 respectivamente) en condiciones controladas.....</p>	19
<p>Tabla 3. ANOVA del efecto de las especies de malezas, del método de inoculación y su interacción sobre la infección de <i>Diaporthe caulivora</i>.....</p>	38
<p>Tabla 4. ANOVA del efecto del periodo de protección con fungicida Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta) sobre la Incidencia (%) de cancro del tallo de soja por <i>Diaporthe caulivora</i>, en estadio R2-R3, rendimiento (kg/ha) y peso de mil granos (g) en el ensayo 2015/2016.....</p>	51
<p>Tabla 5. Efecto del periodo de protección con fungicida Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta) sobre la Incidencia (%) de cancro del tallo de soja por <i>Diaporthe caulivora</i>, en estadio R2-R3, rendimiento (kg/ha) y peso de mil granos (g) en el ensayo 2015/2016. Medias y error estándar.....</p>	51
<p>Tabla 6. ANOVA del efecto del periodo de protección con fungicida Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta) sobre la Incidencia (%) de cancro del tallo de soja por <i>Diaporthe caulivora</i>, en estadio R2-R3, rendimiento (kg/ha) y peso de mil granos (g) en el ensayo 2016/2017.....</p>	52
<p>Tabla 7. Efecto del periodo de protección con fungicida Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta) sobre la Incidencia (%) de cancro del tallo de soja por <i>Diaporthe caulivora</i>, en estadio R2-R3, rendimiento (kg/ha) y peso de mil granos (g) en el ensayo 2015/2016. Medias y error estándar.....</p>	53

ÍNDICE DE TABLAS DEL ANEXO

Tabla I. Condiciones ambientales en torno a las inoculaciones con solución de ascosporas de <i>Diaporthe caulivora</i> para la campaña 2015/16, en la localidad de Balcarce. Precipitación (lluvia), temperatura (máxima, mínima y media), humedad relativa y amplitud térmica durante noviembre y diciembre de 2015 en la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico – INTA).....	68
Tabla II. Condiciones ambientales en torno a las inoculaciones con solución de ascosporas de <i>Diaporthe caulivora</i> para la campaña 2016/17, en la localidad de Balcarce. Precipitación (lluvia), temperatura (máxima, mínima y media), humedad relativa y amplitud térmica durante noviembre y diciembre de 2016 en la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA).....	69
Tabla III. Condiciones ambientales en torno a las inoculaciones con solución de ascosporas de <i>Diaporthe caulivora</i> para la campaña 2016/17, en la localidad de Balcarce. Precipitación (lluvia), temperatura (máxima, mínima y media), humedad relativa y amplitud térmica durante enero de 2017 en la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA).....	70
Tabla IV. Receta de medio de cultivo agar papa dextrosa 2 %(APDA).....	71
Tabla V. Receta de medio de cultivo caldo de papa dextrosa 2 %(APDA).....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. a) Peritecio de *Diaporthe caulivora* esporulado, detalle de la matriz gelatinosa. b) Grupo de peritecios de *D. caulivora* sobre tallo de soja (40x). c) Ascosporas con ascosporas de un peritecio de *D. caulivora* (200x.) (Foto propia, G. Schlie).....7
- Figura 2. Esquema conceptual de desarrollo de producción de peritecios totales como fuente de inóculo potencial y peritecios maduros-esporulantes como fuente de inóculo disponible (p.e. para *Diaporthe caulivora*) en el tiempo.....8
- Figura 3. a) Ejemplo de la disposición en el campo de cuatro bolsas con rastrojo de cuatro cultivares de soja (LDC 4.4 IPRO, LDC 4.0 IPRO, LDC 3.7, LDC 3.8), con síntomas de cancro de tallo por *Diaporthe caulivora* naturalmente infectados, provenientes de un lote del partido de Balcarce. Período 2015/2016. b) Detalle de una bolsa.....9
- Figura 4. Cámaras húmedas (placas de Petri) con fragmentos de rastrojo de tallo de soja infectados por *Diaporthe caulivora*. a) Incubación dentro de una cámara de crecimiento con condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. b) Detalle de un tratamiento. c) Detalle de una cámara húmeda con tres fragmentos de 5 cm cada uno.....10
- Figura 5. Dispositivo usado para el conteo de peritecios de especies del complejo *Diaporthe / Phomopsis* presentes en fragmentos de rastrojo de soja (según Grijalba, 2010).....11
- Figura 6. Agitador orbital de erlenmeyers con micelio de aislamientos en caldo de papa, creciendo en agitación en condiciones de laboratorio a 25 °C ± 2 y luz natural.....13
- Figura 7. a) Erlenmeyer con micelio crecido en caldo de papa luego de 5 días de desarrollo. b) filtrado del micelio con tela tipo tul.....14
- Figura 8. Patrones electroforéticos de bandas de restricción de los productos de la amplificación por PCR de las regiones ITS del ADNr de las especies *Diaporthe/Phomopsis* digeridos con las enzimas de restricción: *Alu I*, *Rsa I*, *Mse I* y *Hha I* (*Dpm*: *D. phaseolorum* var. *meridionalis*; *Dc*: *D. caulivora*; *Pl*: *P.*

longicolla; Dps: *D. phaseolorum* var. *sojae*) (Adaptado de Riccioni, L., 2009).....15

- Figura 9. Efecto del periodo de permanencia (Jn–Ag: junio-agosto de 2015; Jn–Oct: junio-octubre de 2015, Jn–Dic: junio-diciembre de 2015 y Jn–Feb: junio 2015-febrero 2016) en el campo de la Unidad Integrada Balcarce, de rastrojo de soja naturalmente infectado por *Diaporthe caulivora* en el campo sobre la cantidad de peritecios / cm² desarrollados después de 26 días de incubación en condiciones controladas.....16
- Figura 10. Efecto del periodo de permanencia (Jn – Ag: junio-agosto de 2015, Jn – Oct: junio-octubre de 2015, Jn – Dic: junio-diciembre de 2015 y Jn – Feb: junio 2015-febrero 2016) en el campo de la Unidad Integrada Balcarce, de rastrojo de soja naturalmente infectado por *Diaporthe caulivora* sobre el porcentaje de peritecios esporulados desarrollados durante 5, 13 y 26 días de incubación (T1, T2 y T3 respectivamente) en condiciones controladas para cuatro cultivares de soja (LDC 3,7, LDC 3,8, LDC 4, LDC 4,4).....17
- Figura 11. Efecto del periodo de permanencia (Jn – Ag: junio-agosto de 2015, Jn – Oct: junio-octubre de 2015, Jn – Dic: junio-diciembre de 2015 y Jn – Feb: junio 2015-febrero 2016) en el campo de la Unidad Integrada Balcarce, de rastrojo de soja naturalmente infectado por *Diaporthe caulivora* sobre el porcentaje de peritecios esporulados desarrollados durante 5, 13 y 26 días de incubación (T1, T2 y T3 respectivamente) en condiciones controladas. Datos promedio de cuatro cultivares (LDC 3,7, LDC 3,8, LDC 4, LDC 4,4). * indica efecto del periodo de permanencia del rastrojo significativo (P≤0,05).....18
- Figura 12. Derivada del porcentaje de peritecios esporulados, desarrollados durante 26 días de incubación en condiciones controladas, para cuatro periodos de permanencia en el campo de la Unidad Integrada Balcarce (Jn-Ag: junio-agosto 2015, Jn-Oct: junio-octubre 2015, Jn-Dic: junio-diciembre 2015 y Jn-Feb: junio 2015-febrero 2016), en rastrojo de soja con síntomas de cancro del tallo por *Diaporthe caulivora*, naturalmente infectados.....19
- Figura 13. Probabilidad de ocurrencia de días favorables para la producción de ascosporas (A) y porcentaje de peritecios esporulados (B) para cuatro periodos de permanencia (Junio-Agosto 2015, Junio-October 2015, Junio-

Diciembre 2015 y Junio 2015-Febrero 2016) en el campo de la Unidad Integrada Balcarce, del rastrojo de soja con síntomas de cancro del tallo por *Diaporthe caulivora*, naturalmente infectados.....20

Figura 14. Resultados de la amplificación de la región ITS con los iniciadores ITS 4 e ITS 5 de 35 aislamientos punta de hifa provenientes de la incubación de rastrojo de soja con síntomas de cancro del tallo por *Diaporthe caulivora*, naturalmente infectado, más el control *D. caulivora* (B13B3.6) y un control (-). Los códigos de cada aislamiento y los controles se indican en la parte superior de cada calle del gel de agarosa.....21

Figura 15. Patrones de bandas de restricción de los productos de la amplificación de la región ITS del ADNr de los aislamientos digeridos con la enzima *Alu I*, incluidos el control *Diaporthe caulivora* (B13B3.6) y un control (-). Los códigos de cada aislamiento y los controles se indican en la parte superior de cada calle del gel de agarosa. M100 pb y M50 pb: Marcadores de Peso Molecular cada 100 y cada 50 pares de bases, respectivamente. A la derecha se muestra un esquema del patrón de tamaños de banda en pb característico de la enzima *Alu I* para diferenciar a *Dpm* (*D. phaseolorum* var. *meridionalis*), *Pl* (*Phomopsis longicolla*) y *Dc* (*D. caulivora*).....22

Figura 16. Patrones de bandas de restricción de los productos de la amplificación de la región ITS del ADNr de los aislamientos digeridos con la enzima *Hha I*, incluidos el control *Diaporthe caulivora* (B13B3.6) y un control (-). Los códigos de cada aislamiento y los controles se indican en la parte superior de cada calle del gel de agarosa. M100 pb y M50 pb: Marcadores de Peso Molecular cada 100 y cada 50 pares de bases, respectivamente. A la derecha se muestra un esquema del patrón de tamaños de banda en pb característico de la enzima *Hha I* para diferenciar a *Dps* (*D. phaseolorum* var. *sojae*)/*Dc* (*D. caulivora*).....23

Figura 17. Patrones de bandas de restricción de los productos de la amplificación de la región ITS del ADNr de los aislamientos digeridos con la enzima *Rsa I*, incluidos el control *Diaporthe caulivora* (B13B3.6) y un control (-). Los códigos de cada aislamiento y los controles se indican en la parte superior de cada calle del gel de agarosa. M100 pb y M50 pb: Marcadores de Peso Molecular cada 100 y cada 50 pares de bases, respectivamente. A la derecha se

- muestra un esquema del patrón de tamaños de banda en pb característico de la enzima *Rsa* I para diferenciar a *Dpm* (*Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*)/*Dc* (*D. caulivora*) de *Pl* (*Phomopsis longicolla*).....24
- Figura 18. Patrones de bandas de restricción de los productos de la amplificación de la región ITS del ADNr de los aislamientos digeridos con la enzima *Mse* I, incluidos el control *Diaporthe caulivora* (B13B3.6) y un control (-). Los códigos de cada aislamiento y los controles se indican en la parte superior de cada calle del gel de agarosa. M100 pb y M50 pb: Marcadores de Peso Molecular cada 100 y cada 50 pares de bases, respectivamente. A la derecha se muestra un esquema del patrón de tamaños de banda en pb característico de la enzima *Mse* I para diferenciar a *Dpm* (*D. phaseolorum* var. *meridionalis*)/*Dc* (*D. caulivora*) de *Pl* (*Phomopsis longicolla*)/*Dps* (*D. phaseolorum* var. *sojae*).....25
- Figura 19. Cámaras húmedas para pruebas de germinación de *Raphanus sativus* (a) y *Helianthus annuus* (b).....33
- Figura 20. a) Plantas de *Carduus acanthoides* de 15 días trasplantadas a macetas de 7 L. b) Plántulas de *Rapistrum rugosum* de 7 días trasplantadas a macetas de 1,5 L.....34
- Figura 21. a) Planta de *Senecio vulgaris* inoculada con disco de agar y micelio de *Diaporthe caulivora* de una semana de crecimiento activo, protegido con algodón humedecido y cinta adhesiva. b) Detalle del tallo inoculado.....35
- Figura 22. Ensayo en macetas en cámara de crecimiento con plantas de malezas inoculadas y cubiertas con bolsas de polietileno.....36
- Figura 23. Porciones de tallos de *Rapistrum rugosum* inoculados con micelio de *Diaporthe caulivora* e incubados en placas de Petri con APDA.....37
- Figura 24. Plantas de *Chamomilla recutita* (a) y de *Senecio vulgaris* (b) inoculadas con *Diaporthe caulivora*, sin síntomas externos.....38
- Figura 25. Número de plantas por especie de las cuales se reaisló *Diaporthe caulivora*, de diez malezas invernales prevalentes del sudeste bonaerense, inoculadas

- con dos métodos (micelio y ascosporas) luego de 60-80 días de incubación.....39
- Figura 26. Anverso y reverso de colonias de *Diaporthe caulivora* reaisladas a partir de *Conyza sumatrensis* (a y b) y de *Rapistrum rugosum* (c y d) en APDA, incubadas en cámara de crecimiento durante 14 días a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$39
- Figura 27. Tamaño del rastrojo infectado con *Diaporthe caulivora* picado a un tamaño aproximado de 3 cm de largo, depositado en superficie.....45
- Figura 28. Sistema de riego por aspersión empleado en los ensayos de los ciclos agrícolas a) 2015/2016 y b) 2016/2017.....46
- Figura 29. Esquema de los momentos de aplicación de fungicida Amistar Top® y momentos de aplicación de suspensión de ascosporas de *Diaporthe caulivora* para la campaña 2015/16 en la localidad de Balcarce.....47
- Figura 30. Esquema de los momentos de aplicación de fungicida Amistar Top® y momentos de aplicación de suspensión de ascosporas de *Diaporthe caulivora* para la campaña 2016/17 en la localidad de Balcarce. S: tratamiento con curasemillas Sistiva®; A: tratamiento con curasemillas Acronis®.....47
- Figura 31. Aplicación de fungicida Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta) mediante mochila con tanque de CO₂ y una barra de cuatro picos cono hueco.....48
- Figura 32. Precipitación media mensual de las campañas 2006/07-2015/16-2016/17 y media histórica (1961-2017) para la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA).....49
- Figura 33. Temperatura media mensual de las campañas 2006/07-2015/16-2016/17 y media histórica (1961-2017) para la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA).....50
- Figura 34. Humedad relativa media mensual de las campañas 2006/07-2015/16-2016/17 y media histórica (1961-2017) para la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA).....50

RESUMEN

DINÁMICA DE *Diaporthe caulivora* EN FUENTES DE INÓCULO: RASTROJOS Y MALEZAS, Y PERIODOS DE PROTECCIÓN FRENTE AL CANCRO DEL TALLO DE SOJA

El cancro del tallo de la soja (CTSc) causado por *Diaporthe caulivora* (*Dc*) causa importantes pérdidas a nivel mundial. En el sudeste de la provincia de Buenos Aires es la enfermedad prevalente más destructiva que afecta el cultivo. Las fuentes de inóculo primario de *Dc* son las semillas y el rastrojo, no habiendo evidencias de que las malezas actúen como tal en Argentina. Los objetivos de la tesis fueron, en primer lugar, determinar la presencia y además la cantidad de peritecios de *Dc* en rastrojo de soja con CTSc en diferentes momentos del año en condiciones de laboratorio, detectar malezas como fuente de inóculo durante los periodos sin soja y evaluar diferentes periodos de protección con un fungicida foliar, entre los estadios V1 y R1. En 2014/015 se recolectaron rastrojos de cuatro cultivares de soja (LDC 3.7, LDC 3.8, LDC 4, LDC 4.4) con síntomas de CTSc, en la localidad de Balcarce. Las muestras se colocaron en el campo donde permanecieron cuatro periodos (Junio-Agosto, Junio-Octubre, Junio-Diciembre y Junio-Febrero), luego fueron incubadas en cámaras húmedas en condiciones controladas. Se registró la cantidad de peritecios/cm² de tallo y el porcentaje de peritecios esporulados a los 5, 13 y 26 días de incubación. Diez especies de malezas (*Ammi majus*, *Brassica rapa*, *Carduus acanthoides*, *Chamomilla recutita*, *Conyza sumatrensis*, *Raphanus sativus*, *Rapistrum rugosum*, *Senecio vulgaris*, *Sonchus oleraceus* y *Helianthus annuus*) se inocularon con *Dc*. Se usaron dos métodos: 1) consistió en el asperjado de una suspensión de 4×10^6 ascosporas/mL y 2) en la aplicación sobre el tallo de un disco (0,5 mm) de APDA con micelio humedecido y protegido, y testigos sin patógeno. El periodo de protección frente a *Dc* se estudió en base a dos ensayos con el fungicida foliar (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %). En 2015/2016 se diseñaron 6 tratamientos: protección hasta V1; hasta V3; hasta V5; desde V3; desde V5; desde V1 hasta R1 (control total). En 2016/2017 los tratamientos fueron 16: 2 consistieron solo en el curado de la semilla con Sistiva® (fluxapyroxad 33 %; Basf) y Acronis® (metil tiofanato 45 % - piraclostrobin 5 %; Basf), respectivamente. Los demás fueron: protección hasta V1; hasta V3; hasta V5; hasta V7; hasta V9; desde V1; desde V3; desde V5; desde V7; desde V9; protección con Sistiva® + V1 hasta R1; Acronis® + V1 hasta R1. Ambos ensayos con un testigo sin protección. La cantidad de peritecios/cm² (promedio 188,66) no difirió entre periodos de exposición en el campo. El periodo Junio-Diciembre presentó el mayor % de peritecios esporulados de *Dc*, con una probabilidad de ocurrencia de días favorables para al menos el 5 % de peritecios esporulados, también mayor. El patógeno se aisló de *Ch. recutita*, *C. sumatrensis*, *R. rugosum*, *S. vulgaris* y *H. annuus*, no detectándose diferencias significativas en la eficiencia entre métodos. No se logró establecer un periodo de protección con fungicida ya que no ocurrieron ni se lograron las condiciones predisponentes para la enfermedad. Este estudio aporta información sobre las fuentes de inóculo de *Dc*: la dinámica del rastrojo de soja infectado y malezas fuentes de inóculo donde permanece viable en momentos sin cultivo de soja en el campo.

Palabras claves: *Glycine max*, *Diaporthe/Phomopsis*, peritecios, hospedantes alternativos, fungicida.

ABSTRACT**DYNAMICS OF *Diaporthe caulivora* INOCULUM SOURCES: CROP RESIDUES AND WEEDS, AND PERIODS OF PROTECTION AGAINST SOYBEAN STEM CANKER**

Soybean stem canker (SSCc) is a disease provoked by *Diaporthe caulivora* (*Dc*) cause important losses around the world and is the most destructive prevalent soybean disease in the southeast of Buenos Aires Province. Seeds and crop residues are sources of primary inoculum of *Dc*, and so far nobody proved yet that seeds might be an alternative source of primary inoculum in Argentina. The aim of this thesis was to determine presence and amount of *Dc* perithecia in soybean residues with SSCc at different times of the year under laboratory conditions, detect weeds as inoculum source during the periods without soybean and evaluate which is the period to control more efficiently with a foliar fungicide among V1 and R1. In 2014/015 stubble from four soybean cultivars (LDC 3.7, LDC 3.8, LDC 4, LDC 4.4) with SSCc symptoms were collected from a field near Balcarce city. Samples were placed at INTA Balcarce Experimental Station where they remained in the field during four periods (June-August, June-October, June-December and June-February), and then were incubated in moist chambers under controlled conditions. The amount of perithecia/cm² of stem and percentage of sporulated perithecia were recorded at 5, 13 and 26 days of incubation. Ten weed species (*Ammi majus*, *Brassica rapa*, *Carduus acanthoides*, *Chamomilla recutita*, *Conyza sumatrensis*, *Raphanus sativus*, *Rapistrum rugosum*, *Senecio vulgaris*, *Sonchus oleraceus* y *Helianthus annuus*) were inoculated with *Dc* using two methods which consisted in: 1) sprinkling with 4x10⁶ ascospores/mL of aqueous suspension, and 2) application on the lower stem section of an APDA plug (0,5 mm) with mycelium along with a moistened cotton piece and supported with a sealing tape. Controls were similar except for the absence of *Dc*. The period of protection with foliar fungicide (azoxystrobin 20% and difenoconazole 12.5%) against *Dc* was studied based in two field trials. In 2015/2016 six treatments were designed: protection up to V1; up to V3; up to V5 and V5 to R1 (being the V1-R1 the total control). In 2016/2017 there were 16 treatments: two of them consisted of treating seed with Sistiva® (fluxapyroxad 33%, Basf) and Acronis® (45% methyl thiophanate and pyraclostrobin 5%, Basf), respectively. In the rest the protection was: up to V1; V3; V5; V7; V9 and from V1; V3; V5; V7; V9 reaching R1 in each case; with Sistiva® + V1 to R1; Acronis® + V1 through R1. Both trials included an unprotected control. The amount of perithecia/cm² (average 188,66) did not differ among periods of field exposure. Period June-December had the highest % of sporulated perithecia of *Dc*, with a probability of occurrence of favorable days for at least 5% of sporulated perithecia, also higher. The pathogen was isolated from asymptomatic plants of *Ch. recutita*, *C. sumatrensis*, *R. rugosum*, *S. vulgaris* and *H. annuus*, which was not a function of the method of inoculation. A period for an effective protection with fungicide could not be determined since the favorable environmental conditions for the disease neither occurred nor were not achieved. This study provides information about sources of *Dc* inoculum: the dynamics of infected soybean stubble and weeds as alternative hosts of *Dc* while soybean is not in the field.

Key words *Glycine max*, *Diaporthe/Phomopsis*, perithecia, alternative host, fungicide.

INTRODUCCIÓN

En los últimos 25 años la superficie sembrada y la producción de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) de la Argentina ha aumentado, alcanzando en 2016 alrededor de 20 millones de ha y 57,3 t, respectivamente (Bolsa de Comercio de Rosario, 2017). Este incremento de la superficie sitúa a Argentina en el tercer puesto a nivel mundial como exportador de grano de soja y sus derivados. Actualmente las divisas que ingresan a nuestro país por el complejo exportador de soja corresponden al 30 % del total de los ingresos por exportaciones (INDEC, 2016).

El cultivo de soja es afectado por más de 100 patógenos, insectos, malezas y factores abióticos que interfieren con el crecimiento y el desarrollo del mismo (Padgett *et al.*, 1992). Tanto plagas como enfermedades que afectan a la soja son una limitante para obtener rendimientos alcanzables cercanos al potencial en años con condiciones predisponentes para la ocurrencia de epifitias y ataques severos. Según un trabajo publicado por Wrather *et al.* en el año 1997, las pérdidas para el sector causadas por enfermedades en Argentina ascendieron a 900.000 t/año en 1994, lo que representó alrededor de 250 millones de dólares.

Entre las enfermedades que afectan al cultivo de soja, las que integran el complejo fúngico *Diaporthe/Phomopsis* (*D/P*) tienen importancia debido a las pérdidas que producen (Backman *et al.*, 1985). Este complejo posee una amplia diversidad genética (Pioli, 2007) y patogénica. Miembros del mismo causan enfermedades de importancia económica y son endémicas en zonas productoras de soja del mundo, donde provocan más pérdidas que ningún otro hongo (Backman *et al.*, 1985; Hartman *et al.*, 1999). Entre las enfermedades del complejo *D/P* se cita el tizón del tallo y de la vaina causado por *D. phaseolorum* var. *sojae* (sin. *Phomopsis phaseoli*), el decaimiento y deterioro de semilla causado por *P. longicolla* y el cancro del tallo (CTS) causado por *Diaporthe caulivora* (Athow & Cadwell) J.M. Santos, Vrandečić & A.J.L. Phillips (*Dc* - CTSc) y *D. phaseolorum* (Cke. & Ell.) Sacc. var. *meridionalis* (*Dpm* - CTSm)(sin. *Diaporthe aspalathi*).

El CTSm se observó por primera vez en Argentina en 1983 (Ploper *et al.*, 1997) y en 1996 se registraron epifitias en las subregiones pampeana norte y noroeste (Pioli *et al.*, 1997; Ploper *et al.*, 1997). Durante 1996/1997 Pioli *et al.* (1997) reportaron incidencias de 70 a 100 % en Santa Fe, afectando también a las provincias de Córdoba, Buenos Aires, Entre Ríos y Tucumán (Grijalba y Marino, 2001). La resistencia genética lograda para el CTSm disminuyó la incidencia de la enfermedad en lotes comerciales (Ploper, 2004), en el sudeste bonaerense se registraron epifitias a partir de 2003/2004 (Ridao, 2006; Ridao y Lago, 2007) y el patógeno responsable fue *Dc* (Grijalba y Guillin, 2007;

Ridao y Lago, 2007). La ausencia de materiales con resistencia genética a *Dc*, el monocultivo y la siembra directa, entre otros factores, incidieron en esta expansión. Ridao y Platz (2013) encontraron que para una incidencia del orden del 9 % las pérdidas por hectárea ascendieron a los 170 Kg, lo que representaría un total de 105 millones de U\$S en pérdidas económicas para el sudeste bonaerense. Por su parte Montoya *et al.* (2017) determinaron disminuciones por CTSc del orden del 50 y 45 % en el peso y número de granos/planta. Además, estudios realizados por Lago *et al.* (2007) determinaron una prevalencia del 94 % y una incidencia que varió entre 0,5 y 55 % en los partidos de Azul, Balcarce, Gral. Alvarado, Necochea, Olavarría, San Cayetano, Tandil y Tres Arroyos. Todo esto indica que actualmente es una enfermedad problemática para el centro-sudeste de la provincia de Buenos Aires por su alta capacidad destructiva y prevalencia.

D. caulivora es un patógeno monocíclico que infecta en los primeros estadios vegetativos (V3 – V6) cuando el cultivo de soja es más susceptible a la infección (Backman *et al.*, 1985; Smith y Backman, 1989), coincidiendo con los meses de noviembre-diciembre para las fechas de siembra óptimas en el sudeste bonaerense. Sus características bioheterotróficas facultativas le permiten sobrevivir durante la etapa invernal en rastrojos, semillas y hospedantes alternativos. En primavera, las estructuras reproductivas sexuales (peritecios) que sobrevivieron al invierno, maduran en estromas y liberan las ascosporas. Estas se diseminan gracias a la acción de gotas de lluvia y viento produciendo la infección primaria (Backman *et al.*, 1985). Según Yorinori (1996), quien trabajó con *Dpm*, 15 a 20 días después de que las ascosporas penetraron en la planta se evidencian las lesiones pequeñas de difícil observación en el campo, y los síntomas típicos suelen aparecer entre 34 y 80 días después de la infección, lo que dificulta la detección temprana (Rupe *et al.*, 1999). Sin embargo, la infección durante estadios vegetativos avanzados o reproductivos raramente desarrolla síntomas visibles en las plantas (Smith y Backman, 1989).

La abundancia de rastrojo en superficie por la siembra directa, la escasa variabilidad genética en los genotipos sembrados y la ausencia de rotaciones han contribuido con la sobrevivencia de *Dc* en la región sojera sur de Argentina como en otras áreas del mundo. Rothrock *et al.* en 1985 y 1988 encontraron mayor incidencia de CTSc en lotes con sistema de labranza mínima en comparación con los lotes con labranza convencional. Estos autores hallaron que la incidencia de CTSc en secuencias de cultivos de trigo/soja fue mayor cuando se las comparó con rotaciones de soja continua y barbecho/soja. Grijalba y Ridao (2012), por su parte, demostraron la alta capacidad

saprofítica de *Dc* al comprobar la colonización y desarrollo del hongo inoculado en rastrojos de distintos cultivos comúnmente incluidos en la rotación con soja en el sudeste bonaerense, como girasol, trigo, sorgo, papa y maíz.

En enfermedades monocíclicas, en las que la principal fuente de inóculo son las estructuras de fructificación que sobreviven en el rastrojo de cultivos anteriores, la historia del lote sirve como indicador de epifitias potenciales. En el caso de CTSc esta interpretación puede resultar errónea debido a la presencia de plantas asintomáticas que atentarían contra ese indicador, debido a la subestimación del inóculo presente en el lote (Backman *et al.*, 1985). Esto determina la necesidad de conocer la dinámica de la fuente de inóculo (peritecios) y la producción de inóculo primario (ascosporas) mediante la visualización directa. Hasta el presente no se han registrado estudios a nivel local que caractericen la producción de peritecios y la liberación de ascosporas desde el rastrojo como fuente de inóculo.

La semilla también cumple un rol clave en la epifitología del CTSc ya que no solo actúa como fuente de inóculo sino que es la principal vía de diseminación a grandes distancias y hacia áreas libres (Backman *et al.*, 1985). Rossi *et al.* (2008), Rossi y Ridao (2009; 2011) y Scandiani y Luque (2009) sugirieron que la introducción de semilla infectada, además de disminuir el porcentaje de germinación, afectaría la planta a través de infecciones secundarias. Estudios realizados por Rossi en el 2008, demostraron una incidencia promedio de *Dc* en semilla del 10 % y valores máximos del 34 % para el sudeste bonaerense (Rossi y Ridao, 2009).

Muchas especies del género *Diaporthe* han sido detectadas en diversos hospedantes y varias especies pueden también colonizar al mismo hospedante (Dissanayake *et al.*, 2017). En la literatura referente a la patología vegetal se encuentra extensamente documentado el rol que cumplen las malezas y las plantas voluntarias de cultivos como hospedantes alternativos de diversos patógenos entre los cuales se incluye *Diaporthe*. De esta manera se posibilita la ocurrencia de puentes verdes entre ciclos agrícolas de cultivo que facilitan la supervivencia y multiplicación del patógeno (Thompson *et al.*, 2015). Especies integrantes del complejo *D/P* han sido aisladas y probada su patogenicidad en cultivos y malezas en distintas partes del mundo (Hepperly *et al.*, 1980; Roy *et al.*, 1994, 1997; Black *et al.* 1996; Grijalba y Marino, 2001; Formento y Guillin 2003; Mengistu *et al.*, 2007, 2014; Thompson *et al.* 2011, 2015; Gao *et al.*, 2014; Noelting *et al.* 2016). Si bien en la mayoría de los estudios donde se aisló o reaisló algún integrante del complejo no correspondió con especies de malezas presentes en nuestro país, poco se conoce en la región sojera sur y a nivel nacional sobre el rol de las

malezas como hospedantes de *Dc* y su importancia epidemiológica. Esto es especialmente relevante ya que las malezas podrían alojar a los patógenos mostrando síntomas, o permaneciendo asintomáticas, favoreciendo la sobrevivencia en el campo en momentos donde no se encuentra el cultivo implantado.

Para el manejo del CTSc se han propuesto diversas estrategias. En la literatura se mencionan el uso de semillas sanas o su tratamiento con curasemillas como prevención mediante la erradicación de inóculo; rotaciones con cultivos no hospedantes y el manejo de los rastrojos favoreciendo la descomposición acelerada de los restos vegetales, a fin de disminuir la fuente potencial de inóculo primario. Además, algunos autores recomiendan el empleo de fechas de siembras tardías como estrategia de evasión de la enfermedad, debido a que habría un agotamiento de la fuente de inóculo (Backman *et al.* 1985; Lago, 2010; Ridao, 2012a).

Una de las tácticas a las que se apela con menos frecuencia son los fungicidas foliares o curasemillas sistémicos en plántula. El uso de compuestos fitoterápicos no ha sido estudiado en profundidad y por este motivo, en la actualidad se cuentan con pocos datos sobre la eficacia que tiene esta táctica en el control del CTSc. Backman *et al.* (1985) hallaron que aplicaciones de benomil en los estados vegetativos tempranos del cultivo mostraron una disminución en la incidencia del CTSc comparadas con aplicaciones en estadios reproductivos. Sin embargo, a la luz de los conocimientos actuales sobre las especies del complejo, no hay total certeza sobre a cuál de las especies causantes de cancro se refiere cada artículo publicado. En cuanto a Argentina, no existen informes sobre pruebas similares en el uso de fungicidas para el control de los agentes causantes de CTSc. De lo anterior surge la necesidad de profundizar en el conocimiento de estrategias de manejo que permitan encontrar un periodo donde la aplicación de un fungicida realice un control eficiente de la enfermedad.

La importancia y el impacto del patosistema soja – *D/P* en Argentina requieren el abordaje de ciertos estudios claves para su manejo. Una visión holística a esta problemática es necesaria para poder entender en profundidad el sistema epidemiológico de este complejo de patógenos de soja en el sudeste bonaerense. Dentro de esta visión resulta necesario el estudio de la dinámica de las fuentes potenciales de inóculo primario como los rastrojos y los hospedantes alternativos. Otro aspecto importante dentro de este sistema son las estrategias de manejo (uso de fungicida) que ayuden a disminuir la incidencia de esta enfermedad en los sistemas productivos de la región.

Hipótesis:

- 1- La producción de peritecios en rastrojos de soja con cancro del tallo por *Diaporthe caulivora* es mayor durante diciembre, en coincidencia con los estadios vegetativos del cultivo de soja, sembrado entre la última semana de octubre y primera quincena de noviembre en el sudeste bonaerense.
- 2- *Diaporthe caulivora* infecta algunas malezas invernales prevalentes de los sistemas agrícolas del sudeste bonaerense.
- 3- La protección de la soja ante *Diaporthe caulivora*, agente causal del cancro del tallo, es más efectiva mediante la pulverización del fungicida foliar azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 % entre los estadios V1-V5.

Objetivo general:

Determinar la dinámica temporal del inóculo primario de *Dc* desde rastrojos de soja, detectar malezas invernales como potenciales fuentes de inóculo de *Dc*, y evaluar una posible forma de protección frente al CTSc.

Objetivos particulares:

- 1- Determinar la presencia y cantidad de peritecios potencial de *Dc* en rastrojo de soja con cancro del tallo en diferentes momentos del año.
- 2- Determinar la capacidad potencial del rastrojo de soja colectado en diferentes momentos del año para generar peritecios esporulantes.
- 3- Detectar malezas como hospedantes alternativos de *Dc* durante los periodos sin soja.
- 4- Evaluar diferentes períodos de protección comprendidos entre los estadios V1 y R1 con un fungicida foliar (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %) en un cultivar susceptible de soja frente a *Dc* agente causal del CTS.

CAPÍTULO I

DINÁMICA DEL RASTROJO DE SOJA COMO FUENTE DE INÓCULO DE *Diaporthe caulivora*

INTRODUCCIÓN

Muchas de las estructuras reproductivas que presentan los hongos patógenos han sido estudiadas en profundidad como puede encontrarse en la literatura (Alexopoulos *et al.*, 1996; Kendrick, 2000). Dentro de esta temática se ha intentado describir y comprender la génesis de estas estructuras, su dinámica de desarrollo y la liberación de esporas, junto con los factores que afectan estos procesos. Hasta el presente, la formación de las fructificaciones sexuales en los Ascomycetes ha sido estudiada en un número relativamente pequeño de especies. En todos los casos se ha demostrado que el desarrollo de estas estructuras se inicia mucho antes de su visualización durante la reproducción sexual, y a partir de este momento comienza la diferenciación de los tejidos que las componen (Moore-Landecker, 1992).

Un ejemplo en que muchos investigadores han dedicado esfuerzos por casi un siglo es *Venturia inaequalis*, agente causal de la sarna del manzano. La identificación y conocimiento de las distintas etapas reproductivas del patógeno y los factores que afectan su dinámica hicieron posible desarrollar medidas de manejo eficiente de esta enfermedad. Diversos estudios con otros patógenos han usado de base los conocimientos y técnicas generados para este patosistema (Blake, 1980; Guyot *et al.*, 2015).

D. caulivora es un Ascomycete, clase Sordariomycetes, orden Diaporthales, que se caracteriza por presentar cuerpos de fructificación llamados peritecios, negros, globosos, en grupos cespitosos de entre dos y doce por estroma (predominantemente de tres a cinco), ocasionalmente aislados, inmersos en el tejido cortical (Athow y Caldwell, 1954; Fernández *et al.*, 1999) (Fig. 1b). Estos presentan cuellos largos, de 24-518 μm de largo, 85-192 μm de ancho en la base y 22-36 μm en el ápice (Athow y Caldwell, 1954). Fernández y Hanlin (1996) y Pioli *et al.* (2001) indicaron que la longitud y ancho de peritecios tienen valores de $277,3 \pm 51,5 \times 316,8 \pm 56 \mu\text{m}$. Los mismos autores se refirieron al largo y ancho de ascos y ascosporas con valores de $26,7 \pm 1,0 \times 5,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ y $8,2 \pm 0,1 \times 2,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$, respectivamente. Los ascos son unitunicados libres, con un anillo refractivo en el ápice y con ocho ascosporas, sésiles, alargado-clavados, con paredes delgadas evanescentes. Las ascosporas son elipsoidales, bicelulares, levemente constrictas en el septo, con dos gúttulas por célula (Fig. 1c).

Cuando un peritecio esporula expulsa por el ostiolo, una matriz gelatinosa que contiene ascos y ascosporas (Fernández *et al.*, 1999) (Fig. 1a). Esta matriz (cirro) actúa como estructura protectora de las ascosporas contra la deshidratación y permite extender la viabilidad de las mismas (Subbarao *et al.*, 1992a). Cuando se producen lluvias, las gotas que impactan sobre los cirros dispersan las ascosporas hacia sitios cercanos que por lo general no superan los 4,5 m de distancia en promedio (Damicone *et al.*, 1990).

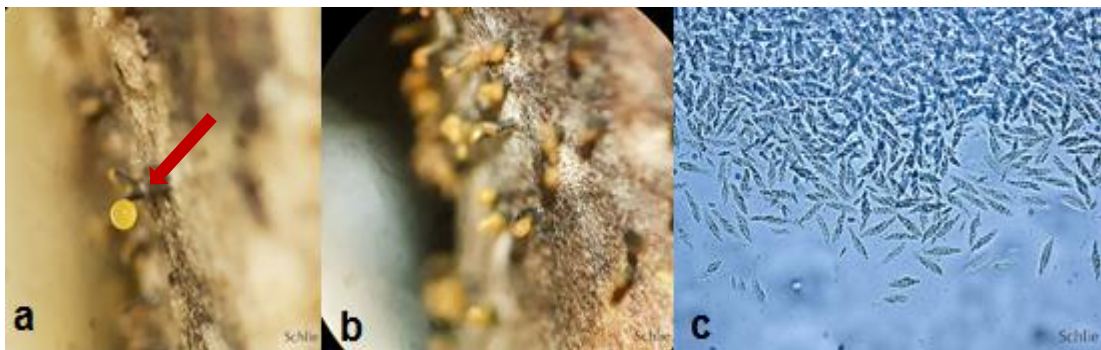


Figura 1. a) Peritecio de *Diaporthe caulivora* esporulado, detalle de la matriz gelatinosa. b) Grupo de peritecios de *D. caulivora* sobre tallo de soja (40x). c) Ascus con ascosporas de un peritecio de *D. caulivora* (200x). (Foto propia, G. Schlie).

Estudios realizados por Subbarao *et al.* (1992a) demostraron que la formación de peritecios y la liberación de las ascosporas variaron de forma independiente con el transcurso de un periodo de incubación de 45 días bajo condiciones de alta humedad. Esto pone de manifiesto que ambos procesos ocurren en forma gradual y en diferentes momentos para una misma fuente de inóculo. Como se aprecia en la figura 2, un hipotético rastrojo de soja infectado por *Dc* representa una fuente de inóculo potencial para el periodo de infección siguiente. La fuente de inóculo potencial comprende aquellos peritecios que no maduraron o cuyo desarrollo fue abortado previamente en procesos de diferenciación estructural tornándose inviables (fuente de inóculo no disponible) más aquellos peritecios que completaron su desarrollo y llegaron a la madurez (fuente de inóculo disponible). Al considerar la fuente de inóculo disponible se puede diferenciar entre los peritecios maduros y los peritecios maduros-esporulados, que son aquellos que ya han liberado los ascos con sus ascosporas en una matriz gelatinosa.

El estudio detallado de la dinámica que presenta la principal fuente de inóculo de *Dc* y liberación de inóculo primario en las condiciones locales resulta de suma importancia. La condición del CTSc como una enfermedad monocíclica pone de manifiesto que las posibles estrategias para un manejo efectivo de la enfermedad resultarán de conocer

los estados de desarrollo de los peritecios en el rastrojo infectado.

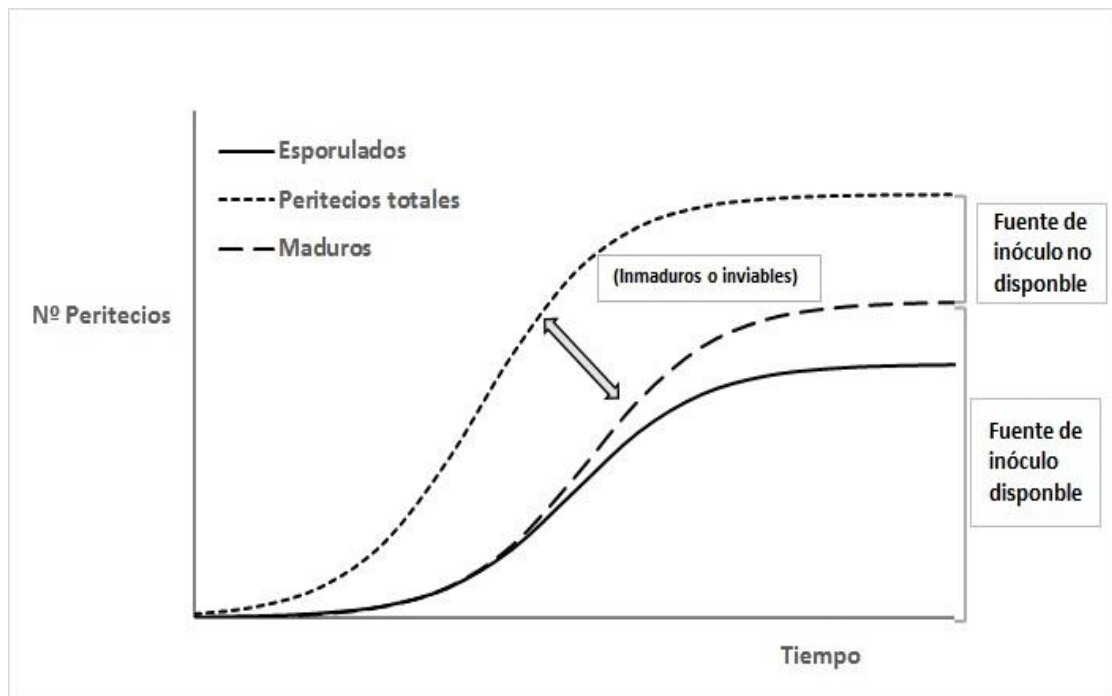


Figura 2. Esquema conceptual de desarrollo de producción de peritecios totales como fuente de inóculo potencial y peritecios maduros-esporulantes como fuente de inóculo disponible (p.e. para *Diaporthe caulivora*) en el tiempo.

Los objetivos del presente capítulo fueron estudiar la dinámica de la fuente de inóculo de *Dc* mediante la determinación de la presencia y cantidad de peritecios en rastrojos de soja infectados en condiciones ambientales del sudeste bonaerense; y la producción de inóculo primario mediante la determinación de peritecios maduros-esporulantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cuatro cultivares de soja (LDC 4.4 IPRO, LDC 4.0 IPRO, LDC 3.7, LDC 3.8; LDC S.A.) que presentaron alta incidencia de CTSc en un lote cercano a la ciudad de Balcarce (37° 89' 79" latitud sur y 58° 32' 47" longitud oeste) fueron cosechados y los rastrojos (tallos), recolectados. Posteriormente se fraccionaron en ocho bolsas de polietileno tipo red (25 x 45 cm y malla 0,5 x 0,5 cm) con 50 g de rastrojo por cada cultivar (Fig. 3) y se depositaron al azar en dos lotes del campo experimental de la UIB (37° 75' 72" latitud sur y 58° 30' 18" longitud oeste). En uno de ellos, el cultivo antecesor fue soja y el otro tenía una pastura donde nunca se implantó soja (cuatro bolsas por cultivar en cada lote). Las bolsas permanecieron allí entre junio de 2015 y febrero de 2016, lo que representa el tiempo de barbecho y las primeras etapas de desarrollo del cultivo de soja. A intervalos de 60 días se recogió una bolsa por cultivar (agosto, octubre, diciembre, febrero) la que fue llevada al laboratorio para su procesamiento.



Figura 3. a) Ejemplo de la disposición en el campo de cuatro bolsas con rastrojo de cuatro cultivares de soja (LDC 4.4 IPRO, LDC 4.0 IPRO, LDC 3.7, LDC 3.8), con síntomas de cancro de tallo por *Diaporthe caulivora* naturalmente infectados, provenientes de un lote del partido de Balcarce. Período 2015/2016. b) Detalle de una bolsa.

El rastrojo de cada bolsa fue observado en el laboratorio con una lupa estereoscópica (Olympus SX9 Zoom, 0,5 a 90x) para determinar la presencia y tipo de estructura reproductiva. Posteriormente se cortaron fragmentos de 5 cm de longitud que fueron colocados en cámaras húmedas (placas de Petri de 9 cm de diámetro con algodón, papel humedecido y malla plástica). Por cada tratamiento (cultivar x lote x periodo) se utilizaron seis placas (cámaras húmedas) con tres fragmentos cada una. Las mismas se incubaron en cámara de crecimiento (Model MGC 350-HPY-2, Hangzhou Chincan Trading Co., China) durante 30 días a 20 ± 2 °C y alternancia de 12 h de luz NUV (longitud de onda cercana al ultravioleta) y 12 h de oscuridad para inducir la producción de estructuras reproductivas (Fig. 4). Luego de este periodo inicial de incubación se volvió a registrar presencia y tipo de estructuras reproductivas y número de peritecios

por tallo mediante la metodología usada por Grijalba (2010). Esta metodología se basa en el uso de papel cuadriculado al cual se le calaron cinco cuadrados de 0,5 cm por 0,5 cm equidistantes entre sí. El conteo de las estructuras reproductivas solo se realizó donde se situaban los cortes, dando como resultado una superficie total de 1,25 cm² (Fig. 5).

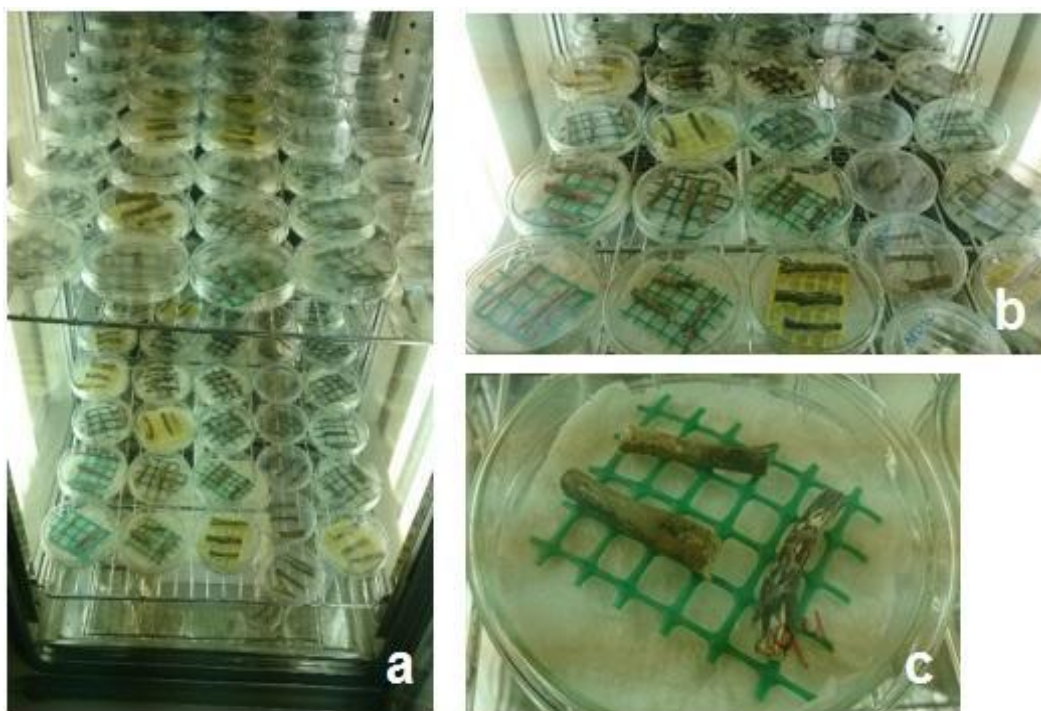


Figura 4. Cámaras húmedas (placas de Petri) con fragmentos de rastrojo de tallo de soja infectados por *Diaporthe caulivora*. a) Incubación dentro de una cámara de crecimiento con condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. b) Detalle de un tratamiento. c) Detalle de una cámara húmeda con tres fragmentos de 5 cm cada uno.

Durante 26 días y con intervalos de 2 días entre registros, se observaron las placas para registrar el momento de esporulación de los peritecios. A partir de los cirros se procedió al aislamiento de ascosporas, que fueron cultivadas en cajas de Petri con medio agar papa dextrosa, acidificado con ácido láctico al 5 % (APDA). Las colonias con crecimiento de micelio característico y aspecto semejante a las de *Dc* o alguna especie del complejo *D/P* fueron seleccionadas y repicadas a nuevas placas con APDA, para su posterior identificación por técnicas moleculares.



Figura 5. Dispositivo usado para el conteo de peritecios de especies del complejo *Diaporthe/Phomopsis* presentes en fragmentos de rastrojo de soja (según Grijalba, 2010).

El diseño del experimento fue en bloques completos aleatorizados con arreglo en parcelas divididas, donde el antecesor fue considerado factor de bloqueo, la parcela principal fue el periodo de exposición y la subparcela, el cultivar.

El conteo promedio de peritecios totales y el porcentaje de peritecios esporulados a los 5 (T1), 13 (T2) y 26 (T3) días del periodo de incubación fueron analizados empleando modelos lineales mixtos (Proc. MIXED, SAS Studio v3.6, SAS Institute Inc.). Se incluyeron como efectos fijos al bloque, el mes, el cultivar y la interacción entre estos dos últimos. La simetría y homocedasticidad de los residuales fueron chequeados mediante métodos gráficos. Las comparaciones múltiples *post hoc* fueron ajustadas mediante el método HSD de Tukey.

Se determinó la probabilidad de ocurrencia de días consecutivos favorables para la liberación de ascosporas por *Dc* en la localidad de Balcarce, mediante el análisis de datos climáticos de la serie histórica 1980-2014 (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA). Se consideró como día favorable al que presentó condiciones similares a las de la cámara de incubación donde se realizaron los ensayos, que consistió en una humedad relativa mayor o igual al 80 % y temperatura entre 18 °C y 23 °C (Rupe, *et al.*, 1996).

Caracterización molecular mediante PCR-RFLP de aislamientos de *Diaporthe/Phomopsis* obtenidos de los rastrojos

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Vegetal de la UIB bajo la supervisión de la Ing. Agr. M. Clara Sánchez. Se utilizó la técnica de PCR-RFLP y se compararon los resultados con los encontrados por Zhang *et al.* (1998) para las distintas especies y variedades de *D/P*.

Se utilizaron 35 aislamientos, provenientes de punta de hifa, del rastrojo incubado bajo condiciones controladas (Tabla 1). Los mismos fueron seleccionados a partir de las características morfológicas similares a las especies del complejo *D/P*.

Tabla 1. Aislamientos punta de hifa del complejo *Diaporthe/Phomopsis* provenientes de la incubación de rastrojo de soja con síntomas de cancro del tallo por *D. caulivora*, naturalmente infectado: Código, año de recolección del rastrojo, origen geográfico y cultivar de soja afectado.

Código	Año de recolección	Origen geográfico	Cultivar	Código	Año de recolección	Origen geográfico	Cultivar
B15B1.1	2015	Balcarce	LDC 3,7	B15B3.7	2015	Balcarce	LDC 4
B15B2.1	2015	Balcarce	LDC 3,8	B15B1.11	2015	Balcarce	LDC 3,7
B15B2.2	2015	Balcarce	LDC 3,8	B15B1.13	2015	Balcarce	LDC 3,7
B15B3.1	2015	Balcarce	LDC 4	B15B4.7	2015	Balcarce	LDC 4.4
B15B4.1	2015	Balcarce	LDC 4.4	B15B4.5	2015	Balcarce	LDC 4.4
B15B1.2	2015	Balcarce	LDC 3,7	B15B2.7	2015	Balcarce	LDC 3,8
B15B1.3	2015	Balcarce	LDC 3,7	B15B4.6	2015	Balcarce	LDC 4.4
B15B1.4	2015	Balcarce	LDC 3,7	B15B1.10	2015	Balcarce	LDC 3,7
B15B1.5	2015	Balcarce	LDC 3,7	B15B3.6	2015	Balcarce	LDC 4
B15B2.3	2015	Balcarce	LDC 3,8	B15B1.9	2015	Balcarce	LDC 3,7
B15B2.4	2015	Balcarce	LDC 3,8	B15B2.6	2015	Balcarce	LDC 3,8
B15B3.4	2015	Balcarce	LDC 4	B15B1.8	2015	Balcarce	LDC 3,7
B15B3.2	2015	Balcarce	LDC 4	B15B2.5	2015	Balcarce	LDC 3,8
B15B3.3	2015	Balcarce	LDC 4	B15B1.12	2015	Balcarce	LDC 3,7
B15B3.5	2015	Balcarce	LDC 4	B15B1.7	2015	Balcarce	LDC 3,7
B15B4.2	2015	Balcarce	LDC 4.4	B15B2.8	2015	Balcarce	LDC 3,8
B15B4.3	2015	Balcarce	LDC 4.4	B15B1.6	2015	Balcarce	LDC 3,7
B15B4.4	2015	Balcarce	LDC 4.4				

Ejemplo de Código. B15B1.1: B (Colección de hongos del Laboratorio de Patología Vegetal de la Unidad Integrada Balcarce); 15 (año de recolección); B (Origen geográfico de la muestra, B: Partido de Balcarce); 1 (Cultivar del cual se obtuvo el aislamiento, 1: LDC 3.7; 2: LDC 3.8; 3: LDC 4; 4: LDC 4.4); 1 (Nro. de muestra de la cual se obtuvo el aislamiento).

Para la extracción de ADN se iniciaron cultivos de cada aislamiento introduciendo “motas” o trozos de micelio dentro de erlenmeyers de 250 mL con 200 mL de caldo de papa enriquecido con 20 g de Dextrosa 1-Hidrato por litro. Los erlenmeyers fueron colocados en un agitador orbital (LAB-LINE, India) a 120 rpm con iluminación natural y permanecieron en agitación durante 5 a 7 días a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ (Fig. 6). Una vez formadas las esferas de micelio se filtraron a través de una tela tipo tul esterilizada, extrayendo por presión la mayor cantidad posible de medio líquido para lograr la deshidratación del mismo (Fig. 7). El micelio deshidratado, obtenido de cada aislamiento fue conservado dentro de pequeños sobres de papel metalizado y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante un kit comercial Wizard Genomic (Promega Inc., EE.UU.) según el protocolo e indicaciones del proveedor.



Figura 6. Agitador orbital de erlenmeyers con micelio de aislamientos en caldo de papa, creciendo en agitación en condiciones de laboratorio a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y luz natural.

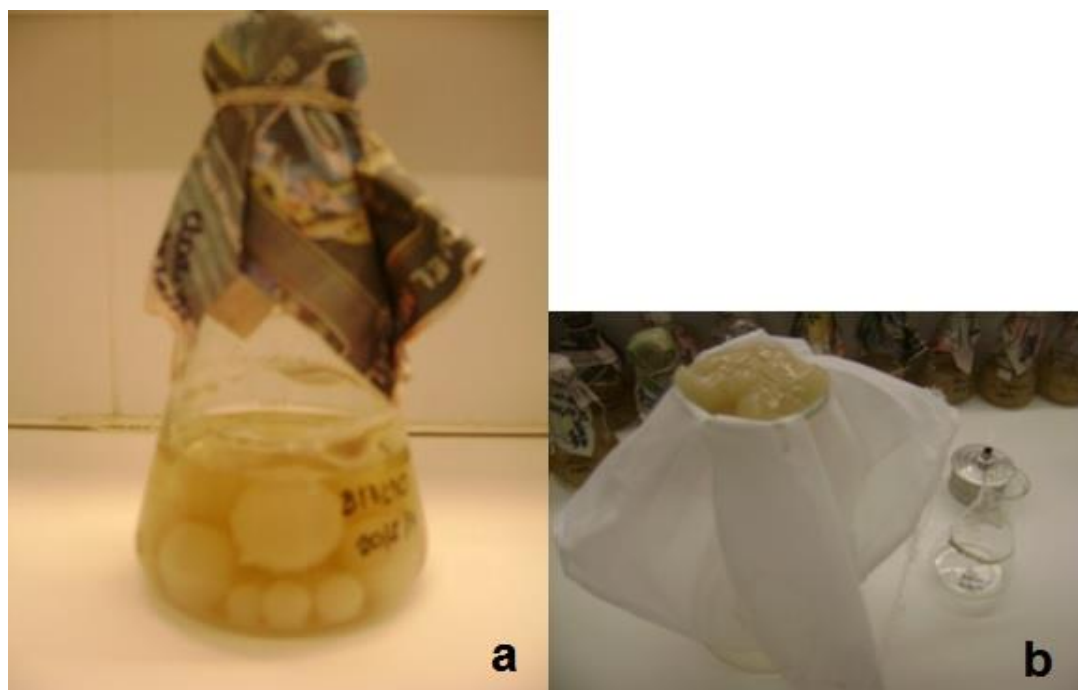


Figura 7. a) Erlenmeyer con micelio crecido en caldo de papa luego de 5 días de desarrollo. b) filtrado del micelio con tela tipo tul.

La amplificación selectiva por PCR de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del rADN se realizó con los iniciadores universales ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1997; 1998). Las reacciones de amplificación fueron realizadas con un termociclador Veriti (Applied Biosystems, EE.UU.). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 2 mM MgCl₂; 0.2 mM de dNTPs; 0.2 μM de cada iniciador; 2 unidades de Taq Platinum (Invitrogen, EE.UU.); 1x de buffer de PCR y 30 ng de ADN genómico en un volumen final de 50 μl. El programa de PCR constó de 1 ciclo a 96 °C durante 5 min, 34 ciclos a 94 °C durante 45 seg, 53 °C durante 30 seg y 72 °C durante 90 seg, con una extensión final a 72 °C durante 7 min.

Un control negativo (sin ADN) fue incluido para detectar cualquier contaminación con ADN exógeno. Los productos de amplificación se verificaron por electroforesis en gel de agarosa (1 %) y se visualizaron con luz UV en un trans-iluminador ImageQuant (GE, Suiza). Como control positivo se utilizó una cepa de referencia (B13B3) de la especie *Dc* de la colección de hongos del Laboratorio de Patología Vegetal de la UIB, caracterizada por su morfología y patogenicidad (Sánchez *et al.*, 2015; Montoya y Ridao, 2014), y comparada con el aislamiento control positivo de la especie *Dc* (Gen Bank # HM625758) de la colección de hongos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (Sánchez *et al.*, 2015).

Los amplicones fueron digeridos con enzimas de restricción *Alu* I, *Hha* I, *Rsa* I

(Thermo Scientific, EE.UU.) y *Mse* I (BioLabs, Canada) con el fin de diferenciar las especies (Zhang *et al.*, 1997; 1998).

Se trabajó con un volumen final de 15,5 µl en cada digestión: 5 µl de producto de PCR; 0,5 µl de enzima; 1,5 µl de Buffer Tango 10x para *Alu* I, *Hha* I y *Rsa* I y Buffer CutSmart 10x (#B7204S) para *Mse* I; completando con 9 µl de H₂O destilada estéril. La reacción se incubó a 37 °C durante 3 horas y los resultados se analizaron en gel de agarosa (2,5 %), y se visualizaron con trans-iluminador UV (ImageQuant; GE, Suiza). Se utilizaron dos marcadores de peso molecular de 100 y 50 pb (Ladder Plus Presicion; PB-L Productos; Bio-lógicos, Argentina).

Los patrones de bandas obtenidos se compararon con los descritos por Zhang *et al.* (1998) y con los de Riccioni *et al.* (2009) para las distintas especies del complejo (Fig.8).

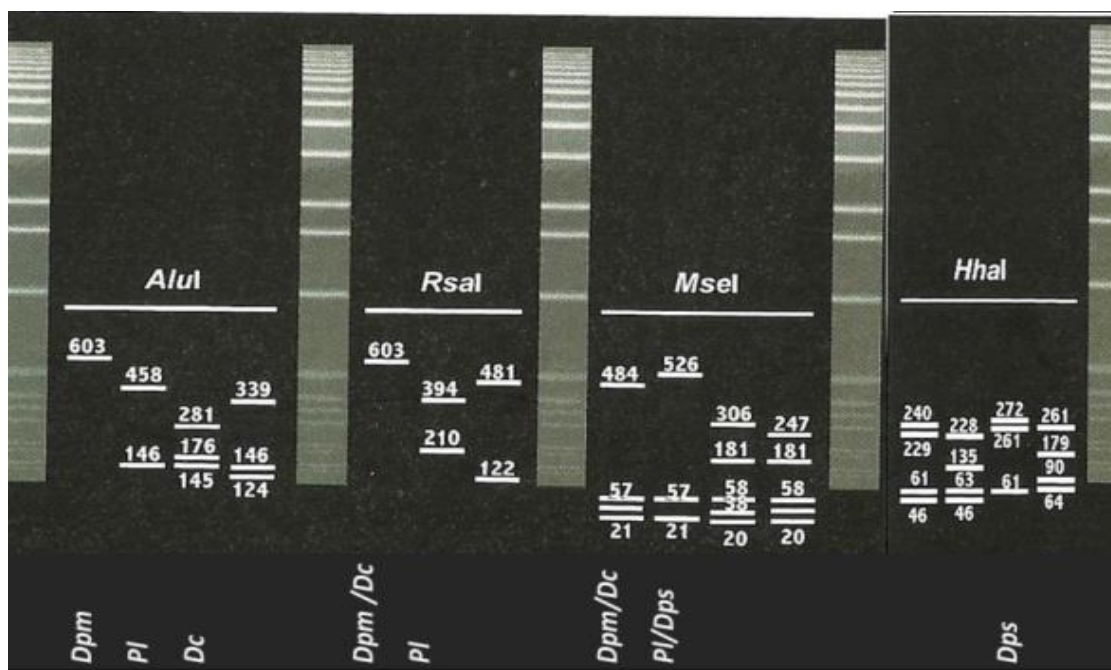


Figura 8. Patrones electroforéticos de bandas de restricción de los productos de la amplificación por PCR de las regiones ITS del ADNr de las especies *Diaporthe/Phomopsis* digeridos con las enzimas de restricción: *Alu* I, *Rsa* I, *Mse* I y *Hha* I (*Dpm*: *D. phaseolorum* var. *meridionalis*; *Dc*: *D. caulivora*; *PI*: *P. longicolla*; *Dps*: *D. phaseolorum* var. *sojae*) (Adaptado de Riccioni, L., 2009).

RESULTADOS

Ninguna muestra presentó peritecios esporulantes al momento de la evaluación inicial, independientemente del periodo de permanencia del rastrojo en el campo.

Debido a la dificultad que se encontró para diferenciar y clasificar los peritecios producidos por *Dc* de los de otras especies del complejo *D/P*, posiblemente presentes en los fragmentos de tallo, se realizó el conteo total de peritecios. El número promedio de peritecios para todos los periodos evaluados fue de 188,66 peritecios/cm² (Fig. 9).

No se observó efecto del cultivar ($P=0,38$), del periodo de permanencia del rastrojo ($P=0,51$) ni su interacción ($P=0,20$) sobre la cantidad total de peritecios.

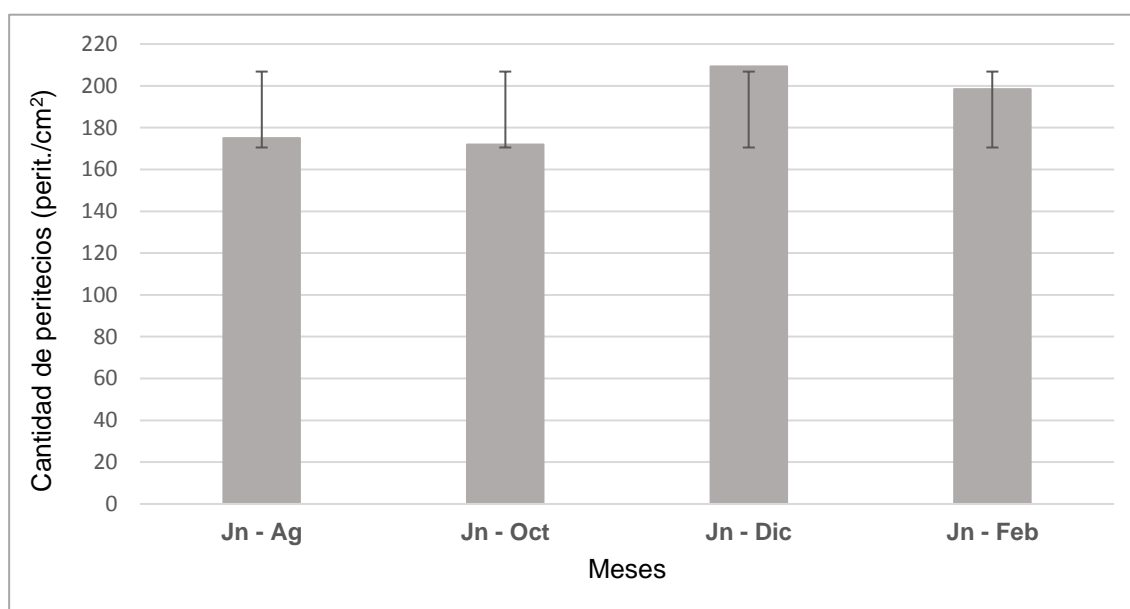


Figura 9. Efecto del periodo de permanencia (Jn–Ag: junio-agosto de 2015; Jn–Oct: junio-octubre de 2015, Jn–Dic: junio-diciembre de 2015 y Jn–Feb: junio 2015-febrero 2016) en el campo de la Unidad Integrada Balcarce, de rastrojo de soja naturalmente infectado por *Diaporthe caulivora* en el campo sobre la cantidad de peritecios / cm² desarrollados después de 26 días de incubación en condiciones controladas.

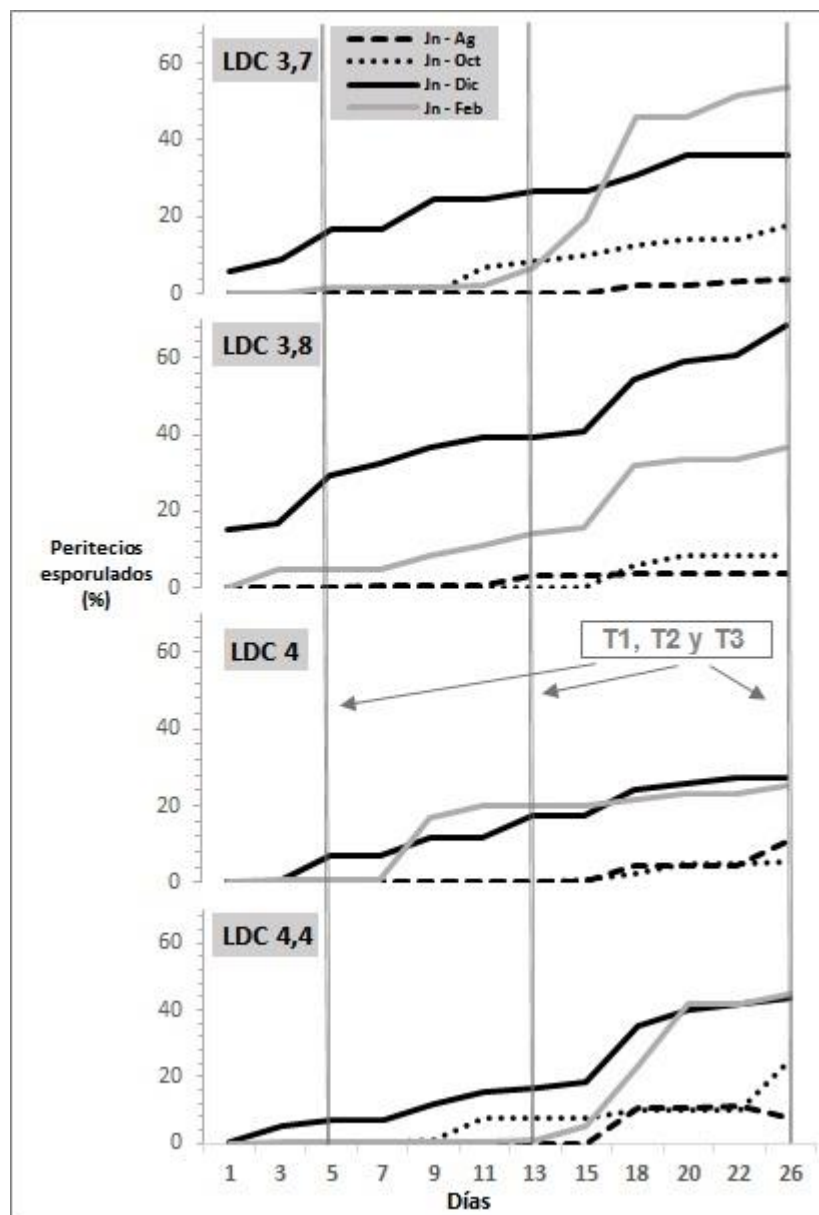


Figura 10. Efecto del periodo de permanencia (Jn – Ag: junio-agosto de 2015, Jn – Oct: junio-octubre de 2015, Jn – Dic: junio-diciembre de 2015 y Jn – Feb: junio 2015-febrero 2016) en el campo de la Unidad Integrada Balcarce, de rastrojo de soja naturalmente infectado por *Diaporthe caulivora* sobre el porcentaje de peritecios esporulados desarrollados durante 5, 13 y 26 días de incubación (T1, T2 y T3 respectivamente) en condiciones controladas para cuatro cultivares de soja (LDC 3,7, LDC 3,8, LDC 4, LDC 4,4).

A los 5, 13 y 26 días de incubación (T1, T2 y T3), respectivamente, no se observó efecto significativo del cultivar ($P=0,22$; $P=0,55$ y $P=0,43$) ni de la interacción período x cultivar ($P=0,44$; $P=0,52$ y $P=0,56$) sobre el porcentaje de peritecios esporulados (Figura 10).

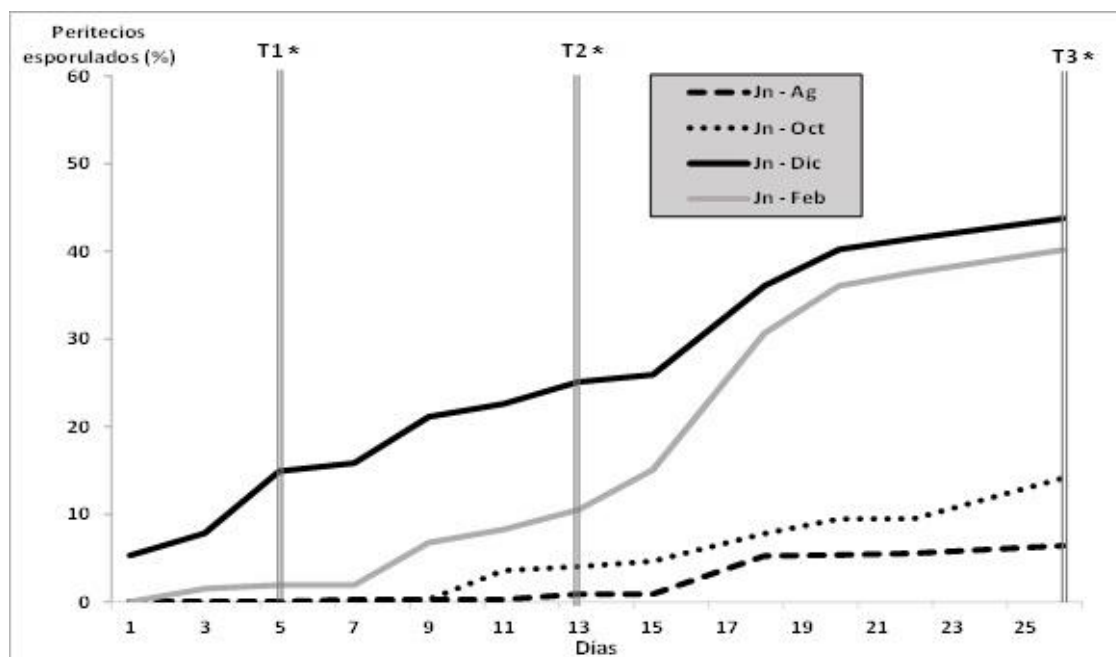


Figura 51. Efecto del periodo de permanencia (Jn – Ag: junio-agosto de 2015, Jn – Oct: junio-octubre de 2015, Jn – Dic: junio-diciembre de 2015 y Jn – Feb: junio 2015-febrero 2016) en el campo de la Unidad Integrada Balcarce, de rastreo de soja naturalmente infectado por *Diaporthe caulivora* sobre el porcentaje de peritecios esporulados desarrollados durante 5, 13 y 26 días de incubación (T1, T2 y T3 respectivamente) en condiciones controladas. Datos promedio de cuatro cultivares (LDC 3,7, LDC 3,8, LDC 4, LDC 4,4). * indica efecto del periodo de permanencia del rastreo significativo ($P \leq 0,05$).

El porcentaje de peritecios esporulados muestra el efecto del periodo de permanencia del rastreo en el campo, tanto a los 5 como a los 13 y 26 días de incubación ($P=0,01$; $P=0,03$ y $P=0,03$, respectivamente; Figura 11). El periodo Jn-Dic fue el que presentó mayor porcentaje de peritecios esporulados (Test HSD de Tukey, $P < 0,05$) (Figura 11, Tabla 2), aunque no difirió significativamente del periodo Jn-Feb a los 13 y 26 días de incubación. El periodo Jn-Feb adoptó valores intermedios, no difiriendo del resto de los periodos a los 13 días, mientras que para los 26 días de incubación no presentó diferencias con Jn-Dic, ni con Jn-Oct.

Tabla 2. Efecto del periodo de permanencia (Jn – Ag: junio-agosto de 2015, Jn – Oct: junio-octubre de 2015, Jn – Dic: junio-diciembre de 2015 y Jn – Feb: junio 2015-febrero 2016) en el campo de la Unidad Integrada Balcarce, de rastreo de soja naturalmente infectado por *Diaporthe caulivora* sobre el porcentaje de peritecios esporulados desarrollados durante 5, 13 y 26 días de incubación (T1, T2 y T3 respectivamente) en condiciones controladas.

Periodo	Días de incubación		
	5 (T1)	13 (T2)	26 (T3)
Junio - Agosto	0,0 ^a	0,9 ^a	6,4 ^a
Junio - Octubre	0,0 ^a	4,0 ^a	14,1 ^{ab}
Junio - Diciembre	14,9 ^b	25,1 ^b	43,8 ^c
Junio - Febrero	1,9 ^a	10,5 ^{ab}	40,2 ^{bc}
EE	1,5	3,0	4,3

^{a,b,c} Letras en superíndices iguales en un mismo momento de incubación indican diferencias no significativas ($P < 0,05$; Ajuste HSD de Tukey).

EE = Error estándar de la media de mínimos cuadrados ($n=32$)

Cuando se calculó la cantidad de peritecios esporulados entre momentos de evaluación durante el periodo de incubación (la derivada del porcentaje de peritecios esporulados) solo se observó un pico de valores máximos a los 18 días de incubación. Los periodos de Jn-Dic y Jn-Feb mostraron valores mayores en relación con los periodos de Jn-Ag y Jn- Oct (Fig. 12).

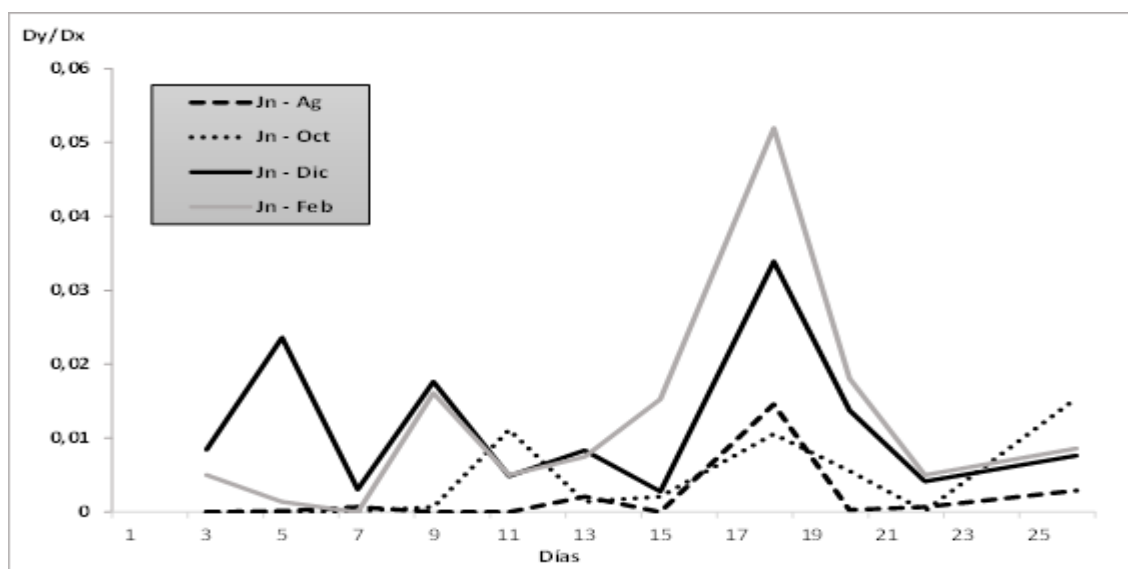


Figura 12. Derivada del porcentaje de peritecios esporulados, desarrollados durante 26 días de incubación en condiciones controladas, para cuatro periodos de permanencia en el campo de la Unidad Integrada Balcarce (Jn-Ag: junio-agosto 2015, Jn-Oct: junio-octubre 2015, Jn-Dic: junio-diciembre 2015 y Jn-Feb: junio 2015-febrero 2016), en rastreo de soja con síntomas de cancro del tallo por *Diaporthe caulivora*, naturalmente infectados.

La ocurrencia de días favorables para la liberación de ascosporas de *Dc* (serie climática 1980-2015) mostró una probabilidad mayor para los periodos de Jn-Dic y Jun-Feb en comparación con los restantes. Asimismo estos tratamientos fueron los que presentaron mayor porcentaje de peritecios esporulados para periodos de 1 a 7 días de condiciones favorables para la descarga de las ascosporas (Fig. 13).

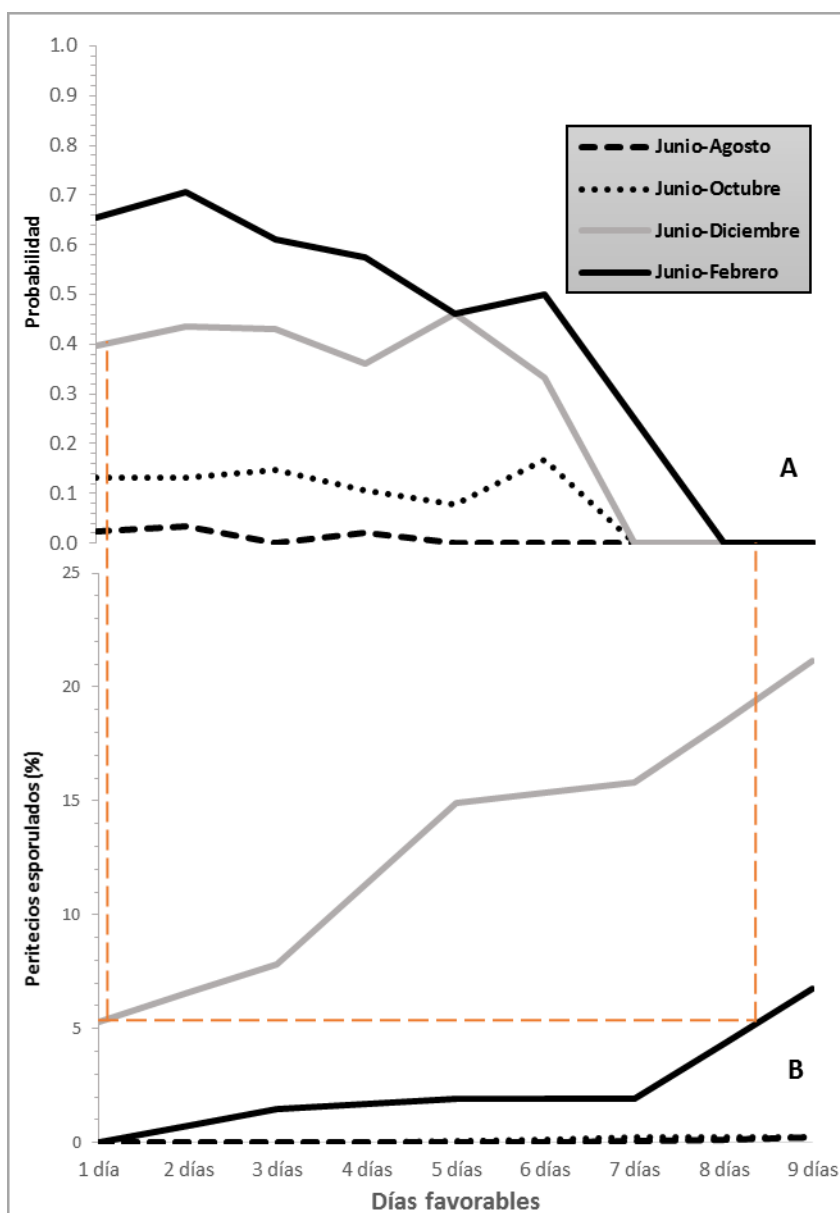


Figura 13. Probabilidad de ocurrencia de días favorables para la producción de ascosporas (A) y porcentaje de peritecios esporulados (B) para cuatro periodos de permanencia (Junio-Agosto 2015, Junio-Octubre 2015, Junio-Diciembre 2015 y Junio 2015-Febrero 2016) en el campo de la Unidad Integrada Balcarce, del rastrojo de soja con síntomas de cancro del tallo por *Diaporthe caulivora*, naturalmente infectados

Si se considera la probabilidad de ocurrencia de días favorables y el porcentaje registrado de peritecios maduros esporulados, se puede determinar la probabilidad de ocurrencia de un determinado porcentaje de peritecios esporulados para alguno de los cuatro periodos evaluados. Un valor aproximado al 5 % de peritecios esporulados se corresponde con una probabilidad del 40 % de ocurrencia de días favorables para la esporulación para el periodo Jn-Dic y para el periodo Jn-Feb la probabilidad de ocurrencia de días favorables es nula. Para los periodos restantes (Jn-Ago y Jn-Oct), los porcentajes de peritecios esporulados fueron también nulos (Fig. 13).

Caracterización molecular mediante PCR-RFLP de aislamientos de *Diaporthe/Phomopsis* obtenidos de los rastrojos

La amplificación de la región ITS realizada por PCR generó como resultado un fragmento de aproximadamente 600pb. Esto fue similar para los aislamientos B15B12, B15B13, B15B14, B15B15, B15B16, B15B18, B15B19, B15B113, B15B21, B15B22, B15B23, B15B25, B15B26, B15B28, B15B32, B15B33, B15B34, B15B35, B15B41,

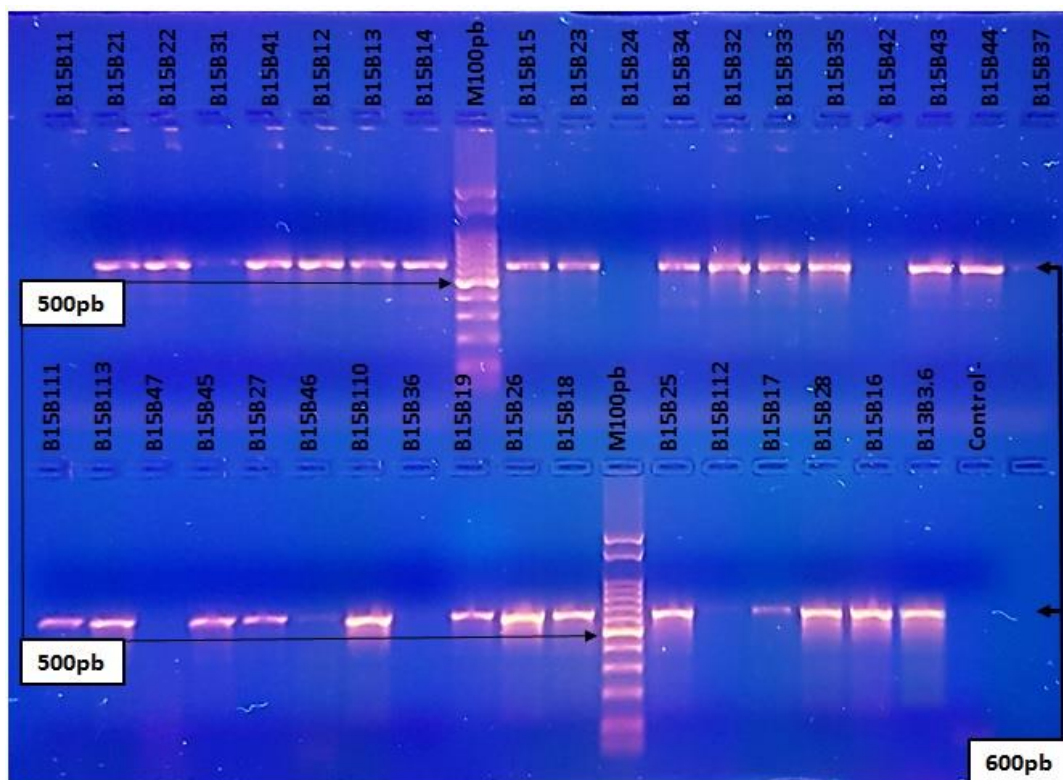


Figura 14. Resultados de la amplificación de la región ITS con los iniciadores ITS 4 e ITS 5 de 35 aislamientos punta de hifa provenientes de la incubación de rastrojo de soja con síntomas de cancro del tallo por *Diaporthe caulivora*, naturalmente infectado, más el control *D. caulivora* (B13B3.6 = Gen Bank # HM625758) y un control (-). Los códigos de cada aislamiento y los controles se indican en la parte superior de cada calle del gel de agarosa.

B15B43, B15B44, B15B110, B15B111, B15B27, B15B45 y el aislamiento de referencia B13B3 (*D. caulivora*). En los aislamientos B15B11, B15B17, B15B112, B15B24, B15B31, B15B36, B15B37, B15B42, B15B46 y B15B47 no se detectó ninguna banda de amplificación o fue muy débil, lo que pudo deberse a una baja cantidad de ADN extraído o a alguna falla en la PCR (Fig. 14).

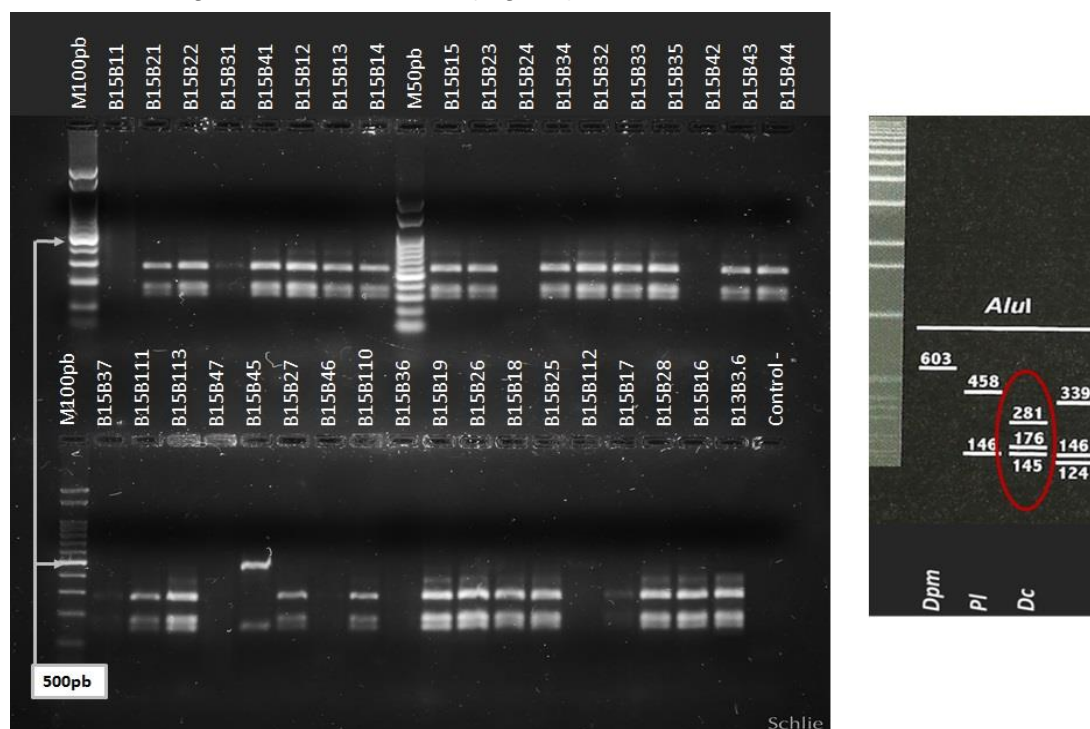


Figura 15. Patrones de bandas de restricción de los productos de la amplificación de la región ITS del ADNr de los aislamientos digeridos con la enzima *Alu* I, incluidos el control *Diaporthe caulivora* (B13B3.6 = Gen Bank # HM625758) y un control (-). Los códigos de cada aislamiento y los controles se indican en la parte superior de cada calle del gel de agarosa. M100 pb y M50 pb: Marcadores de Peso Molecular cada 100 y cada 50 pares de bases, respectivamente. A la derecha se muestra un esquema del patrón de tamaños de banda en pb característico de la enzima *Alu* I para diferenciar a *Dpm* (*D. phaseolorum* var. *meridionalis*), *Pl* (*Phomopsis longicolla*) y *Dc* (*D. caulivora*).

La digestión de los productos de la PCR con las enzimas *Alu* I, *Hha* I, *Rsa* I y *Mse* I permitió diferenciara las especies de *Diaporthe*, según los patrones de bandas descritos por Zhang *et al.* (1998) y Riccioni *et al.* (2009) y entre ellas la pertenencia de los aislamientos semejantes a *Dc*.

En el análisis de restricción de los productos de PCR de la región ITS, la enzima *Alu* I arrojó patrones distintivos para la mayoría de los aislamientos. Veinticuatro de los cuales (B15B12, B15B13, B15B14, B15B15, B15B16, B15B18, B15B19, B15B113, B15B21, B15B22, B15B23, B15B25, B15B26, B15B28, B15B32, B15B33, B15B34, B15B35, B15B41, B15B43, B15B44, B15B110, B15B111, B15B27) presentaron tres bandas claramente definidas de 280, 175 y 145 pb (Fig. 15) por lo que corresponderían

a *Dc* de acuerdo a esta herramienta disponible.

Los patrones de restricción de las demás enzimas (*Hha* I, *Rsa* I y *Mse* I) también fueron positivos para *Dc* para estos mismos aislamientos, lo que permitió la caracterización (Fig. 16, 17 y 18). En los casos de los aislamientos B15B14, B15B33, B15B34 y B15B44 los patrones *Hha* I solo sirvieron para la confirmación de lo observado para *Alu* I (Fig. 16).

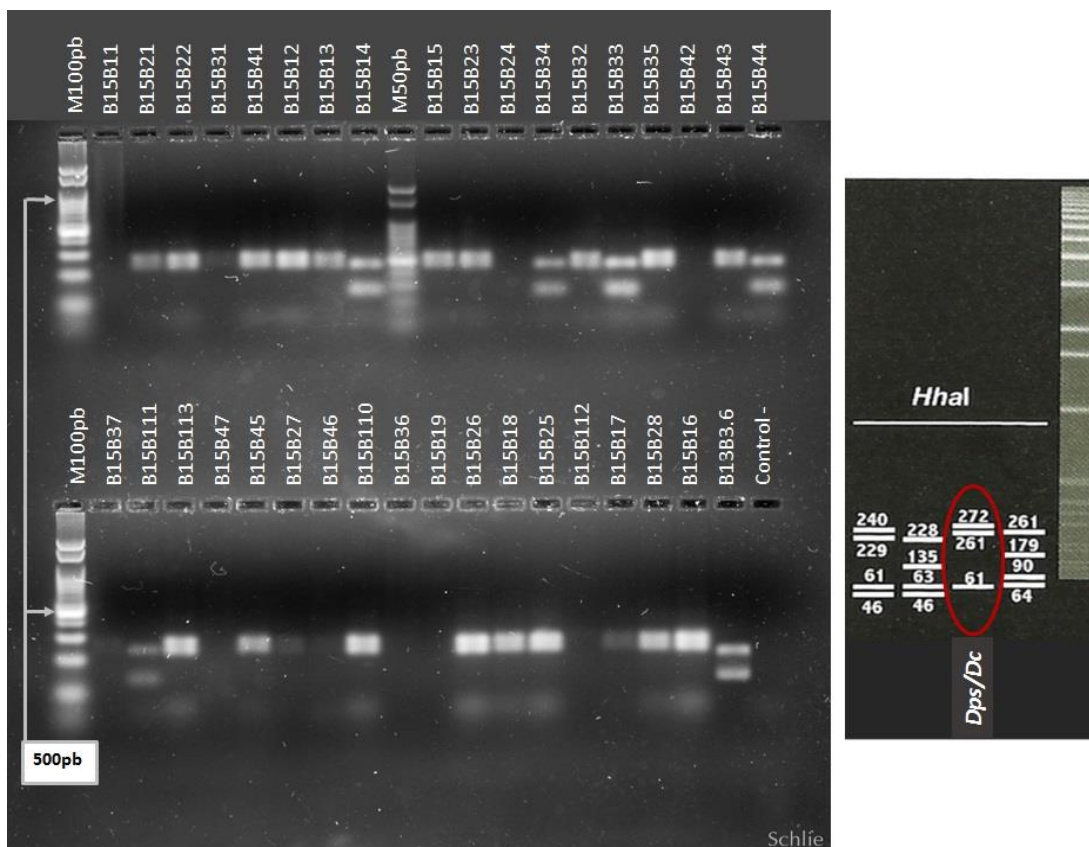


Figura 16. Patrones de bandas de restricción de los productos de la amplificación de la región ITS del ADNr de los aislamientos digeridos con la enzima *Hha* I, incluidos el control *Diaporthe caulivora* (B13B3.6 = Gen Bank # HM625758) y un control (-). Los códigos de cada aislamiento y los controles se indican en la parte superior de cada calle del gel de agarosa. M100 pb y M50 pb: Marcadores de Peso Molecular cada 100 y cada 50 pares de bases, respectivamente. A la derecha se muestra un esquema del patrón de tamaños de banda en pb característico de la enzima *Hha* I para diferenciar a *Dps* (*D. phaseolorum* var. *sojae*)/*Dc* (*D. caulivora*).

El aislamiento B15B45 fue clasificado como *PI* ya que al ser digerido por la enzima *Alu* I presentó dos bandas de aproximadamente 460 y 145 pb (Fig. 15). Por otra parte, el patrón de restricción de *PI* al ser digerido por *Hha* I debe presentar dos bandas de 260 y 228 pb (más otras de menor tamaño), hecho que no ocurrió con B15B45 (Fig. 16), por lo que su clasificación debió ser confirmada mediante otras enzimas de restricción. Este aislamiento pudo ser determinado mediante *Rsa* I, ya que presentó dos bandas de 390/400 y 210 pb (Fig. 17) y *Mse* I con la cual se obtienen bandas de 526, 57 y 21 (poco

visible) (Fig. 18).

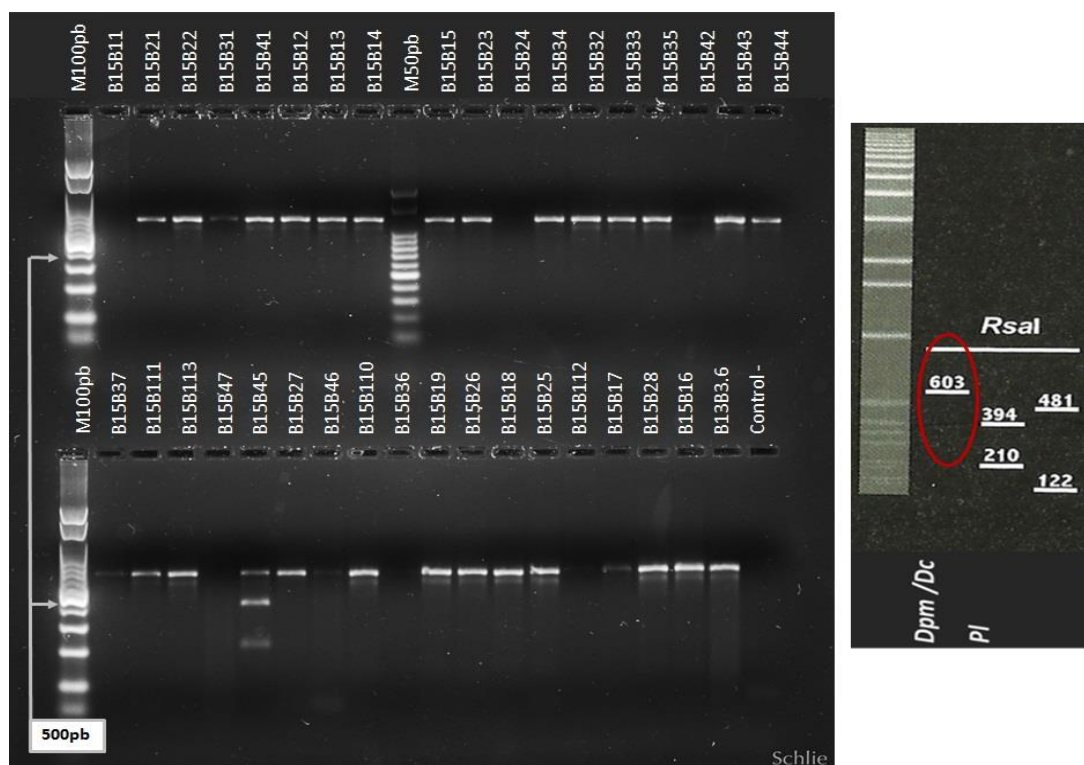


Figura 17. Patrones de bandas de restricción de los productos de la amplificación de la región ITS del ADNr de los aislamientos digeridos con la enzima *Rsa* I, incluidos el control *Diaporthe caulivora* (B13B3.6 = Gen Bank # HM625758) y un control (-). Los códigos de cada aislamiento y los controles se indican en la parte superior de cada calle del gel de agarosa. M100 pb y M50 pb: Marcadores de Peso Molecular cada 100 y cada 50 pares de bases, respectivamente. A la derecha se muestra un esquema del patrón de tamaños de banda en pb característico de la enzima *Rsa* I para diferenciar a *Dpm* (*Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*)/*Dc* (*D. caulivora*) de *PI* (*Phomopsis longicolla*).

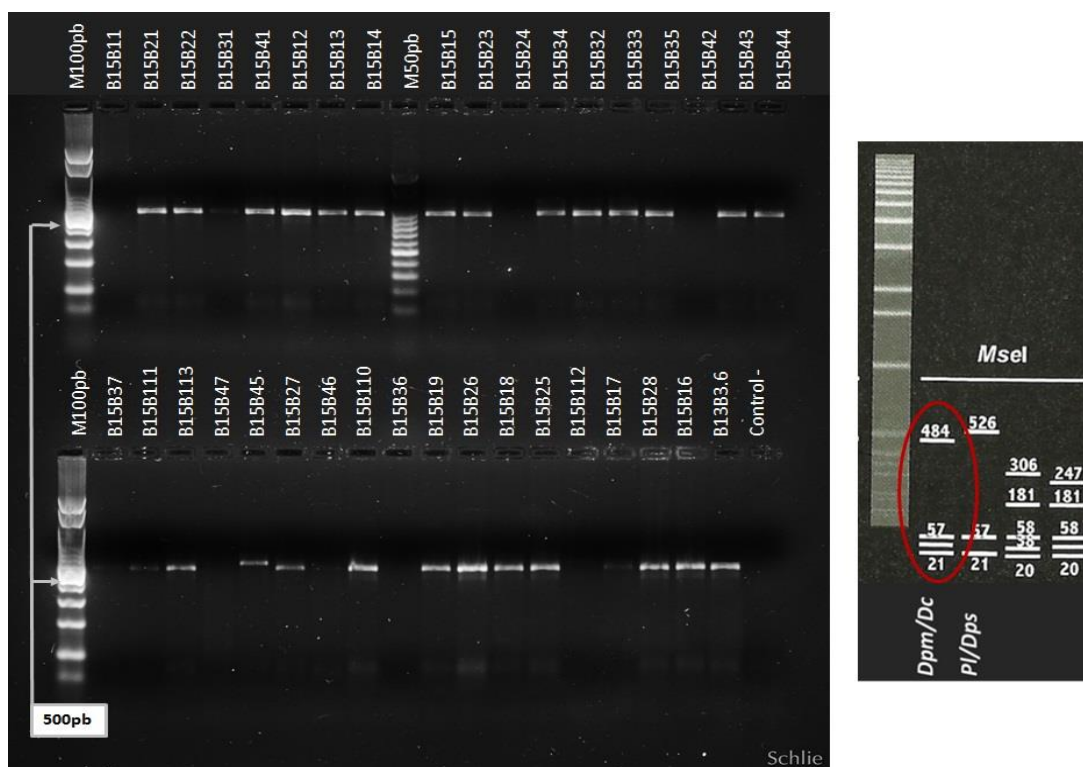


Figura 18. Patrones de bandas de restricción de los productos de la amplificación de la región ITS del ADNr de los aislamientos digeridos con la enzima *Mse* I, incluidos el control *Diaporthe caulivora* (B13B3.6 = Gen Bank # HM625758) y un control (-). Los códigos de cada aislamiento y los controles se indican en la parte superior de cada calle del gel de agarosa. M100 pb y M50 pb: Marcadores de Peso Molecular cada 100 y cada 50 pares de bases, respectivamente. A la derecha se muestra un esquema del patrón de tamaños de banda en pb característico de la enzima *Mse* I para diferenciar a *Dpm* (*D. phaseolorum* var. *meridionalis*)/*Dc* (*D. caulivora*) de *Pl* (*Phomopsis longicolla*)/*Dps* (*D. phaseolorum* var. *sojae*).

No se observó la formación de picnidios en las colonias de ninguno de los aislamientos caracterizados por morfología y molecularmente mediante PCR-RFLP, como *Dc*.

DISCUSIÓN

La abundancia de rastrojo en superficie por la siembra directa, la alta homogeneidad en la variabilidad genética de los materiales de soja sembrados y la ausencia de rotaciones han contribuido con la sobrevivencia de *Dc* en la región sojera sur de Argentina como en otras áreas del mundo. Grijalba y Ridao (2012) determinaron la alta capacidad saprofítica de *Dc* al demostrar la colonización y desarrollo del hongo en rastrojos de distintos cultivos que pueden ser incluidos en la secuencia con soja, como girasol, trigo, sorgo, papa y maíz.

En el rastrojo infectado traído directamente desde el campo no se registraron estructuras reproductivas al ser observado a la lupa sin importar el tratamiento. En todos los tratamientos probados (periodos de permanencia en el campo) se desarrollaron peritecios de *Dc* sobre los tallos de rastrojos independientemente del genotipo de soja. Esto sólo ocurrió luego de la incubación en condiciones controladas en laboratorio. Estudios realizados por Grijalba en 2010 mostraron la formación de peritecios de *Dc* aún bajo condiciones de sequía, mientras que Subbarao *et al.* (1992b) mencionan haber observado la presencia de peritecios esporulados y ciclos secundarios del patógeno en condiciones de campo. Cabe aclarar que en Baton Rouge, LA, Estados Unidos, donde se realizaron los estudios de Subbarao y colaboradores, se menciona la formación de picnidios de *Dc*, y por lo tanto de inóculo secundario (picnidiosporas), algo que aún no ha sido encontrado en condiciones de campo en Argentina.

El volumen de rastrojo de soja presente en el campo puede influir en la cantidad de inóculo sobreviviente al invierno que esté disponible para infectar en la campaña siguiente (Frosheiser *et al.*, 1957). En condiciones de clima favorable para la ocurrencia de epifitas sería conveniente contar con registros de inóculo disponible directamente en el lote como indicador de riesgo potencial (Grijalba, 2010). En este sentido, las especies del complejo *D/P* utilizan para sobrevivir el invierno, rastrojos provenientes de sistemas de labranza mínima, de los cuales son más frecuentemente aisladas (Baird *et al.* 1997). Sumado a estos estudios, Rothrock *et al.* (1985; 1988) aislaron con mayor frecuencia *Dc* en lotes provenientes de siembra directa, por su parte, Lago (2010) reportó que los lotes donde se había realizado monocultivo de soja en siembra directa presentaron mayor incidencia de la enfermedad. Según observaciones de A. Ridao (com. pers., 2017) en el centro y sudeste bonaerense desde 2003/04 se han registrado epifitias de CTSc independientemente del sistema de siembra (directa o convencional) y de la secuencia de cultivos.

Subbarao *et al.* (1992a) mencionaron que el material utilizado en sus estudios (rastrajo de soja), con solo dos semanas de almacenamiento ya tenía peritecios formados en los entrenudos, lo que indica que no sería necesaria una etapa de maduración invernal para su formación. Esta observación no ha sido registrada en las condiciones locales, ya que tallos con canchales han permanecido almacenados en ambientes secos durante varios años con micelio inactivo, y solo después de que se le brindaron las condiciones de humedad y temperatura adecuadas, se desarrollaron peritecios (Ridao, A. com. pers., 2017).

Los análisis del número final de peritecios entre los diferentes periodos de exposición durante el invierno y primavera no mostraron diferencias significativas. Esto indica que la cantidad de inóculo disponible para la próxima campaña estaría determinada por una corta etapa de maduración otoño-invernal, coincidiendo con lo mencionado por Subbarao *et al.* (1992a).

Backman *et al.* (1985), Lago (2010) y Ridao (2012a) por medio de ensayos de fechas de siembra, sugirieron que habría agotamiento del inóculo primario, por lo cual el atraso de la siembra podría ser usado como estrategia de escape. Lo contrario fue expuesto por Ploper *et al.* (1999) quienes al trabajar con *Dpm* en ensayos de fecha de siembra en ambientes con mayores temperaturas, no evidenciaron agotamiento del inóculo primario y el efecto en el atraso de la fecha de siembra fue bajo. Estos resultados contrarios se condicen con lo expresado por diversos autores que sostienen que el atraso de la fecha de siembra no es garantía de escape a la enfermedad debido a la gran dependencia de las condiciones ambientales que posee *Dc* para desarrollar su ciclo de patogénesis (Damicone *et al.*, 1987; Smith y Backman, 1989; Subbarao *et al.*, 1992a y 1992b).

Los trabajos realizados por Subbarao *et al.* (1992a) en condiciones controladas determinaron que el número de peritecios esporulados aumentó hasta los 28 días, coincidiendo con lo observado en esta tesis para los cuatro tratamientos evaluados en un periodo de 26 días de incubación. A esto se suma que para los mismos autores la humedad relativa fue un factor de importancia en la producción de ascosporas, algo que también quedó en evidencia en el presente estudio ya que las condiciones de alta humedad relativa a la que fueron expuestos los rastrojos extraídos del campo devinieron en valores crecientes del porcentaje de peritecios esporulados conforme avanzaban los días de incubación.

Estudios realizados en cámaras de incubación por Subbarao *et al.* (1992a) registraron una tasa de esporulación de peritecios de *Dc* máxima a los 21 días de

incubación. Resultados similares mostraron valores máximos en los aumentos de las tasas de porcentaje de peritecios esporulados a los 18 días de incubación.

Los resultados sobre la relación entre la probabilidad de ocurrencia de días favorables para la esporulación de peritecios y el porcentaje de peritecios esporulados bajo condiciones controladas pueden explicar las situaciones que normalmente acontecen en el sudeste bonaerense. En esta región los niveles de prevalencia de la enfermedad son altos y los porcentajes de incidencia relativamente bajos en la mayoría de los años. En este sentido los estudios realizados en la campaña 2006/07 confirman esta situación ya que en el 61 % de los lotes evaluados la incidencia fue inferior al 10 % pero con una prevalencia del 94 % (Ridao y Lago, 2007). Sin embargo, en años donde las condiciones para la esporulación e infección son conducentes, como las campañas 2003/04 o 2006/07, las epifitias de CTSc se hacen presentes en la región sojera sur del país.

El género *Diaporthe* fue introducido por Nitschke (1870) con *D. eres* como especie tipo, se sitúa en la familia Diaporthaceae, orden Diaporthales, en la clase Sordariomycetes (Maharachchikumbura *et al.*, 2015). Durante muchos años las especies en *Diaporthe* fueron introducidas en gran parte sobre la base de su asociación con el hospedante, lo que dio lugar a una proliferación de nombres de especies. Sin embargo, ahora se reconoce que las especies no son específicas del hospedante y una sola especie puede ser encontrada en más de uno (Rehner y Uecker, 1994). Además, se pueden encontrar varias especies diferentes en un único hospedante (Mostert *et al.*, 2001). Dado que la morfología es de valor limitado en la definición de especies (Rehner y Uecker, 1994; Chi *et al.*, 2007; Hyde *et al.*, 2011), la taxonomía del género se basa en gran medida en la filogenia molecular, especialmente en la derivada de secuencias de ITS, tef1- α , β -tubulina y loci cal (Udayanga *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2013). Así, todos los nombres de las especies más antiguas vinculadas a *Diaporthe* o *Phomopsis*, y para las cuales no se dispone de datos de secuencias de ADN o de cultivos, no se los vincula a las especies de este género.

Dado que los caracteres morfológicos son considerados insuficientes para definir especies en este género, y no poseemos las secuencias de ADN, esenciales para diferenciarlas, en este trabajo nos centramos además de los caracteres morfológicos, en la caracterización por técnicas moleculares tradicionales (PCR-RFLP) desarrolladas por Zhang *et al.*, 1997 y 1999, para caracterizar y diferenciar los aislamientos del complejo D/P en soja. Se tomó en cuenta los resultados obtenidos por Grijalba *et al.* (2011), que confirmaron la utilidad del uso de esta técnica (PCR-RFLP) para la

identificación precisa y rápida de *Dc*, y concluyeron que por sus características, este método puede ser implementado para análisis de rutina en laboratorios de pequeña y mediana escala.

En cuanto al aislamiento utilizado como control positivo, fue la cepa de referencia B13B3 de la especie *Dc* de la colección de hongos del Laboratorio de Patología Vegetal de la UIB, caracterizada previamente por su morfología y patogenicidad (Sánchez *et al.*, 2015; Montoya y Ridao, 2014), y comparada con un aislamiento de la colección de hongos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires cuya secuencia figura en el Gen Bank # HM625758 (Sánchez *et al.*, 2015), que será enviada a secuenciar.

En el presente estudio 24 de los 35 aislamientos analizados fueron caracterizados por morfología y molecularmente como *Dc*. Esto indica que la mayoría de los datos inferidos a partir de rastrojo de soja con síntomas de CTSc, naturalmente infectado por *Dc*, podrían provenir efectivamente de dicha especie, luego de permanecer durante los cuatro periodos en el campo de la UIB y desarrollar peritecios que esporularon a lo largo de 26 días de incubación en condiciones controladas.

En distintos estudios donde se utilizaron enzimas de restricción para el análisis de la región ITS del ADNr de aislamientos del complejo *D/P*, las enzimas *Alu* I, *Hha* I, *Mse* I y *Rsa* I presentaron los patrones distintivos de cada especie (Zhang *et al.*, 1997 y 1998; Fernández; Hanlin, 1996; Pioli *et al.*, 2003; Grijalba *et al.*, 2011; Rossi y Ridao, 2011; Sánchez *et al.*, 2015). Similares resultados se encontraron en la presente tesis ya que las cuatro enzimas permitieron la clasificación de la mayoría de los aislamientos como *Dc* y de un aislamiento como *Pl*. Esto último (*i.e.*, las especies determinadas) coincide también con análisis anteriores realizados con aislamientos de la misma región (Lago *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2015).

Los aislamientos B15B11, B15B17, B15B112, B15B24, B15B31, B15B36, B15B37, B15B42, B15B46 y B15B47 no pudieron ser reconocidos debido a la imposibilidad de generar una amplificación exitosa de la región ITS por medio de la PCR. Nuevas pruebas son necesarias a fin de determinar las especies de los mismos.

CONCLUSIONES

- a) Los resultados indican que en un rastrojo infectado con *Dc* se formaría similar cantidad de peritecios independientemente de la extensión del período de exposición a condiciones de campo.
- b) De acuerdo con la cantidad de peritecios logrados y el porcentaje de los que esporularon en los tallos con síntomas, en las condiciones ensayadas, se puede concluir que los cultivares LDC 3.7, LDC 3.8, LDC 4 y LDC 4.4 son similares en cuanto al nivel de tolerancia o resistencia frente a *Dc*.
- c) Las condiciones meteorológicas a las que estuvo expuesto el rastrojo infectado durante el período de Junio a Diciembre en el sudeste bonaerense demostraron ser condiciones inductivas óptimas para la producción del inóculo primario (ascosporas) de *Dc*.
- d) La suma de evidencias provistas por la sintomatología y características morfológicas y moleculares de los aislamientos obtenidos a partir de cirros de peritecios indicaría que la especie fue *Dc*. Se ratifica no solo la prevalencia de esta especie como el organismo causal del CTS en el sudeste bonaerense sino también la importancia del rastrojo como fuente de inóculo para la enfermedad.
- e) Ninguno de los aislamientos caracterizados como *Dc* formó picnidios en APDA.

CAPÍTULO II

MALEZAS INVERNALES COMO FUENTE DE INÓCULO DE *Diaporthe caulivora*

INTRODUCCIÓN

Las malezas pueden actuar como hospedantes de patógenos de los cultivos contribuyendo de esta manera a la persistencia en las áreas de producción y actuando como fuente de inóculo (Black *et al.*, 1996, Mengistu *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2011; 2015). Algunos géneros como *Datura*, *Geranium*, *Ipomoea* y *Solanum* son hospedantes alternativos para *Phytophthora infestans*, mientras que *Portulaca oleracea* ha sido citada como hospedante potencial de *P. capsici* (French-Monar *et al.*, 2006). También *Cyperus rotundus* L. y otras especies de malezas asociadas con el cultivo de maní han sido identificadas como hospedantes de *Sclerotinia minor* (Hollowell *et al.*, 2006).

El glifosato es uno de los herbicidas de mayor importancia a nivel mundial siendo utilizado para el control de malezas anuales y perennes. La utilización de este compuesto químico en los sistemas de labranza mínima y con cultivos genéticamente modificados ha contribuido significativamente a la selección de biotipos resistentes de malezas (Moreira *et al.*, 2007). Así, la importancia de las malezas en la región sojera núcleo argentina parece responder a la consolidación de un modelo productivo basado en escasas (o nulas) rotaciones y en una alta dependencia de un número reducido de herbicidas. El resultado de este modelo es la manifestación de numerosos casos de tolerancia así como de resistencia a glifosato y a otros herbicidas de uso frecuente. Entre las especies tolerantes a glifosato se pueden citar a *Commelina erecta*, *Parietaria debilis* y *Conyza bonariensis* y como especies resistentes, a *Sorghum halepense*, *Lolium multiflorum*, *L. perenne*, *Eleusine indica*, *Cynodon hirsutus* y *Echinochloa colona*. Además existen biotipos de *Amaranthus quitensis* y *Raphanus sativus* resistentes a herbicidas inhibidores de la acetolactato sintasa (Papa y Tuesca, 2013). La dificultad en su control afecta el rendimiento de los cultivos debido a la competencia directa por los recursos disponibles, esto puede llevar a disminuciones de hasta el 70 % en el cultivo de soja (Bedmar *et al.*, 2001).

En el sudeste bonaerense el rango de fechas de siembra para la soja se localiza desde principios de octubre para las siembras más tempranas, hasta principios de febrero para las más tardías. Las fechas de siembra más tempranas ubican temporalmente a las etapas vegetativas iniciales del cultivo junto con las últimas etapas de desarrollo de las malezas de crecimiento otoño-invierno-primaveral.

Diversas especies de cultivos o malezas han sido citadas como hospedantes de algún miembro del complejo *D/P* (Thompson *et al.*, 2015). Se ha reconocido que las

especies del género no son patógenos específicos, por ello una especie del complejo puede sobrevivir en diferentes hospedantes (Rehner y Uecker, 1994), como así también un mismo hospedante puede albergar distintas especies de *Diaporthe* (Gao, *et al.*, 2014). Se ha comprobado en inoculaciones asistidas en invernadero que *Dc* y *Dps* pueden causar síntomas en girasol. De igual manera, un aislamiento de *D. helianthi*, causante del cancro del tallo en girasol, produjo síntomas en dos cultivares de soja (Peruzzo *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta la superposición temporal entre el cultivo de soja y las malezas como posible fuente de inóculo de *Dc*, se puede identificar un escenario donde el riesgo de infección es elevado. Esto se debe a que coinciden en el tiempo una fuente de inóculo potencial, las malezas y/o sus rastrojos, y el periodo de mayor susceptibilidad para el cultivo de soja (Smith y Backman, 1989).

Resulta relevante generar información que permita determinar qué malezas de los sistemas agrícolas del sudeste bonaerense pueden actuar como hospedantes alternativos de *Dc*. Esta información indudablemente ayudaría a mejorar el diseño de estrategias para un manejo más eficiente de la enfermedad.

El objetivo del presente capítulo fue detectar malezas invernales prevalentes de los sistemas agrícolas del sudeste bonaerense donde *Dc* permanezca viable pudiendo persistir en los periodos sin cultivo de soja.

MATERIALES y MÉTODOS

Para cumplir con el objetivo se llevaron a cabo experimentos de inoculación con *Dc* de diversas especies bajo condiciones controladas.

Diez malezas invernales fueron seleccionadas por su importancia en los sistemas productivos agrícolas del sudeste bonaerense. Las especies elegidas fueron: *Ammi majus* (falsa biznaga), *Brassica rapa* (nabo), *Carduus acanthoides* (falso cardo), *Chamomilla recutita* (manzanilla), *Conyza sumatrensis* (rama negra), *Helianthus annuus* (girasol guacho), *Raphanus sativus* (nabón), *Rapistrum rugosum* (mostacilla), *Senecio vulgaris* (senecio) y *Sonchus oleraceus* (cerraña). Varios especímenes de cada especie fueron marcados en diferentes lotes de la UIB. Luego de madurez fisiológica, se cosecharon las semillas y se almacenaron a 4 °C y en condiciones de baja humedad para su posterior uso.



Figura 19. Cámaras húmedas para pruebas de germinación de *Raphanus sativus* (a) y *Helianthus annuus* (b).

Los rangos de temperatura y luz más favorables para el desarrollo de cada especie de maleza se determinaron en condiciones controladas. Para ello se llevó a cabo una prueba preliminar donde las semillas de cada especie se pusieron a germinar en cámaras húmedas (placas de Petri con una base de algodón y papel humedecido con agua destilada) (Fig. 19). La incubación se realizó dentro de una cámara de crecimiento.

A continuación se realizó el experimento de inoculación con *Dc* de las diez malezas, las cuales fueron trasplantadas a macetas de polietileno de 1,5 L de capacidad, con excepción de *C. acanthoides* que se trasplantó a macetas de 7 L debido a tamaño de su sistema radical (Fig. 20). El sustrato utilizado fue una mezcla compuesta de horizonte A de un suelo característico de la zona (Argiudol típico), arena de río y perlita (50:35:15). El diseño experimental fue completamente aleatorizado y la unidad experimental fue

una planta por maceta. Se utilizaron dos métodos de inoculación y por cada especie de maleza y método se inocularon 10 plantas, además de incluir un control sin *Dc*. Las macetas fueron colocadas en cámara de crecimiento a $18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y un fotoperiodo de 10 horas.

Todas las plantas provinieron de las semillas recolectadas en la campaña anterior (2015/2016). Las únicas excepciones fueron las de *C. acanthoides* y *S. vulgaris*, que fueron extraídas directamente del campo, trasplantadas a macetas en estado de plántula y luego llevadas a la cámara de crecimiento. Esto se debió a la desuniformidad de germinación de las semillas.



Figura 20. a) Plantas de *Carduus acanthoides* de 15 días trasplantadas a macetas de 7 L. b) Plántulas de *Rapistrum rugosum* de 7 días trasplantadas a macetas de 1,5 L.

Los dos métodos de inoculación utilizados fueron adaptados por M. Montoya (tesis doctoral, datos no publicados), mediante los cuales se ha logrado reproducir la enfermedad en un cultivar susceptible de soja (DM 3810) utilizando el mismo aislamiento, condiciones ambientales e infraestructura que se usaron en el presente trabajo. Como inóculo se usó el aislamiento *Dc* B13B3, de patogenicidad probada en ensayos conducidos en el Laboratorio de Patología Vegetal de la UIB (Montoya y Ridao, 2014).

Ambos métodos de inoculación fueron sin herida. El primero consistió en asperjar cada planta con 3 mL de una suspensión acuosa de 4×10^6 ascosporas/mL usando un atomizador manual. Las ascosporas se obtuvieron a partir de peritecios desarrollados *in vitro* sobre fragmentos de tallo de soja (4-5 cm de longitud). Estos tallos, previamente autoclavados a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 1 atm durante 20 min, se incubaron en cajas de Petri junto a discos de APDA colonizados por micelio del patógeno de una semana de crecimiento. Se mantuvieron durante 35 días en incubación a una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y alternancia de 12 h de luz NUV (longitud de onda cercana al ultravioleta) y 12 h de

oscuridad para inducir la producción de los peritecios. Luego se realizó un raspado de la superficie de los tallos para extraer los peritecios y el posterior lavado con agua destilada estéril (ADE) y filtrado con una gasa. A partir de esa suspensión se realizó el conteo de ascosporas mediante el uso de un hematocitómetro (cámara de Neubauer), para luego agregar ADE hasta obtener la concentración deseada. Para favorecer una correcta dispersión de las ascosporas, se agregó 0,01 % del volumen final de Tween 20® a la suspensión.

El segundo método de inoculación se basó en la aplicación sobre el tallo de un disco de APDA con micelio de *Dc* (0,5 cm de diámetro) de una semana de crecimiento activo. El disco fue protegido con algodón humedecido y cinta adhesiva rodeando al tallo (Fig. 21). Las plantas control recibieron discos de APDA sin micelio del patógeno.



Figura 61. a) Planta de *Senecio vulgaris* inoculada con disco de agar y micelio de *Diaporthe caulivora* de una semana de crecimiento activo, protegido con algodón humedecido y cinta adhesiva. b) Detalle del tallo inoculado.

Una vez realizada la inoculación, las macetas se mantuvieron con condiciones de humedad relativa cercana a 90 % durante 7 días, cubriendo cada planta con una bolsa de polietileno sujeta en la base de la maceta (Fig. 22).



Figura 22. Ensayo en macetas en cámara de crecimiento con plantas de malezas inoculadas y cubiertas con bolsas de polietileno.

A los 14 y 21 días se registró la incidencia de plantas con síntomas de cancro en los tallos. Entre los 60 y 80 días posteriores a la inoculación las plantas se cosecharon y guardaron en cámara fría a 6 °C para su posterior procesamiento. Porciones de tallo de cada planta fueron seccionados para aislar al patógeno (Fig. 23). En las plantas inoculadas con el método 1 (con ascosporas), se seccionaron dos porciones del tallo (8 cm centrales de la porción media superior del tallo y 8 cm centrales de la porción media inferior). De las plantas inoculadas con el método 2 (con micelio) se utilizó la porción del tallo comprendida entre los 4 cm por encima y 4 cm por debajo del punto donde se inoculó. Estas porciones de tallos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1 % durante un minuto y se incubaron en placas de Petri con APDA a 20 °C ± 2 con alternancia de 12 h de luz NUV y 12 h de oscuridad. Luego de 2 a 4 días de incubación se repicaron las distintas colonias en crecimiento para realizar la identificación correspondiente.



Figura 23. Porciones de tallos de *Rapistrum rugosum* inoculados con micelio de *Diaporthe caulivora* e incubados en placas de Petri con APDA.

Para el análisis estadístico de la infección se utilizó un modelo de regresión logística (Proc. LOGISTIC, SAS Studio v.3.6, SAS Institute Inc.). Se incluyeron al método, la especie y la interacción como efectos fijos. Se empleó el ajuste de Firth para corregir la separación completa de puntos. Las comparaciones múltiples se ajustaron por el método Tukey-Kramer.

RESULTADOS

A los 14 y 21 días se realizó una evaluación visual de síntomas externos (cancro en el tallo) y en ninguna de las especies se registraron síntomas (Fig. 24).



Figura 74. Plantas de *Chamomilla recutita* (a) y de *Senecio vulgaris* (b) inoculadas con *Diaporthe caulivora*, sin síntomas externos.

D. caulivora fue reaislado a partir de las porciones de tallos de 27 plantas en total. Nueve plantas inoculadas con el método de aspersión con ascosporas resultaron positivas: una de *Ch. recutita*, una de *C. sumatrensis*, cuatro de *R. rugosum* y tres de *S. vulgaris*. Mientras que con el método de inoculación con micelio las plantas afectadas fueron 18, pertenecientes a las especies *R. rugosum* (ocho), *S. vulgaris* (cuatro) y *H. annuus* (seis). El método de inoculación por micelio resultó en una mayor cantidad de unidades experimentales positivas a *Dc* en comparación con el método de inoculación por ascosporas, aunque no hubo diferencias significativas en la efectividad del método de inoculación, ni interacción con la especie ($p > 0,5$) (Tabla 3, Fig. 25).

Tabla 3. ANOVA del efecto de las especies de malezas, del método de inoculación y su interacción sobre la infección de *Diaporthe caulivora*.

Efecto fijo	NumDF*	Chi-cuadrado de Wald	Valor P**
Especie	9	31,1534	0,0003
Metodo de inoculación	1	0,4309	0,5116
Especie * Metodo de inoculación	9	7,9482	0,5394

*NumDF: grados de libertad. **valor de probabilidad con $\alpha = 0,05$

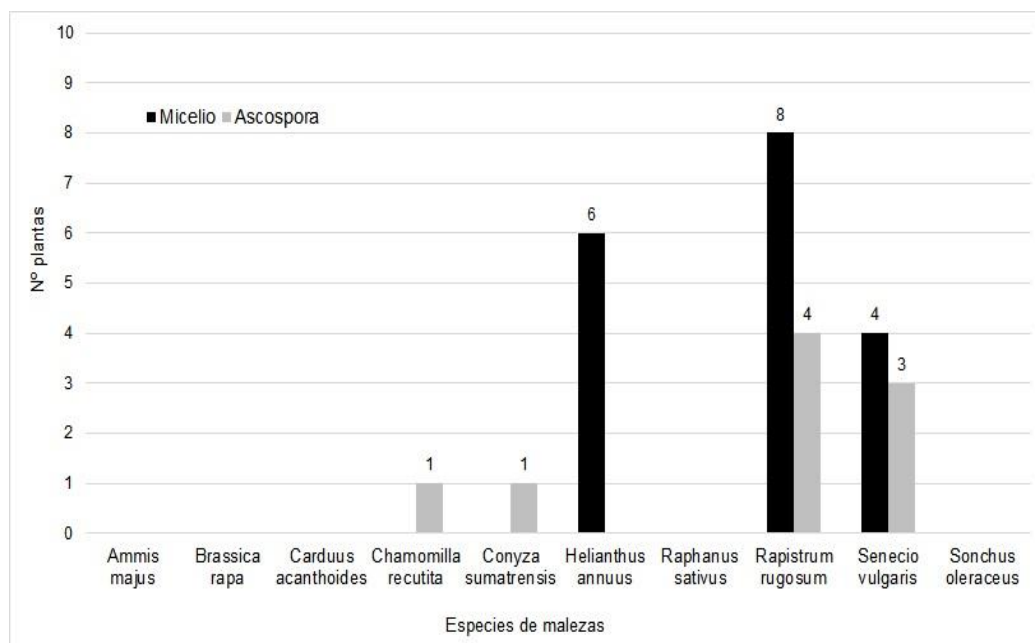


Figura 85. Número de plantas por especie de las cuales se reisoló *Diaporthe caulivora*, de diez malezas invernales prevalentes del sudeste bonaerense, inoculadas con dos métodos (micelio y ascosporas) luego de 60-80 días de incubación.

En la figura 26 se muestran colonias de *Dc* obtenidas a partir de tallos de *C. sumatrensis* y *R. rugosum*.

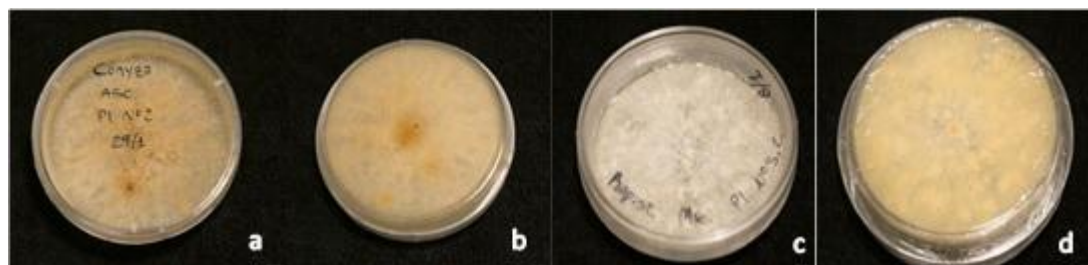


Figura 96. Anverso y reverso de colonias de *Diaporthe caulivora* reisoladas a partir de *Conyza sumatrensis* (a y b) y de *Rapistrum rugosum* (c y d) en APDA, incubadas en cámara de crecimiento durante 14 días a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$.

DISCUSIÓN

Todos los aislamientos fúngicos realizados desde plantas inoculadas con *Dc* desarrollaron colonias con características miceliales típicas de esta especie (Fernández *et al.*, 1999; Lago, 2009).

En este ensayo, como en los estudios realizados por Roy *et al.* (1994), Black *et al.* (1996), Vrandecic *et al.* (2004), Mengistu *et al.* (2007), Thompson *et al.* (2015) y Gao *et al.* (2014), se logró aislar al patógeno a partir de diversas especies de malezas no emparentadas entre sí y prevalentes en los sistemas productivos zonales respectivos.

D. caulivora se reaisló siempre de plantas asintomáticas, resultado que coincide con lo descrito por Roy *et al.* (1994) y Black *et al.* (1996), quienes no registraron síntomas visibles en ninguna de las especies de malezas que inocularon. Cabe recordar que algunas infecciones permanecen latentes hasta cuando las condiciones del medio son más favorables o bien durante una etapa distinta en la madurez de una planta (Agrios, 2005).

Es factible que cada patosistema maleza-*Dc* presente una duración diferente del periodo de incubación y/o de latencia, y/o una combinación variable de factores ambientales o fenológicos favorables para una infección efectiva. En el presente trabajo se utilizó una metodología de características similares a la usada en soja. Sin embargo, el ciclo de patogénesis de *Dc* en las especies probadas, su periodo de latencia así como la producción de nuevo inóculo infectivo es parte de los conocimientos que deberán buscarse en el futuro.

En trabajos similares de inoculación de malezas con *Dc*, aunque no se compararon tipos de inóculo, los autores tuvieron éxito en reaislar el patógeno desde las plantas inoculadas. En el caso de Black *et al.* (1996), usaron un método con ascosporas, mientras que Roy *et al.* (1994) inocularon con el método del palillo colonizado por micelio. Varios factores podrían favorecer al método de inoculación por micelio sobre las ascosporas: el sustrato enriquecido sobre el que se desarrolla el micelio como fuente de energía adicional (disco de APDA), la mayor protección del inóculo dada por el dispositivo aplicado al tallo, el mantenimiento de la humedad por más tiempo en el lugar de inoculación y la certeza de que el inóculo tomó contacto con la planta. A pesar de las diferencias en el número de individuos infectados (i.e. desde las que se reaisló *Dc*) entre ambos métodos en este trabajo, estas diferencias no resultaron significativas. Finalmente, el hecho de haber aislado a *Dc* en algunas de las especies de malezas probadas, y en algunos casos variando incluso según el método de inoculación, podría indicar diferencias en las barreras de defensa previas a la infección o colonización por

parte del patógeno, inherentes a cada especie vegetal. Estos hallazgos indican que algunas de las condiciones necesarias para el éxito de la infección pudieron haber ocurrido. Específicamente, que la especie vegetal fuese susceptible (al patógeno virulento), que la planta transcurrió por una etapa de susceptibilidad, que el hongo pasó por una etapa patogénica y que las condiciones de temperatura y humedad del medio fueron óptimas para el desarrollo del patógeno (Agris, 2005). Para el patosistema en estudio (maleza-*Dc*) se sabe que el patógeno empleado (B13B3) es virulento en soja y se le brindaron las condiciones favorables para el desarrollo del CTSc, por lo que más estudios son necesarios a fin de determinar la existencia de periodos de susceptibilidad por parte de las distintas especies de malezas.

Un párrafo aparte merece el hecho de haber reaislado *Dc* desde *H. annuus*, ya que este es un cultivo elegido por los productores del sudeste bonaerense en la secuencia de rotación y las plantas voluntarias son comúnmente encontradas en los lotes donde podría permanecer sintomática o asintomáticamente. Estos resultados concuerdan con lo probado por Peruzzo *et al.* (2008) trabajando en patogenicidad cruzada entre especies de *Diaporthe* afectando a soja y girasol; por Mancebo *et al.* (2017), quienes aislaron y comprobaron la patogenicidad de *P. longicolla*, *D. sojae*, *D. caulivora* y *Phomopsis* sp., además de *D. helianthi* y *P. gulyae* sobre girasol, y por Grijalba y Ridao (2012), que reportaron la sobrevivencia de *Dc* en rastrojo de girasol.

Estos son los primeros estudios que muestran resultados involucrando a *Dc* afectando a algunas especies de malezas y al girasol (en un hipotético rol como plantas voluntarias), todas presentes en los sistemas agrícolas del sudeste bonaerense. Altas poblaciones de malezas podrían incrementar la cantidad de rastrojos infectados en superficie y así elevar la cantidad de inóculo primario disponible, al mantener a *Dc* en los lotes cuando el cultivo de soja está ausente (Black *et al.*, 1996). Estas situaciones normalmente son halladas en lotes de la región, a lo que se suma la dificultad creciente en el manejo de malezas resistentes a herbicidas (Bedmar *et al.*, 2001) como es el caso de rama negra. Por este motivo, resta conocer aun si las especies que fueron invadidas por *Dc* son capaces de generar rastrojos sobre los cuales puedan desarrollarse peritecios maduros esporulantes en condiciones de campo en presencia de hospedantes susceptibles (*i.e.* soja u otras malezas y cultivos).

CONCLUSIONES

a) Las malezas más frecuentes de los sistemas productivos del sudeste bonaerense y plantas voluntarias de girasol podrían tener un impacto epidemiológico importante al sumar una fuente adicional de inóculo del patógeno.

b) Fue posible lograr infección asintomática de plantas de malezas y de girasol mediante inoculación asistida, independientemente del tipo de inóculo (micelio u ascosporas) y método utilizado.

CAPÍTULO III

PERIODO DE PROTECCIÓN FRENTE A *Diaporthe caulivora* AGENTE CAUSAL DEL CANCRO DEL TALLO DE LA SOJA

INTRODUCCIÓN

Múltiples fungicidas están disponibles para el control de las enfermedades foliares y del tallo y la vaina de la soja como la mancha marrón por *Septoria glycines*, tizón del tallo y de la vaina por *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, tizón y mancha púrpura por *Cercospora* spp., mancha ojo de rana por *C. sojina*, roya por *Phakopsora pachyrhizi* y mildiu por *Peronospora manshurica*, entre otras. A pesar de ello, poco se ha estudiado el manejo del CTSc mediante tácticas que incluyan productos químicos.

Diversos autores han determinado que el periodo de mayor susceptibilidad frente a *Dc* para el cultivo soja corresponde con los estadios vegetativos tempranos (V3 – V6) y que el desarrollo en el campo de los síntomas típicos de cancro del tallo se corresponde con infecciones tempranas (V1 - V7) (Backman *et al.*, 1985; Smith y Backman, 1989; Fernandez *et al.*, 1999; Juliatti *et al.*, 2004). También se ha reportado que infecciones tempranas resultan en la expresión de los síntomas a los 60 u 80 días posterior a la infección, no ocurriendo lo mismo en infecciones tardías que dan como resultado plantas asintomáticas (Ploetz y Shokes, 1985).

Los fungicidas pueden reducir las pérdidas debidas al CTSc según experiencias previas (Backman *et al.*, 1985, Damicone *et al.*, 1987); para ello deben ser aplicados antes de la aparición de los síntomas (Damicone *et al.*, 1990). Tanto Backman *et al.* (1985) como como Hall y Xue (1995) coincidieron en que tratamientos de semilla con productos que contengan thiram poseen efectividad en el control de *Dc*. Sin embargo, se ha advertido que con este tipo de tratamientos no se elimina al patógeno en un 100 % (Backman *et al.*, 1985). Dentro de las tácticas orientadas al control de la enfermedad en post emergencia solo se cuentan con datos de Backman *et al.* (1985), quienes sugieren aplicaciones de benomil durante las etapas vegetativas tempranas del cultivo.

Los principios activos de los fungicidas actualmente indicados contra especies del complejo *D/P* pertenecen a tres familias: las estrobilurinas (p.e. azoxistrobina), anti-germinativas con acción preventiva; los triazoles (p.e. difenoconazole), que inhiben el crecimiento micelial, con acción preventiva y un ligero efecto curativo y las carboxamidas que afectan la cadena respiratoria de los hongos.

El objetivo de este capítulo fue evaluar períodos de protección comprendidos entre

los estadios V1 y R1 con un fungicida foliar (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %) en un cultivar susceptible de soja (DM3810) frente a *Dc* agente causal del CTS.

MATERIALES y MÉTODOS

Dos ensayos fueron realizados en el campo experimental de la Unidad Integrada Balcarce (UIB, 37°45' latitud sur; 58°19' longitud oeste) durante las campañas 2015/2016 y 2016/2017 donde se evaluaron diferentes periodos de protección usando un fungicida sistémico de aplicación foliar y un fungicida curasemillas.

El diseño experimental fue en bloques completos aleatorizados con tres repeticiones. El cultivar susceptible DM3810 (Don Mario Semillas, Chacabuco, Argentina) se sembró el 20/11/2015 y el 17/11/2016 en los ensayos 1 y 2 respectivamente. Cada parcela estuvo constituida por 4 surcos a 0,42 m espaciamiento y 5 m de largo, siendo la unidad experimental (UE) los dos surcos centrales.

Con el objetivo de contar con inóculo primario de *Dc* se esparció en el momento de emergencia del cultivo, rastrojo infectado y picado (aproximadamente 3 cm de largo) (Fig. 27), a razón de 0,1 Kg y 0,6 Kg por parcela en 2015 y 2016, respectivamente. También se asperjaron las plántulas de cada UE con un volumen de 290 cm³ de una suspensión acuosa de 4 x 10⁶ ascosporas / mL de concentración. Las ascosporas se obtuvieron a partir de peritecios inducidos *in vitro* y contadas en laboratorio con cámara de Neubauer. En el ensayo de 2015/2016 se inoculó en estadio V1 (estadio según escala de Fehr *et al.*, 1977) (Fig. 29) y en VE, V2, V4, V6 y V8 en 2016/2017 (Fig. 30). Con el fin de brindar las condiciones ambientales favorables para la infección se realizó un riego por aspersión, de media hora de duración, post inoculación. Luego de 12 h se realizaron dos riegos más, de media hora de duración, con un intervalo de 12 h entre riegos. En cada riego se aplicaron 9 mm de agua (Fig. 28).



Figura 107. Tamaño del rastrojo infectado con *Diaporthe caulivora* picado a un tamaño aproximado de 3 cm de largo, depositado en superficie.



Figura 118. Sistema de riego por aspersión empleado en los ensayos de los ciclos agrícolas a) 2015/2016 y b) 2016/2017.

Los tratamientos se aplicaron en función de la fenología del cultivo. En la campaña 2015/2016 se diseñaron siete tratamientos: protección hasta V1 (Prot. h/V1); hasta V3 (Prot. h/V3); hasta V5 (Prot. h/V5); protección desde V3 (V3-R1); desde V5 (V5-R1); desde V1 hasta R1 (R1) (control total); y un testigo sin protección (Fig.29). En la campaña 2016/2017 se diseñaron 16 tratamientos. Dos tratamientos consistieron únicamente en el curado de las semillas con Sistiva® (fluxapyroxad 33 %; Basf) (Prot. h/Vc S) y Acronis® (metil tiofanato 45 % - piraclostrobin 5 %; Basf) (Prot. h/Vc A), respectivamente. El resto de los tratamientos fueron: protección hasta V1 (Prot. h/V1); hasta V3 (Prot. h/V3); hasta V5 (Prot. h/V5); hasta V7 (Prot. h/V7); hasta V9 (Prot. h/V9); hasta R1 (R1) (control total); protección desde V1 (V1-R1); desde V3 (V3-R1); desde V5 (V5-R1); desde V7 (V7-R1); desde V9 (V9-R1); protección con Sistiva® + V1 hasta R1 (R1 S); Acronis® + V1 hasta R1 (R1 A); y un testigo sin protección. En todos los tratamientos protegidos desde V1 la aplicación se finalizó al llegar al estado R1 (Fig. 30).

El fungicida se aplicó con una mochila con tanque de CO₂ y una barra de cuatro picos como hueco separados a una distancia de 50 cm entre sí. El caudal asperjado fue de 140 L/ha y la presión de trabajo 60 lb (Fig. 31). El producto utilizado fue Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta, Vicente López., Argentina), con una dosis equivalente de 500 cm³/ha.

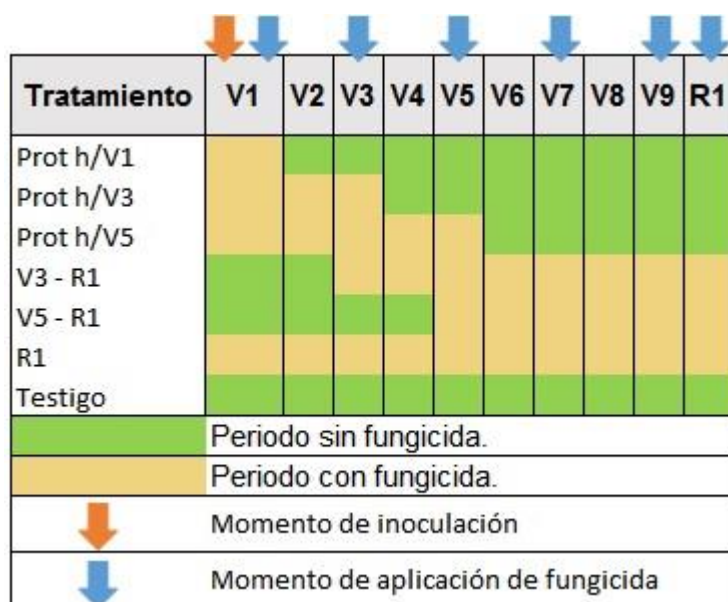


Figura 29. Esquema de los momentos de aplicación de fungicida Amistar Top® y momentos de aplicación de suspensión de ascosporas de *Diaporthe caulivora* para la campaña 2015/16 en la localidad de Balcarce.

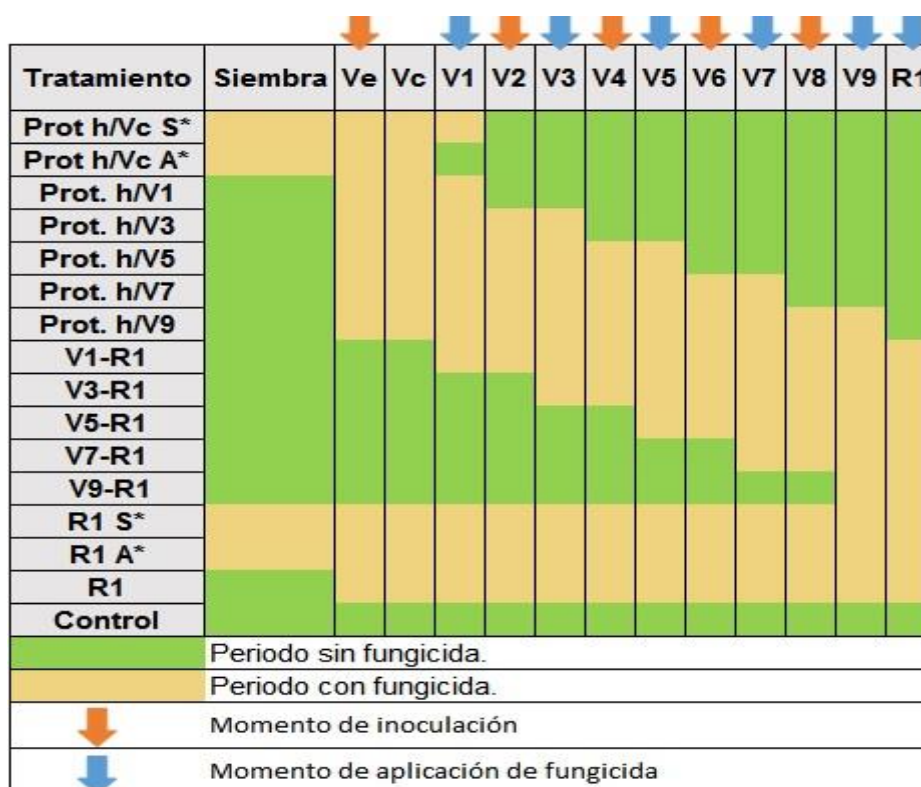


Figura 30. Esquema de los momentos de aplicación de fungicida Amistar Top® y momentos de aplicación de suspensión de ascosporas de *Diaporthe caulivora* para la campaña 2016/17 en la localidad de Balcarce. S: tratamiento con curasemillas Sistiva®; A: tratamiento con curasemillas Acronis®.

Las variables evaluadas en ambos ensayos fueron la incidencia (%) de la enfermedad, registrando el número de plantas con síntomas de cancro en el estado R2-R3 en relación con el número de plantas totales evaluadas por 100. Luego de la cosecha, se determinó el rendimiento (kg/ha) y el peso de mil granos (g) de cada tratamiento.

La incidencia, el rendimiento y el peso de 1000 granos fueron analizados empleando análisis de varianza con modelos lineales mixtos (Proc. MIXED, SAS Studio v3.6, SAS Institute Inc.). En todos los modelos se incluyó al bloque y al tratamiento como efectos fijos. La simetría y la homocedasticidad de los residuales fueron corroborados mediante métodos gráficos y la prueba de Levene, respectivamente. Las comparaciones múltiples *post-hoc* fueron realizadas mediante la prueba HSD Ajustadas por el método de Dunnett.



Figura 121. Aplicación de fungicida Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta) mediante mochila con tanque de CO₂ y una barra de cuatro picos cono hueco.

RESULTADOS

Variables meteorológicas relacionadas con el desarrollo del CTSc

Las condiciones imperantes durante las dos campañas donde se realizaron los ensayos fueron diferentes si se las compara con las condiciones climáticas de la campaña 2006/07, cuando hubo una epífita importante de CTSc en todo el centro y sudeste bonaerense, y con las condiciones medias de la serie histórica 1961-2017.

Teniendo en cuenta las precipitaciones medias mensuales y focalizando el mes de diciembre, que es cuando se presentan los estadios de mayor susceptibilidad en el cultivo de soja, se observa que las precipitaciones de la campaña 2006/07 y la media histórica están muy por encima de lo ocurrido en las campañas cuando se realizaron los ensayos (Fig. 32).

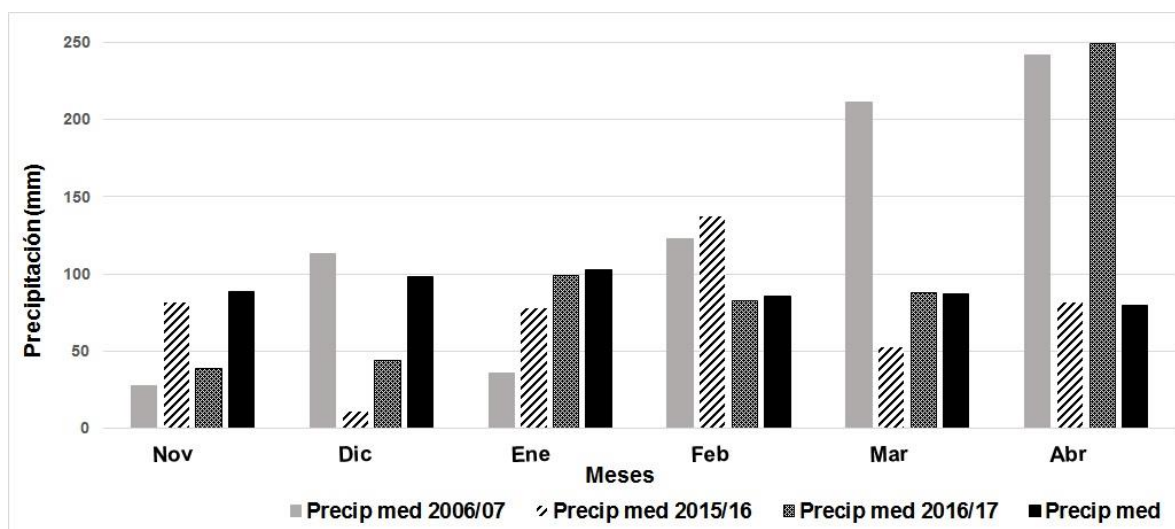


Figura 132. Precipitación media mensual de las campañas 2006/07-2015/16-2016/17 y media histórica (1961-2017) para la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA).

Se observó lo contrario para los meses de noviembre y enero, cuando la precipitación media de las campañas 2015/16 y 2016/17 fue mayor a la epífita de la campaña 2006/2007. Sin embargo, febrero, marzo y abril presentaron precipitaciones medias mayores en la campaña 2006/07 con respecto a las demás campañas y la media histórica (Fig. 32).

Por otra parte, cuando se observan las temperaturas medias mensuales a partir del mes de noviembre, se constata que las mismas fueron superiores para el periodo 2015/17 comparadas con las ocurridas en la campaña 2006/07 y con la media histórica, que nunca sobrepasaron los 21 °C (Fig. 33).

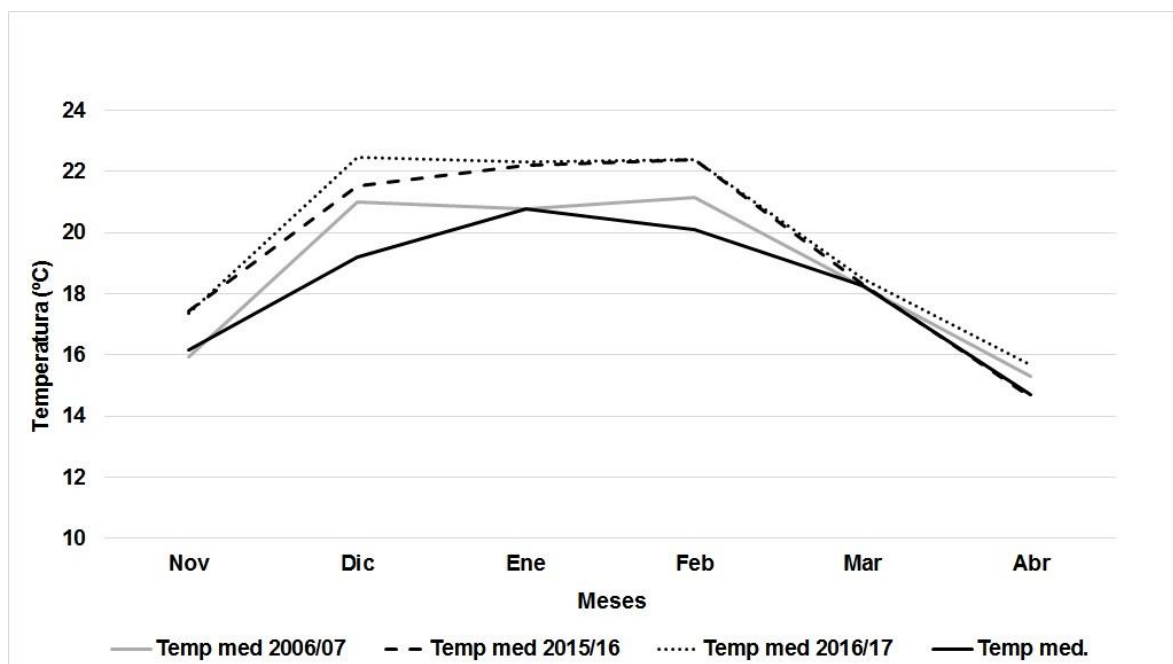


Figura 14. Temperatura media mensual de las campañas 2006/07-2015/16-2016/17 y media histórica (1961-2017) para la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA).

Por último, al analizar la humedad relativa media comparando la campaña 2006/07 versus las campañas 2015/16 y 2016/17 se observa que la misma fue mayor en noviembre, diciembre, enero y febrero en la campaña 2006/07. En estos meses hay una diferencia máxima del orden del 10 % en el mes de diciembre a un valor promedio del 70 % de HR (Fig. 34).

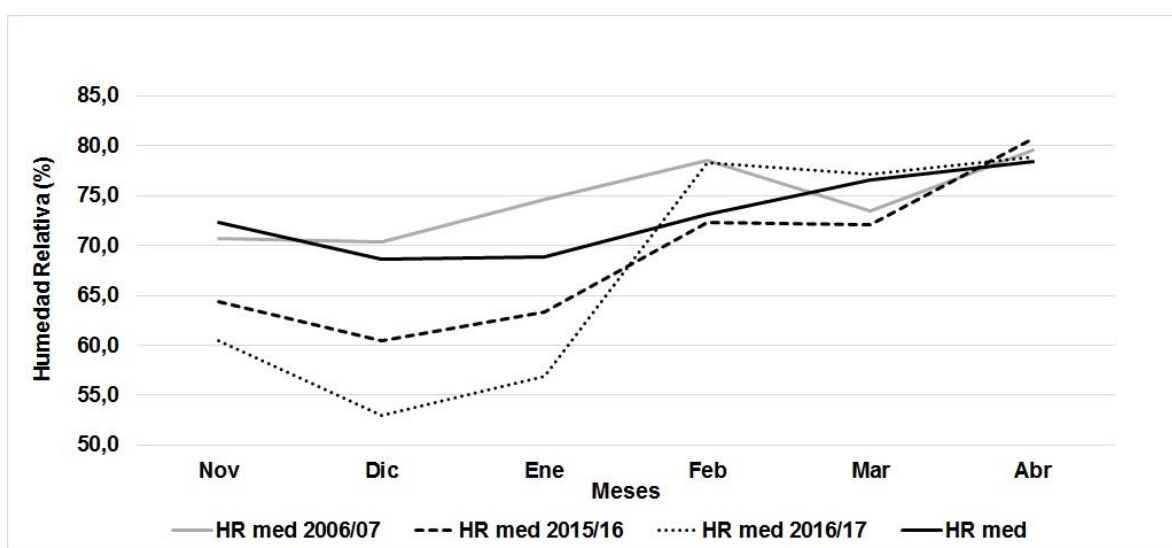


Figura 154. Humedad relativa media mensual de las campañas 2006/07-2015/16-2016/17 y media histórica (1961-2017) para la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA).

Ensayo campaña 2015/2016

Al analizar las tres variables (incidencia, rendimiento y peso de mil granos) en ningún caso se encontraron efectos en el tratamiento ($P > 0,05$) (Tabla 4). Los porcentajes de incidencia y los valores de rendimiento y peso de mil granos de los tratamientos y el testigo se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4. ANOVA del efecto del periodo de protección con fungicida Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta) sobre la Incidencia (%) de cancro del tallo de soja por *Diaporthe caulivora*, en estadio R2-R3, rendimiento (kg/ha) y peso de mil granos (g) en el ensayo 2015/2016.

Efecto fijo	NumDF	Incidencia		Rendimiento		Peso de 1000	
		F	Valor P	F	Valor P	F	Valor P
Bloque	2	2,33	0,14	0,09	0,91	0,05	0,96
Tratamiento	6	1,2	0,37	0,78	0,6	0,6	0,73

*NumDF: grados de libertad. **valor de probabilidad con $\alpha = 0,10$

Tabla 5. Efecto del periodo de protección con fungicida Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta) sobre la Incidencia (%) de cancro del tallo de soja por *Diaporthe caulivora*, en estadio R2-R3, rendimiento (kg/ha) y peso de mil granos (g) en el ensayo 2015/2016. Medias y error estándar.

Tratamiento	Incidencia (%; EE = 0,56)	Rendimiento (Kg/ha; EE = 32,10)	Peso de mil granos (g; EE = 5,82)
	Media	Media	Media
Prot h/V1	13,15	2791,28	153,6
Prot h/V3	12,19	2754,68	158,5
Prot h/V5	17,23	2296,67	144,17
V3 - R1	8,92	2946,42	154,1
V5 - R1	13,09	2691,42	153,93
R1	5,74	2887,81	158,97
Testigo	14,06	2953,27	151,98

Ensayo campaña 2016/2017

El análisis de la varianza de las variables Incidencia (%), rendimiento (kg/ha) y peso de 1000 granos (g) mostró un efecto del tratamiento de protección cuando el nivel de significancia establecido fue del 10 % ($\alpha = 0,10$) (Tabla 6).

Tabla 6. ANOVA del efecto del periodo de protección con fungicida Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta) sobre la Incidencia (%) de cancro del tallo de soja por *Diaporthe caulivora*, en estadio R2-R3, rendimiento (kg/ha) y peso de mil granos (g) en el ensayo 2016/2017.

Efecto fijo	NumDF*	Incidencia		Rendimiento		Peso de 1000	
		F	Valor P**	F	Valor P	F	Valor P
Bloque	2	2,33	0,04	0,09	<0,01	14,76	<0,01
Tratamiento	15	1,20	0,06	0,78	0,09	2,74	<0,01

*NumDF: grados de libertad. **valor de probabilidad con $\alpha = 0,10$

En la comparación de todas las estrategias *versus* el testigo sin aplicaciones se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de incidencia entre el testigo y la estrategia donde se protegió el cultivo hasta V5, a favor de esta última ($\alpha = 0,10$) (Tabla 7).

Al analizar el rendimiento, se encontraron mayores valores de las estrategias de protección hasta V3 y donde solo se curó la semilla con Sistiva® en comparación con el testigo, resultando en diferencias significativas ($\alpha = 0,10$) (Tabla 7).

Cuando se analizó el peso de mil granos y se realizaron las comparaciones de todos los tratamientos *versus* el control (203,7 g.) se encontraron diferencias significativas ($\alpha = 0,10$) con los tratamientos de protección hasta V1 (230,97 g.), desde V1 hasta R1 (234,27 g.) y el tratamiento donde se curó la semilla con Acronis® y además se protegió desde V1 hasta R1 (229,77 g.) (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto del periodo de protección con fungicida Amistar Top® (azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 %; Syngenta) sobre la Incidencia (%) de cancro del tallo de soja por *Diaporthe caulivora*, en estadio R2-R3, rendimiento (kg/ha) y peso de mil granos (g) en el ensayo 2015/2016. Medias y error estándar.

Medias de mínimos cuadrados \pm error estándar (EE)			
Tratamiento	Incidencia (%; EE = 0,56)	Rendimiento (Kg/ha; EE = 232,10)	Peso de mil granos (g; EE = 5,82)
	Media	Media	Media
Prot h/V1	0,62	3222,01	230,97*
Prot h/V3	0,00	4015,33*	208,7
Prot h/V5	3,21*	3592,58	218,57
Prot h/V7	0,19	3563,51	218,2
Prot h/V9	1,62	3631,41	207,97
Prot h/Vc A	0,96	3051,7	213,37
Prot h/Vc S	1,30	4107,19*	216,63
V1 - R1	0,18	3548,62	234,27*
V3 - R1	1,05	3728,07	212,23
V5 - R1	0,45	3921,94	215,3
V7 - R1	0,18	3849,72	206,03
V9 - R1	0,61	3462,85	201,6
R1 A	0,56	3440,82	229,77*
R1 S	0,41	3574,1	216,77
R1	1,25	3505,39	209
Testigo	0,93	3041,41	203,7

* Diferencias con $P < 0,10$ con respecto al testigo sin protección (Ajuste de Dunnett)

DISCUSIÓN

Las epidemias de enfermedades asociadas a las plantas son el resultado de la combinación de elementos tales como hospedantes susceptibles, patógenos virulentos y condiciones favorables del ambiente (Vale *et al.*, 2004). A partir de estos elementos pueden establecerse relaciones que expliquen la ocurrencia de epifitias, estableciéndose un triángulo de la enfermedad (Gäumann, 1950).

La enfermedad como proceso patogénico involucra diferentes etapas, incluyendo la infección, colonización, esporulación y diseminación. Normalmente estas etapas ocurren en cortos periodos de tiempo (Vale *et al.*, 2004).

Estudios realizados con inoculaciones de *Dc* en soja han sido desarrollados usando como inóculo suspensiones de ascosporas con variado éxito (Ploetz y Shokes, 1985 y 1987, Damicone *et al.*, 1987 y Rupe *et al.*, 1996). Por otra parte, Freitas *et al.* (1998) y Damicone *et al.* (1990) realizaron exitosas inoculaciones en el campo con rastros de soja infectados con *Dc* como fuente de inóculo. Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente estudio ya que los niveles de incidencia registrados fueron bajos en ambos años, lo que concuerda con lo expresado por Damicone *et al.* (1990) quien evidenció una baja eficiencia de infección por parte de *Dc*.

Diversos autores han estudiado el proceso de infección de *Dc* mediante tratamientos que involucraron diferentes factores como humedad relativa, precipitaciones, temperatura y horas de luz. En este sentido Rupe *et al.* (1996) informaron que las máximas tasas de infección difícilmente ocurran fuera de un rango de entre 20 y 30 °C y Grijalba y Ridao (2014) encontraron los mayores porcentajes de mortandad de plantas a temperaturas en un rango de 15 a 20 °C. Estos resultados permiten suponer que las temperaturas ocurridas durante los ensayos no fueron lo suficientemente altas como impedir la infección por parte de *Dc*. Otros trabajos resaltaron la importancia del agua libre y la alta humedad relativa como factores necesarios para el desarrollo de la enfermedad (Keeling, 1988; Ploetz y Shokes, 1985; Damicone *et al.*, 1987). En este caso, al comparar las condiciones de HR y precipitaciones durante la epifitia de 2006/07 con el periodo en el que se realizó esta tesis, se ven valores más elevados para ambas variables a favor de la campaña 2006/07. Esto puede indicar que no se produjeron las condiciones de agua libre y alta HR necesarias para que se produzca la enfermedad, a pesar de la aplicación de riegos post inoculación, coincidiendo con lo expresado por Keeling (1988), Ploetz y Shokes, (1985) y Damicone *et al.* (1987).

Las escasas precipitaciones junto con temperaturas medias elevadas ocurridas en los estadios vegetativos tempranos del cultivo de soja en los ensayos de esta tesis,

podieron haber incidido en una baja germinación de ascosporas, o que pocas hayan penetrado para continuar en una infección del patógeno y posterior desarrollo de síntomas. Esto concuerda con lo expuesto por Lago (2010) quien evidenció una baja incidencia final en los cultivos del centro y sudeste bonaerense posiblemente afectados por una escasez hídrica en el periodo vegetativo inicial del cultivo. Bajo esta óptica Subbarao *et al.* (1992b) postularon la alta dependencia que tiene *Dc* de las condiciones ambientales, y explicaron las apariciones erráticas de la enfermedad de una campaña a otra. Aunque en ambos ensayos se realizó un riego inmediatamente después de la inoculación, otra explicación para el bajo nivel de CTSc pudo resultar del hecho de no haber logrado una condición de humedad y agua libre superficial suficiente, previas a la inoculación, que aseguraran una condición óptima para el momento de la llegada de las ascosporas. Sumado a esto, durante el ciclo agrícola 2016/17, ocurrieron altas temperaturas máximas, entre 28 y 36 °C los días de la inoculación con HR inferior a 65 % (Anexo Tabla II y III).

Patógenos que poseen su principal fuente de inóculo en los rastrojos infectados en superficie, como *Dc*, dependen de las gotas de lluvia para la dispersión de las esporas (Fitt *et al.* 1989). Esto genera una relación de importancia entre las precipitaciones y la ocurrencia de epifitias. Subbarao *et al.* (1992b) determinaron una correlación positiva entre el número de días con lluvias y la incidencia de CTSc. Estos estudios concuerdan con lo observado en el presente trabajo al contrastar las precipitaciones medias de la campaña 2006/07, donde hubo valores de incidencia que se situaron en un rango de 0,5 a 55 % (Lago *et al.*, 2008), comparado con los ensayos aquí realizados en los que solamente en un tratamiento de un año se llegó a un valor promedio de 17 % de incidencia.

La incidencia como estimador del nivel de infección es un aspecto a tener en cuenta debido a que se puede arribar a falsas interpretaciones en el caso de *Dc*. Esto resulta de la imposibilidad de obtener una estimación precisa de la cantidad de plantas infectadas causada por las plantas asintomáticas (Backman *et al.*, 1985). Medir el inóculo disponible en las fuentes dentro del cultivo proveería un indicador de riesgo de ocurrencia de severas epifitias de CTSc cuando el ambiente sea favorable (Grijalba, 2010).

En el presente estudio se proporcionó inóculo por medio de fuentes de probada patogenicidad y efectividad (Freitas *et al.*, 1998; Damicone *et al.*, 1990), pudiendo resultar en subestimaciones de la incidencia real de la enfermedad en el campo. En esta tesis, la fuente de inóculo agregada como rastrojo infectado y picado no permitió cumplir

con el objetivo perseguido de lograr niveles de enfermedad más elevados. Las condiciones ambientales que ocurrieron no fueron favorables para la formación de peritecios y posterior descarga de ascosporas (por al menos 1 a 7 días). Tampoco hubo una provisión sostenida en el tiempo de inóculo desde la fuente, lo cual podría haberse logrado con un esquema de riego diferente sobre los rastros, desde antes de la inoculación asistida hasta después de la misma. Así se hubiese favorecido la formación y/o maduración de peritecios y más adelante la liberación y dispersión de las ascosporas hasta las plantas. Debido a las dificultades que entraña reproducir la enfermedad en el campo es de suma importancia continuar optimizando metodologías que se basen en la observación directa del rastrojo como indicador de riesgo.

Experimentos conducidos con semillas de soja infectadas por *Dc* en los años 1985 y 1995 por Backman *et al.* y Xue *et al.*, respectivamente, dieron como resultado un control efectivo del patógeno al tratar las semillas con productos fungicidas. Esto no se observó con lo expuesto en esta tesis donde solo se evidenciaron diferencias significativas en los tratamientos que solo se curó la semilla con Acronis® para la variable rendimiento, y en el control total sumado al tratamiento con Acronis® para la variable peso de mil granos con el tratamiento sin control. Más estudios son necesarios a fin de establecer resultados más concluyentes de la efectividad de estos productos sobre *Dc*.

En la campaña 2016/17 la única diferencia que se registró en comparación con el tratamiento testigo, fue un aumento de la incidencia en aplicaciones donde se protegió el cultivo con fungicida hasta el estadio de V5 ($\alpha = 0,10$). Estos datos no se condicen con los resultados de aplicaciones publicados por Backman *et al.* (1985). Esto indica que más ensayos son necesarios a fin de poder determinar cuál es la ventana de aplicación que permita el control eficiente del CTSc mediante el empleo de fungicidas foliares, siempre y cuando se logren niveles de infección que permitan el contraste entre tratamientos.

CONCLUSIONES

- a) La hipótesis 3, “La protección de la soja ante *Diaporthe caulivora*, agente causal del cancro del tallo, es más efectiva mediante la pulverización del fungicida foliar azoxistrobina 20 % y difenoconazole 12,5 % entre los estadios V1-V5”, no pudo ser puesta a prueba.
- b) La baja incidencia de enfermedad registrada, luego del agregado de inóculo en rastrojos y de suspensiones de ascosporas, y la provision de riego suplementario demostraron la alta dependencia de condiciones ambientales específicas en los estadios vegetativos del cultivo y una probable baja tasa de infección por parte del patógeno.

CONCLUSIONES GENERALES

En respuesta a las hipótesis planteadas y en función de los resultados obtenidos y discutidos se concluye que:

- La mayoría de los aislamientos realizados a partir de ascosporas de peritecios formados en rastrojos de soja infectados en el campo fue caracterizada como *Dc*. Esto muestra la importancia epidemiológica de esta fuente de inóculo y el riesgo de desarrollo de epifitias de CTSc en el sudeste bonaerense ante condiciones ambientales predisponentes.
- Peritecios del complejo *D/P* se desarrollaron en los rastrojos de soja naturalmente infectados, independientemente del genotipo y del momento del año.
- En el sudeste bonaerense las condiciones más favorables para el desarrollo y maduración de los peritecios de *Dc* es el periodo comprendido entre Junio y Diciembre, el cual abarca el momento de mayor susceptibilidad del cultivo de soja.
- Las especies de malezas *Ch. recutita*, *C. sumatrensis*, *R. rugosum* y *S. vulgaris*, y el girasol podrían mantener al inóculo de *Dc* viable durante los periodos donde no se encuentra la soja en el campo.
- La fuente de inóculo usada y las inoculaciones asistidas con ascosporas junto a las condiciones ambientales logradas no resultaron propicias para reproducir la enfermedad en niveles convenientes, mostrando además una baja eficiencia de infección del patógeno.

Todo lo presentado en este trabajo indicaría que en los sistemas agrícolas del sudeste bonaerense se dan condiciones de alta probabilidad de ocurrencia de epifitias debido al solapamiento de las etapas susceptibles del cultivo de soja con las de mayor producción de inóculo por parte de *Dc*. Además de la importancia de la semilla, se muestra aquí la importancia de los rastrojos como fuente de inóculo primario, y se pone en evidencia que determinadas especies de malezas o plantas voluntarias de cultivos incluidos en la secuencia podrían actuar como reservorio del patógeno en los lotes de la región. Los resultados hallados hasta el momento indican que tácticas que prioricen la descomposición acelerada del rastrojo y el manejo eficiente de malezas sumado al uso de semilla de buena sanidad serían las estrategias con mejores posibilidades para el manejo eficiente del CTSc. Más ensayos son necesarios para poder evaluar periodos de protección comprendidos entre los estadíos V1 y R1 con fungicidas foliares frente a

Dc, con condiciones predisponentes favorables para la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G.N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press, 5th. ed. San Diego, California, USA. 922 p.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. 1996. Introductory mycology. 4th. ed. x, Wiley. New York, NY. 868 p.
- ATHOW, K.L.; CALDWELL, R.M. 1954. A comparative study of *Diaporthe* stem canker and pod and stem blight of soybeans. *Phytopathology*. 44(6):319-325.
- BACKMAN, P.A.; WEAVER, D.B.; MORGAN-JONES, G. 1985. Soybean stem canker: An emerging disease problem. *Plant Disease*. 69(8):641-647.
- BAIRD, R. E.; MULLINIX, B. G.; PEERY, A. B.; LANG, M. L. 1997. Diversity and longevity of the soybean debris mycobiota in a no-tillage system. *Plant Disease*. 81(5):530-534.
- BEDMAR, F.; EYHERABIDE, J.J.; Y LEADEN, M.I. 2001. Aspectos sobre el manejo de las malezas en sistemas de siembra directa.. En: PANIGATTI, J.L.; BUSCHIAZZO, D.; Y MARELLI, H. Siembra Directa II. INTA. pp. 99-139.
- BLACK, B.D.; PADGETT, G.B.; RUSSIN, J.S.; GRIFFIN, J.L.; SNOW, J.P.; BERGGREN, G. 1996. Potencial weed hosts for *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, causal agent for soybean stem canker. *Plant Disease*. 80(7): 763-765.
- BLAKE, C.M. 1980. Development of perithecia and pycnidia of *Didymella appplanata* (causing spur blight) on raspberry canes. *British Mycological Society*. 74(1):101-105.
- BOLSA DE COMERCIO DE ROSARIO. 2017. Estimaciones de producción. [En línea] < <https://www.bcr.com.ar/Pages/gea/estimaProd.aspx> > [Consulta: 4/7/2017].
- DAMICONE, J.P.; BERGGREN, G.T.; SNOW, J.P. 1987. Effect of free moisture on soybean stem canker development. *Phytopathology*. 77(11):1568- 1572.
- DAMICONE, J.P.; SNOW, J.P.; BERGGREN, G.T. 1990. Spatial and temporal spread of soybean stem canker from an inoculum point source. *Phytopathology*. 80:571-578.
- DISSANAYAKE, A.J.; PHILLIPS, A.J.L.; HYDE, K.D.; YAN, J.Y; LI, X.H. 2017. The current status of species in *Diaporthe*. *Mycosphere*. 8(5):1106–1156.
- FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. 1977. Stages of soybean development. Iowa State University Cooperative Extension Service, Special Report N° 80. 11 p.
- FERNÁNDEZ, F.A.; HANLIN, R.T. 1996. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia*. 88(3):425-440.
- FERNÁNDEZ, F.A.; PHILLIPS, D.V.; RUSSIN, J. S.; RUPE, J.C. 1999. Stem canker En: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. eds. 4th. ed. Compendium Soybean Diseases. APS Press. Inc., St. Paul, MN. pp. 33-34.
- FITT B.D.L.; MCCARTNEY H.A.; WALKLATE P.J. 1989. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annual Review of Phytopathology*. 27:241-270.

- FORMENTO, A.N.; GUILLIN, E.A. 2003. Primera cita de *Phomopsis* spp. en semillas de trigo (*Triticum aestivum*) para la República Argentina. Sociedad Argentina de Botánica. 38(Suppl.):263-264.
- FREITAS, M.A.; CAFÉ FILHO, A.C.; NASSER, L.C.B. 1998. Gradientes do cancro da haste da soja (*Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*) a partir de foco pontual de inóculo. Fitopatologia Brasileira. 23:161-165.
- FRENCH-MONAR, R. D.; JONES, J. B.; ROBERTS, P. D. 2006. Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. Plant Disease. 90:345-350.
- FROSHEISER, F.I. 1957. Studies on etiology and epidemiology of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, the cause of stem canker of soybeans. Phytopathology. 47:87-94.
- GAO, Y.; SU, Y.; SUN, W.; CA, L. 2014. *Diaporthe* species occurring on *Lithocarpus glabra* in China, with descriptions of five new species, Fungal Biology, <<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.06.006>> [Consulta: 12/10/2016].
- GÄUMANN, E. 1950. Principles of plant infection (trans. By w. B. Brierley). Lockwood and son. London 543 p.
- GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S.I.R.; LOMBARD, L. 2013. *Diaporthe*, a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. Persoonia 31:1-41.
- GRIJALBA, P.E. 2010. Variabilidad morfológica, genética y patogénica de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* causante del cancro del tallo de la soja en la provincia de Buenos Aires. Tesis *Magister Scientiae* en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 68 p.
- GRIJALBA, P.E.; GUILLIN, E. 2007. Occurrence of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in the southern part of Buenos Aires province, Argentina. Australian Plant Disease Notes. 2:65-66.
- GRIJALBA, P.E.; MARINO, S. 2001. Cancro del tallo de la soja: patogenicidad, prueba de algunos cultivares de soja y de hospedantes alternativos. Universidad Nacional de Buenos Aires. Revista Facultad de Agronomía. 21(1):55-59.
- GRIJALBA, P.E.; RIDAO, AdelC. 2012. Survival of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* (causal agent of soybean stem canker) artificially inoculated in different crop residues. Tropical Plant Pathology. 37(4):271-274.
- GRIJALBA, P.E.; RIDAO, AdelC. 2014. Tasa de crecimiento y patogenicidad de aislamientos de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* a distintas temperaturas. Phytón. 83:325-332.
- GRIJALBA, P.E.; RIDAO, AdelC.; GUILLIN, E. 2011. Caracterización taxonómica y análisis de la variabilidad del agente causal del cancro del tallo de la soja en la provincia de Buenos Aires (temporadas 2005/2007). RIA 37(3):290-297.
- GUILLIN, E.A.; GRIJALBA, P.E.; OLIVEIRA, de L.O.; GOTTLIEB, A.M. 2014. Specific boundaries between the causal agents of the soybean stem canker. Tropical Plant Pathology. 39(4):316-325.

- GUYOT, J.; EVENO, P. 2015. Maturation of perithecia and ascospores discharge in South American leaf blight of rubber tree. *European Journal of Plant Pathology*. 143(3):427-436.
- HALL, R.; XUE, A.G. 1995. Effectiveness of fungicidal seed treatments applied to smooth or shrivelled soybean seeds contaminated by *Diaporthe phaseolorum*. *Phytoprotection*. 76:47-56.
- HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. (EDS.). 1999. 4th. Ed. Compendium Soybean Diseases. APS Press. Inc., St. Paul, MN, 100 p.
- HEPPERLY P.R.; KIRKPATRICK B.L.; SINCLAIR J.B. 1980. *Abutilon theophrasti*: wild host for three fungal parasites of soybean. *Phytopathology*. 70:307-310.
- HOLLOWELL, J.E.; SHEW, B.B.; CUBETA, M.A.; WILCUT, J.W. 2003. Weed species as hosts of *Sclerotinia minor* in peanut fields. *Plant Disease*. 87:197-199.
- HYDE, K.D.; MCKENZIE, E.H.C.; KOKO, T.W. 2011. Towards incorporating anamorphic fungi in a natural classification checklist and notes for 2010. *Mycosphere* 2:1-88.
- INDEC - INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA Y CENSOS. 2016. Comercio exterior. Complejos exportadores. [En línea] <<http://www.indec.gov.ar/bajarCuadroEstadistico.asp?iDc=4AECBA6BD26E76AB1C8CA9E2CF3896A1676272D4EAFB94B97A5B38FF3C498B3B1D1F9EE71863429A>> [Consulta: 4/7/2017].
- JULIATTI, F.C.; CASTILHO POLIZEL, A.; JULIATTI, F.C. 2004. Manejo integrado de doenças na cultura da soja. 1ª Edição. Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. 327 p.
- KEELING, B.L. 1988. Influence of temperature on growth and pathogenicity of geographic isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Plant Disease*. 72(3):220-222.
- KENDRICK, B. 2000. The Fifth Kingdom. 3er ed. Focus Publ., R. Pullins Co.Sidney Canada. 386 p.
- LAGO M.E. 2010. Etiología y aspectos epidemiológicos del cancro del tallo de la soja en el centro y sudeste bonaerense. Tesis *Magister Scientiae*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 87 p.
- LAGO, M.E.; RIDAO, AdeliC., GUILLÍN, E. Y BARRETO, D. 2009, Etiología del cancro del tallo de la soja en el centro y sudeste bonaerense. 13º Jornadas. Fitosanitarias Argentinas. 30/09-1/02/10/09. Termas de Río Hondo, Sgo.del Estero, Argentina. E56.
- LAGO, M.E.; RIDAO, AdeliC.; SANMARTINO, S. 2007. Prevalencia e incidencia del tallo de la soja en el SE de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Fitopatologia Brasileira*. 32 (Supl.):311.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; HYDE, K.D.; JONES, E.G.B.; MCKENZIE, E.H.C.; HUANG, S.K.; ABDEL-WAHAB, M.A.; DARANAGAMA, D.A.; DAYARATHNE, M.; D'SOUZA, M.J.; GOONASEKARA, I.D.; HONGSANAN, S.; JAYAWARDENA, R.S.; KIRK, P.M.; KONTA, S.; LIU, J.K.; LIU, Z.Y.; NORPHANPHOUN, C.; PANG, K.L.; PERERA, R.H.; SENANAYAKE, I.C.; SHANG, Q.; SHENOY, B.D.; XIAO, Y.;

- BAHKALI, A.H.; KANG, J.; SOMROTHIPOL, S.; SUETRONG, S.; WEN, T.; XU, J. 2015. Towards a natural classification and backbone tree for Sordariomycetes. *Fungal Diversity* 72:199–301. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0331-z>
- MANCEBO, M.F.; BAZZALLO, M.E.; REID, R. 2017. Caracterización morfológica de aislamientos de *Diaporthe* (*Phomopsis*) obtenidos de lesiones de tallo y capítulo de girasol, en Buenos Aires. 4º Congreso Argentino de Fitopatología, Abril 19-21. Mendoza, Argentina. Poster A2-004. [En línea] <<http://aafitopatologos.com.ar/wp/wp-content/uploads/2017/06/Libro-de-res%C3%BAmenes-4%C2%B0-CAF.pdf?05a317>> [Consulta: 19/07/2017].
- MENGISTU, A.; CASTLEBURY, L. A.; MOREL, W.; RAY, J.D.; SMITH, J.R. 2014. Pathogenicity of *Diaporthe* spp. isolates recovered from soybean (*Glycine max*) seeds in Paraguay. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 36(4):470-474.
- MENGISTU, A.; CASTLEBURY, L. A.; SMITH, J.R.; ROSSMAN, A.Y.; REDDY, K.N. 2007. Isolates of *Diaporthe-Phomopsis* from weeds and their effect on soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 29:283-289.
- MONTOYA, M.; RIDAO, AdelC. 2014. Severidad de síntomas causados en soja por aislamientos patogénicos de *Diaporthe caulivora* del sudeste bonaerense. Libro de Resúmenes del 3º Congreso Argentino de Fitopatología, San Miguel de Tucumán, 4 a 6 junio 2014. 469 p. [En línea] <http://aafitopatologos.com.ar/media/secciones/241_desc.pdf?05a317> [Consulta: 15/9/2016].
- MONTOYA, M.; SCHLIE, G.; RIDAO, AdelC. 2017. Cuantificación de pérdidas de rendimiento por *Sclerotinia sclerotiorum* y *Diaporthe caulivora* en soja. 4º Congreso Argentino de Fitopatología, Abril 19-21. Mendoza, Argentina. Poster C-047. [En línea] <<http://aafitopatologos.com.ar/wp/wp-content/uploads/2017/06/Libro-de-res%C3%BAmenes-4%C2%B0-CAF.pdf?05a317>> [Consulta: 19/07/2017].
- MOORE-LANDECKER, E. 1992. Physiology and biochemistry of ascocarp induction and development. *Mycological Research*. 96(9):705-716.
- MOREIRA, M.S.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S.J.P.; CHRISTOFFOLETI, P.J. 2007. Resistência de *Conyza canadensis* e *C. bonariensis* ao herbicida glyphosate. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, 25(1):157-164. [En línea] < DOI: 10.1590/S0100-83582007000100017> [Consulta: 19/07/2017].
- MOSTERT L, KANG JC, CROUS PW, DENMAN S. 2007. *Phomopsis saccharata* sp. nov., causing a canker and dieback disease of *Protea repens* in South Africa. *Sydowia* 53: 227-235.
- NOELTING, M.C; MANTZ, M.G; LAVILLA, M.A; IVANCOVICH, J.A; MOLINA, M.C. 2016. Inespecificidad de cepas de *Phomopsis* en cultivos de girasol y pecan. Libro de Resúmenes 24º Congreso Peruano de Fitopatología. Cuzco, Perú. 95p.
- PADGETT, GUY BOYD, 1992. The Epidemiology of the Soybean/*Diaporthe Phaseolorum* var. *caulivora* Pathosystem in Louisiana. Thesis of Doctor of Philosophy in the Department of Plant Pathology and Crop Physiology. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College. 85 p

- PAPA, J.C.; TUESCA D. 2013 Los problemas actuales de malezas en la región sojera núcleo argentina: origen y alternativas de manejo. En: Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables. Serie Técnica N° 204. INIA. pp. 59-74.
- PERUZZO, A.; PIOLI, R. & FORMENTO, A.N. 2008 Relaciones biomorfológicas entre aislamientos del Complejo *Diaporthe-Phomopsis* obtenidos en diversos ambientes del área agrícola argentina. Soc. de Biología de Rosario. 10° Congreso y 28° Reunión, 3-5 diciembre 2008. Publicación Anual 2008. pp. 146.
- PIOLI, R. 2007. Situación del Complejo *Diaporthe/Phomopsis* en el cultivo de Soja de Argentina. Actas de 3° Congreso de Soja del Mercosur (Rosario-Sta. Fe): Mercosoja. pp. 325-331.
- PIOLI, R. N.; MORANDI, E. N.; MARTÍNEZ, M. C.; LUCCA, F.; TOZZINI, A.; BISARO, V.; HOPP, H. E. 2003. Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. *Phytopathology*. 93:136-146.
- PIOLI, R.; GATTUSO, S.; PRADO, D. 1997. Recent Outbreak of Stem Canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*) of Soybean in Santa Fe, Argentina. *Plant Disease*. 81:1215.
- PIOLI, R.; MORANDI, E.N.; BISARO, V. 2001. First report of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in Argentina. *Plant Disease*. 85(1):95.
- PLOETZ, R.C.; SHOKES, F.M. 1985. Soybean stem canker incited by ascospores and conidia of the fungus causing the disease in the southeastern United States. *Plant Disease*. 69:990-992.
- PLOETZ, R.C.; SHOKES, F.M. 1987. Factors influencing infection of soybean seedlings by Southern *Diaporthe phaseolorum*. *Phytopathology*. 77(6):786-790.
- PLOPER, L.D. 2004. Economic importance of and control strategies for the major soybean diseases in Argentina. Proceedings 7° World Soybean Research Conference. 4° International Soybean Processing and Utilization Conference. 3° Congreso Brasileiro de Soja. Foz do Iguasu. PR, Brazil. pp. 606-614.
- PLOPER, L.D.; GÁLVEZ, R.; GONZÁLEZ, V.; JALDO, H.; DEVANI, M.; SALAS, G. 1999. Efectos de la fecha de siembra sobre la incidencia del cancro del tallo de la soja. *EEAOC – Avance Agroindustrial*. 77:33-38.
- PLOPER, L.D.; GONZALEZ, V.; SALAS, G.; DEVANI, M. 1997. Cancro del tallo: importante enfermedad de la soja en el noroeste argentino. *Avance Agroindustrial* 69:3-7.
- REHNER, S. A.; UECKER, F. A. 1994. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. *Canadian Journal of Botany*. 72:1666-1674.
- RICCIONI, L. 2009. Identificación de las especies del Complejo *Diaporthe/Phomopsis* por Métodos Moleculares. En: SCANDIANI, M.M.; LUQUE, A.G. Identificación de patógenos en Semilla de soja. *Sup. Esp. N° 2 Análisis de Semillas*. pp. 81-84.
- RIDAO, AdelC. 2006. "Soja: Enfermedades de fin de ciclo". *Visión Rural XIII*. (60):05-08.

- RIDAO, AdelC. 2012a. Fechas de siembra y aparición del cancro del tallo de la soja en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Libro Resúmenes 14º Jornadas Fitosanitarias Argentinas. San Luis, Argentina. pp. 123.
- RIDAO, AdelC. 2012b. Cancro del tallo: el enemigo de la soja. *Visión Rural* XIX (92):12-15.
- RIDAO, AdelC.; PLATZ, P. 2013. Effects of stem canker for *Diaporthe caulivora* on soybean yields in the Southeastern Buenos Aires Province, Argentina in 2012. 9º World Soybean Research Conference, Feb 17-22. Durban, South Africa. Poster E.1-185.
- RIDAO, AdelC.; LAGO, M.E. 2007. Cancro del tallo de la soja. *Visión Rural* XIV (68): 56-57.
- ROSSI, M. E. 2008. La semilla como fuente de inóculo del complejo *Diaporthe/Phomopsis* en el centro sur de la provincia de Buenos Aires. Tesis de Grado para Título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 48 p.
- ROSSI, M. E.; RIDAO AdelC. 2009. *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* y *Phomopsis longicolla* en semilla de soja en Buenos Aires, Argentina. 15º Congreso Latinoamericano y 18º Chileno de Fitopatología, 12-16/01/09. Santiago, Chile. pp.283.
- ROSSI, M. E.; RIDAO AdelC. 2011. Principal variante del complejo *Diaporthe/Phomopsis* (*D. p.* var. *caulivora*) vehiculizada por la semilla de soja en el centro sur de la provincia de Buenos Aires. *Análisis de Semilla*. 20(5):80-95.
- ROSSI, M. E.; RIDAO, AdelC.; LAGO M. E. 2008. La semilla de soja como fuente de inóculo de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* en el centro-sur de Buenos Aires. 1º Congreso Argentino de Fitopatología. 28-30/05/08. Córdoba. pp 165.
- ROTHROCK, C.S.; HOBBS, T.W.; PHILLIPS, D.V. 1985. Effects of tillage and cropping system on incidence and severity of southern stem canker of soybean. *Phytopathology*. 75:1156-1159.
- ROTHROCK, C.S.; PHILLIPS, D.V.; HOBBS, T.W. 1988. Effects of cultivar, tillage and cropping system on infection of soybean by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and southern stem canker of soybean. *Phytopathology*. 78:266-270.
- ROY, K.W., RATNAYAKE, S.; MCLEAN, K. 1997. Colonization of weeds by *Phomopsis longicolla*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 19(2):193-196.
- ROY, K.W.; MILLER, W.A.; MCLEAN, K. 1994. Survey of pathogenic genera of fungi on foliage of weeds in Mississippi. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 16:25-29.
- RUPE, J.C.; SUTTON, E.A.; BECTON, C.M.; GBUR, E.E. JR. 1996. Effect of temperature and wetness period on recovery of the southern biotype of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* from soybean. *Plant Disease*. 80(3):255-257.
- RUPE, J.C.; SUTTON, E.A.; BECTON, C.M.; GBUR, E.E. JR. 1999. Effect of Soybean growth stage at the time of inoculation with *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* on stem canker development and yield. *Plant Disease*. 83(6):582-586.

- SÁNCHEZ, M.C.; RIDAO, A.deI.C.; COLAVITA, M.L. 2015. *Diaporthe caulivora*: agente causal de cancro del tallo predominante en cultivos de soja del sudeste bonaerense. Re. FAVE-Ciencias Agrarias 14(2). [En línea] <<https://qoo.gl/PP8MS9>> [Consulta: 5/04/2015].
- SANTOS, J.M.; K. VRANDECIC, K.; COSIC, J.; DUVNJAK, T.; PHILLIPS, A.J.L. 2011. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia*. 27: 9–19.
- SAS/STAT® 9.22 User's Guide, SAS® Publishing, Cary, North Carolina, USA. 74p.
- SCANDIANI, M.M.; LUQUE, A.G. 2009. Identificación de Patógenos en Semillas de Soja. Análisis de semillas. Suplemento especial N° 2. 148 p.
- SISTEMA DE INFORMACIÓN Y GESTIÓN AGROMETEOROLÓGICO – INTA. 2017. Datos históricos [En línea]. < <http://siga2.inta.gov.ar/> > [Consulta: 15/06/17]
- SMITH, E.F.; BACKMAN, P.A. 1989. Epidemiology of soybean stem canker in the southeastern United States: relationship between time of exposure to inoculum and disease severity. *Plant Disease*. 73(6):464-468.
- SUBBARAO, K.V.; PADGETT, G.B.; GEAGHAM, J.P.; SNOW, J.P. 1992a. Influence of soil moisture on formation of perithecia and pycnidia and spore release in *Diaporthe* var. *caulivora*. *Phytopathology*. 82:440-446.
- SUBBARAO, K.V.; SNOW, J.P.; BERGGREN, G.T.; DAMICONE, J.P.; PADGETT, G.B. 1992b. Analysis of stem canker epidemics in irrigated and nonirrigated conditions on differentially susceptible soybean cultivars. *Phytopathology*. 82:1251-1256.
- THOMPSON S.M.; TAN Y.P.; SHIVAS R.G.; NEATE S.M.; MORIN L.; BISSETT A.; AITKEN E.A.B. 2015. Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia. *Persoonia*. 35:39–49.
- THOMPSON S.M.; TAN Y.P.; YOUNG, A. J.; NEATE S.M.; AITKEN E.A.B; SHIVAS R.G. 2011. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. *Persoonia*. 27: 80–89.
- UDAYANGA, D.; LIU, X.Z.; CROUS, P.W.; MCKENZIE, E.H.C. 2012. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity* 56:157-171.
- VALE, F. X. R.; JESUS JUNIOR, W. C. DE; ZAMBOLIM, L. 2004. Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas. Perfil, Belo Horizonte, 531p.
- VRANDECIC, K; COSIC, J.; RICCONI, L.; DUVNJAK, T.; JURKOVIC, D. 2004. *Phomopsis longicolla* – new pathogen on *Abutilon theophrasti* in Croatia. *Plant Pathology*. 53:251.
- WHITE T.J.; BRUNS T.; LEE S.; TAYLOR J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: INNIS, M. A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. eds. PCR Protocols: a guide to methods and applications. New York. Academic Press pp. 315-322.
- WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; GAI, J.; PLOPER, L.D.; PORTAPUGLIA, A.; RAM, H.H.; YORINORI, J.T. 1997. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. *Plant Disease*. 81(1):107-110.

YORINORI, J.T. 1996. Cancro da haste da soja: Epidemiologia e Controle. EMBRAPA Soja. Londrina, Paraná, Brasil. Circular Técnica 14. 75 p.

ZHANG A.W.; HARTMAN G.L.; RICCIONI L.; CHEN W.D.; MA R.Z.; PEDERSEN W.L. 1997. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. Plant Disease. 81(10): 1143-1149.

ZHANG A.W.; RICCIONI L.; PEDERSEN W.L.; KOLLIPARA K.P.; HARTMAN G.L. 1998. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. Phytopathology. 88(12):1306-1314.

ANEXO

Tabla I. Condiciones ambientales en torno a las inoculaciones con solución de ascosporas de *Diaporthe caulivora* para la campaña 2015/16, en la localidad de Balcarce. Precipitación (lluvia), temperatura (máxima, mínima y media), humedad relativa y amplitud térmica durante noviembre y diciembre de 2015 en la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico – INTA).

Día	Mes	Año	Precip 8-8hs (mm)	Temp max. °C	Temp min. °C	Temp med. °C	HR (%)	Amp Termica °C	Día	Mes	Año	Precip 8-8hs (mm)	Temp max. °C	Temp min. °C	Temp med. °C	HR (%)	Amp Termica °C
01	11	2015	0	22,40	6,50	14,5	61	15,9	01	12	2015	3	30,30	11,90	21,1	84	18,4
02	11	2015	0	22,20	10,00	16,1	62	12,2	02	12	2015	0	22,20	12,00	17,1	80	10,2
03	11	2015	0	23,80	6,60	15,2	73	17,2	03	12	2015	0	28,40	13,50	21,0	67	14,9
04	11	2015	0	23,30	2,00	12,7	46	21,3	04	12	2015	0	29,40	16,80	23,1	70	12,6
05	11	2015	0	26,50	7,00	16,8	54	19,5	05	12	2015	0	20,00	10,20	15,1	72	9,8
06	11	2015	0	25,90	7,50	16,7	69	18,4	06	12	2015	0	21,60	6,00	13,8	63	15,6
07	11	2015	0	27,50	9,00	18,3	65	18,5	07	12	2015	0	26,60	7,00	16,8	64	19,6
08	11	2015	0	28,00	11,50	19,8	57	16,5	08	12	2015	0	25,50	14,00	19,8	74	11,5
09	11	2015	0	26,00	13,00	19,5	77	13,0	09	12	2015	0	30,10	9,00	19,6	57	21,1
10	11	2015	0	28,80	12,00	20,4	59	16,8	10	12	2015	0	32,60	8,90	20,8	46	23,7
11	11	2015	0	30,70	8,00	19,4	43	22,7	11	12	2015	0	35,50	9,20	22,4	31	26,3
12	11	2015	34	27,40	8,00	17,7	66	19,4	12	12	2015	0	32,00	14,50	23,3	39	17,5
13	11	2015	0	22,10	11,00	16,6	80	11,1	13	12	2015	4	34,70	13,00	23,9	42	21,7
14	11	2015	0	31,70	12,00	21,9	55	19,7	14	12	2015	4	24,80	12,90	18,9	77	11,9
15	11	2015	0	30,00	17,00	23,5	55	13,0	15	12	2015	0	22,70	12,00	17,4	65	10,7
16	11	2015	0	29,70	16,00	22,9	62	13,7	16	12	2015	0	29,20	11,00	20,1	60	18,2
17	11	2015	19	19,90	12,00	16,0	88	7,9	17	12	2015	0	31,50	16,50	24,0	65	15,0
18	11	2015	0	23,10	8,50	15,8	81	14,6	18	12	2015	0	22,20	10,90	16,6	49	11,3
19	11	2015	0	21,00	9,00	15,0	66	12,0	19	12	2015	0	25,70	10,00	17,9	57	15,7
20	11	2015	0	22,10	4,00	13,1	60	18,1	20	12	2015	0	28,50	10,50	19,5	43	18,0
21	11	2015	10	24,10	8,50	16,3	63	15,6	21	12	2015	0	28,40	13,60	21,0	74	14,8
22	11	2015	0	23,30	8,00	15,7	57	15,3	22	12	2015	0	33,30	17,50	25,4	69	15,8
23	11	2015	0	24,60	9,40	17,0	51	15,2	23	12	2015	0	29,30	15,70	22,5	56	13,6
24	11	2015	0	24,70	11,40	18,1	51	13,3	24	12	2015	0	30,90	8,00	19,5	41	22,9
25	11	2015	0	24,90	9,70	17,3	66	15,2	25	12	2015	0	33,90	14,50	24,2	54	19,4
26	11	2015	4	26,20	14,40	20,3	73	11,8	26	12	2015	0	34,90	16,50	25,7	56	18,4
27	11	2015	15	19,30	13,80	16,6	95	5,5	27	12	2015	0	38,00	19,00	28,5	59	19,0
28	11	2015	0	21,30	12,00	16,7	72	9,3	28	12	2015	0	38,30	18,90	28,6	54	19,4
29	11	2015	0	22,40	10,00	16,2	61	12,4	29	12	2015	0	40,70	21,00	30,9	51	19,7
30	11	2015	0	28,40	6,10	17,3	63	22,3	30	12	2015	0	33,30	18,90	26,1	74	14,4
									31	12	2015	0	27,20	18,00	22,6	81	9,2

* Sombreado rojo indica el momento de inoculación.
Precip. 8-8hs = precipitación como día pluviométrico.

Tabla II. Condiciones ambientales en torno a las inoculaciones con solución de ascosporas de *Diaporthe caulivora* para la campaña 2016/17, en la localidad de Balcarce. Precipitación (lluvia), temperatura (máxima, mínima y media), humedad relativa y amplitud térmica durante noviembre y diciembre de 2016 en la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA).

* Sombreado rojo indica el momento de inoculación.

Día	Mes	Año	Precip 8-8hs (mm)	Temp max. °C	Temp min. °C	Temp med. °C	HR (%)	Amp Termica °C	Día	Mes	Año	Precip 8-8hs (mm)	Temp max. °C	Temp min. °C	Temp med. °C	HR (%)	Amp Termica °C
01	11	2016	12	22,60	10,10	16,4	78	12,5	01	12	2016	0	32,50	12,40	22,5	44	20,1
02	11	2016	0	16,10	7,40	11,8	67	8,7	02	12	2016	0	37,30	17,00	27,2	51	20,3
03	11	2016	0	27,40	6,90	17,2	55	20,5	03	12	2016	0	25,20	12,60	18,9	69	12,6
04	11	2016	0	24,20	13,60	18,9	52	10,6	04	12	2016	0	31,30	15,40	23,4	64	15,9
05	11	2016	0	31,60	11,20	21,4	69	20,4	05	12	2016	3	28,80	16,40	22,6	67	12,4
06	11	2016	0	32,60	14,20	23,4	51	18,4	06	12	2016	0	28,50	11,70	20,1	48	16,8
07	11	2016	0	19,90	10,50	15,2	73	9,4	07	12	2016	0	28,50	9,90	19,2	50	18,6
08	11	2016	15	22,60	5,30	14,0	73	17,3	08	12	2016	0	22,10	8,00	15,1	47	14,1
09	11	2016	2	23,40	13,30	18,4	89	10,1	09	12	2016	0	30,50	9,00	19,8	41	21,5
10	11	2016	0	22,10	9,20	15,7	54	12,9	10	12	2016	0	31,20	15,60	23,4	41	15,6
11	11	2016	0	21,40	4,50	13,0	56	16,9	11	12	2016	0	29,20	11,50	20,4	48	17,7
12	11	2016	6	24,00	4,00	14,0	53	20,0	12	12	2016	1	31,50	12,00	21,8	33	19,5
13	11	2016	0	25,50	12,60	19,1	77	12,9	13	12	2016	0	19,30	9,50	14,4	57	9,8
14	11	2016	0	29,50	12,00	20,8	50	17,5	14	12	2016	0	23,00	7,00	15,0	49	16,0
15	11	2016	0	26,20	11,00	18,6	59	15,2	15	12	2016	0	32,50	9,40	21,0	31	23,1
16	11	2016	3	23,10	5,40	14,3	56	17,7	16	12	2016	0	34,00	14,80	24,4	37	19,2
17	11	2016	0	16,50	4,80	10,7	62	11,7	17	12	2016	25	36,80	16,00	26,4	39	20,8
18	11	2016	0	22,50	1,90	12,2	53	20,6	18	12	2016	7	28,40	16,40	22,4	94	12,0
19	11	2016	0	26,60	8,10	17,4	56	18,5	19	12	2016	0	28,50	13,80	21,2	55	14,7
20	11	2016	0	23,00	10,80	16,9	59	12,2	20	12	2016	0	35,40	12,40	23,9	32	23,0
21	11	2016	0	15,20	7,80	11,5	72	7,4	21	12	2016	8	34,70	16,80	25,8	61	17,9
22	11	2016	0	27,90	3,20	15,6	48	24,7	22	12	2016	0	29,70	13,60	21,7	73	16,1
23	11	2016	0	31,90	10,80	21,4	48	21,1	23	12	2016	0	32,60	15,80	24,2	54	16,8
24	11	2016	0	31,50	11,20	21,5	54	20,3	24	12	2016	1	35,00	15,60	25,3	64	19,4
25	11	2016	0	31,70	12,80	22,3	56	18,9	25	12	2016	0	29,10	17,70	23,4	67	11,4
26	11	2016	0	25,90	15,00	20,5	76	10,9	26	12	2016	0	27,80	16,60	22,2	67	11,2
27	11	2016	0	27,10	12,50	19,8	63	14,6	27	12	2016	0	32,50	10,40	21,5	38	22,1
28	11	2016	0	25,70	10,00	17,9	65	15,7	28	12	2016	0	34,70	16,10	25,4	44	18,6
29	11	2016	0	29,60	9,20	19,4	47	20,4	29	12	2016	0	36,00	18,20	27,1	52	17,8
30	11	2016	0	32,10	11,60	21,9	43	20,5	30	12	2016	0	37,10	19,50	28,3	55	17,6
									31	12	2016	1	37,40	18,50	28,0	71	18,9

Precip. 8-8hs = precipitación como día pluviométrico.

Tabla III. Condiciones ambientales en torno a las inoculaciones con solución de ascosporas de *Diaporthe caulivora* para la campaña 2016/17, en la localidad de Balcarce. Precipitación (lluvia), temperatura (máxima, mínima y media), humedad relativa y amplitud térmica durante enero de 2017 en la localidad de Balcarce (Sistema de Información y Gestión Agrometeorológico - INTA).

Día	Mes	Año	Precip 8-8hs (mm)	Temp max. °C	Temp min. °C	Temp med. °C	HR (%)	Amp Termica °C
01	1	2017	0	31,90	16,40	24,2	54	15,5
02	1	2017	0	32,30	9,50	20,9	37	22,8
03	1	2017	0	32,30	17,40	24,9	64	14,9
04	1	2017	0	30,00	12,60	21,3	36	17,4
05	1	2017	0	22,00	12,00	17,0	40	10,0
06	1	2017	0	29,00	7,40	18,2	49	21,6
07	1	2017	0	33,00	17,20	25,1	55	15,8
08	1	2017	0	25,00	11,00	18,0	70	14,0
09	1	2017	6	31,80	15,50	23,7	82	16,3
10	1	2017	0	29,50	11,50	20,5	60	18,0
11	1	2017	2	32,20	11,50	21,9	50	20,7
12	1	2017	0	34,20	11,60	23,0	51	22,6
13	1	2017	0	28,80	14,00	21,4	48	14,8
14	1	2017	0	32,50	8,20	20,4	49	24,3
15	1	2017	0	29,50	15,50	22,5	59	14,0
16	1	2017	0	31,70	17,20	24,5	64	14,5
17	1	2017	0	32,00	16,00	24,0	62	16,0
18	1	2017	0	30,50	10,80	20,6	45	19,7
19	1	2017	3	36,00	14,00	25,0	59	22,0
20	1	2017	0	34,50	19,40	27,0	62	15,1
21	1	2017	5	37,50	20,50	29,0	44	17,0
22	1	2017	7	30,60	16,00	23,3	80	14,6
23	1	2017	0	27,00	13,60	20,3	76	13,4
24	1	2017	2	27,40	17,60	22,5	76	9,8
25	1	2017	0	20,00	11,10	15,6	59	8,9
26	1	2017	0	22,00	8,70	15,4	61	13,3
27	1	2017	0	28,80	9,30	19,1	54	19,5
28	1	2017	0	33,00	14,00	23,5	42	19,0
29	1	2017	0	35,00	17,00	26,0	42	18,0
30	1	2017	0	35,50	19,50	28,0	45	16,0
31	1	2017	76	31,50	17,50	24,5	88	14,0

* Sombreado rojo indica el momento de inoculación.

Precip. 8-8hs = precipitación como día pluviométrico.

Tabla IV. Receta de medio de cultivo agar papa dextrosa 2 %(APDA).

Ingredientes	Cantidad
Papa *	200 g
Dextrosa	20 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 mL
Ácido láctico 25 %	1 mL

Esterilización en autoclave por 20 minutos a 120° C a 1 at. de presión a nivel de mar.

* Las papas peladas cortadas en cubos se hirvieron en agua destilada estéril por 30 min, luego se filtró y enrasó a un litro.

Tabla V. Receta de medio de cultivo caldo de papa dextrosa 2 %(APDA).

Ingredientes	Cantidad
Papa *	200 g
Dextrosa	20 g
Agua destilada	1000 mL
Ácido láctico 25 %	1 mL

Esterilización en autoclave por 20 minutos a 120° C a 1 at. de presión a nivel de mar.

* Las papas peladas cortadas en cubos se hirvieron en agua destilada estéril por 30 min, luego se filtró y enrasó a un litro.