



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

*Caracterización morfológica, molecular y fisiológica del sistema
Colletotrichum/Glomerella – Glycine max y su relación biológico epidemiológica
con otros hospedantes en la zona productora núcleo de Argentina.*

Ing. Agr. (MSc) Miriam Incremona

Tesis para optar al título de Doctor en Cs Agrarias

Directora: Dra. Rosanna Pioli

Co Director: Dr. Carlos Cairo

Avalado: por la Directora Dra Rosanna Pioli

Co Director: Dr Carlos Cairo

2020

*Caracterización morfológica, molecular y fisiológica del sistema
Colletotrichum/Glomerella – Glycine max y su relación biológico-epidemiológica
con otros hospedantes en la zona productora núcleo de Argentina.*

Ing. Agr. (MSc) Miriam Incremona. Expedido por la Facultad de Cs. Agrarias de la UNR

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Cs. Agrarias de la UNR durante el período comprendido entre 2009 -2019 bajo la dirección de la Dra. Rosanna Pioli.

Nombre y firma del Doctorando: **Ing. Agr. MSc Miriam Incremona**

Nombre y firma del Director: **Dra Rosanna Pioli**

Nombre y firma del Co Director: Dr. Carlos Cairo.

Defendida:de 20__.

AGRADECIMIENTOS

- ∞ A mi querida familia, que pequeña ha quedado, pero están a mi lado, siempre, por ellos seguí adelante.
- ∞ A mi querido amigo FRG, por incondicional, por rezar y por estar siempre a mi lado.
- ∞ A mis amigas queridas Mariela, Florencia, Luciana, Claudia, Inés y María Rosa por ser mi sostén y apoyo durante todo este tiempo
- ∞ A mis compañeros de cátedra por su alegría y estar presentes.
- ∞ A mis compañeros de gestión, quienes me dieron todo su apoyo en todo momento y situación, gracias.
- ∞ A mi grupo de ahorro, por su presencia amiga, su apoyo y por todo lo que han hecho.
- ∞ Por sobre todo a mi querida Madre María, *no temas yo estoy contigo*, así fue y al Sagrado Corazón, que me ha dado la fuerza para seguir.
- ∞ A mi Director y mi CoDirector por el acompañamiento y enseñanza en todo este camino.

DEDICATORIAS

∞ A mis papás queridos de mi corazón, que desde el cielo están conmigo, gracias por su fuerza, están conmigo por siempre.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

- Beca Promagro para carrera de posgrado para jóvenes docentes Convenio. Programa de la Secretaria de Política Universitaria del Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología de la UNR. Diciembre 2006. CD 657/2007. Tesista Ing. Agr. MSc. Miriam Incremona. Director Dra. Rosanna Pioli.
- **Incremona, M.;** Ghío, A; Pioli, R. Biodiversidad fúngica asociada a rastrojo de maíz procedente de la región productora de Argentina. 2009a. XI Congreso y XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 3 y 4 de diciembre. Pág. 183. ISSN 1668- 0154.
- **Incremona, M;** Pioli, R; Ghío, A; Formento, N. 2009b. Caracterización morfológica de aislados del complejo *Glomerella* - *Colletotrichum* obtenidos de diversos hospedantes y regiones de Argentina. III Jornada de Ciencia y Tecnología. Difusión de la Producción Científica y Tecnológica UNR.
- **Incremona, M.;** Pioli, R.; Cairo, C.; A.; Ghio, A.; Formento, N.; Depetris, R. 2011. Infección de cepas de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de diferentes hospedantes y agrosistemas sobre *Glycine max* en Argentina. Mercosoja. Quinto Congreso de la Soja Mercosur / Primer Foro de la Soja Asia – Mercosur. 14 al 16 de septiembre de 2011. Bolsa de Comercio de Rosario. Poster Expuesto en la línea 6.
- **Incremona, M.;** Pioli, R.; Ghio, A. 2011. Evaluación del método de inoculación y escala de severidad para cuantificar antracnosis en maíz en condiciones seminaturales. XIII Congreso y XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Diciembre de 2011. Pág. 162. ISSN 1668- 0154.

- **Incremona, M.;** Pioli, R.; Ghío, A.2012. Reacción de 4 Híbridos de *Zea mays* frente a aislados de *Glomerella/Colletotrichum* causales de antracnosis.XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. San Luis. Argentina. 144 pp.
- **Incremona, M.;** Pioli R; Mariatti A; Rodriguez Randa E; Bocca P; Barrinat N; Aseguinolaza; M; Rodriguez, J. 2013. Primer informe sobre la distribución atípica de las acervulas de *Colletotrichum* sp. sobre tallos de soja (*Glycine max* L) XV Congreso y XXXIII Reunión Anual Sociedad Biología Rosario: 85.
- **Incremona, M.;** Pioli, R.; Ghio, A. Comportamiento de tres cultivares de soja frente a aislados de *colletotrichum* patógenos de soja y maíz en condiciones seminaturales. 2013. XV Congreso y XXXIII Reunión Anual Sociedad Biología Rosario, 11/2013. Rosario: 86
- **Incremona, M.;** Cairo, C.; Pioli, R. Validación molecular de aislados de *Glomerella-Colletotrichum* obtenidos en diferentes hospedantes y ambientes causantes de antracnosis en maíz y soja. 2015. XVII Congreso y XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 30 de noviembre y 1 de diciembre de 2015. Reunión Anual. ISSN 1668-0154. 208 pp.
- Presentación 2º taller nacional de enfermedades en cultivos extensivos sistema: enfermedades del follaje en soja, maíz y trigo. Mildiu en girasol diagnóstico y manejo. *Caracterización del Sistema Glomerella/Colletotrichum en maíz y su relación bio-epidemiológica con otros hospedantes.* Zavalla, 07 de marzo de 2019. Organizado por la UNNOBA y Facultad de Cs. Agrarias UNR.

Jornada de extensión:

Presentación de trabajo en poster en la “Jornada Interdisciplinaria de Capacitación y Transferencia de avances en el conocimiento de los sistemas productivos sustentables de soja”. 25

de Abril de 2012. Jornada de Extensión y Divulgación de Actividades de Investigación en el marco del PEA 2011-12: Estrategias para la Producción sustentable de soja. Facultad de Cs. Agrarias UNR, Zavalla. www.fcagr.unr.edu.ar.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de Cuadros	13
Índice de Figuras	14
Índice de Tablas	19
Abreviaturas y Símbolos	21
Resumen	23
Abstract	25
Organigrama del Trabajo	27
INTRODUCCIÓN	28
Planteo del Problema	30
Referencia del cultivo de soja y estado sanitario	30
Referencia del Complejo fúngico G/C causantes de antracnosis en soja y maíz	33
Relaciones epidemiológicas entre asociaciones del Complejo C/G con otros hospedantes semiextensivos y maíz	36
Hipótesis	42
Objetivo General	42
Objetivo Específico	42
CAPÍTULO 1: Aislamiento, caracterización morfológica y validación molecular de una colección de aislados de G/C.	44
1.1 Introducción	43
1.1.1 La enfermedad y su agente causal	43
1.1.2 Biología y variabilidad de G/C	45
1.1.3 Caracterización morfológica y molecular de G/C	46
1.2 Materiales y Métodos	50
1.2.1 Obtención de aislados de G/C	50

1.2.2 Aislados y conservación de las cepas fúngicas	50
1.2.3 Determinación de la presencia y frecuencia de aislados fúngicos en las muestras	52
1.2.4 Caracterización morfológica y determinación de identidad de las cepas de G/C	53
1.2.5 Caracterización molecular y validación de la identidad de G/C	54
1.2.6 Aislados G/C seleccionados para las Interacciones de planta, patógeno y ambiente	57
1.3 Resultados	59
1.3.1 Diversidad de aislados obtenidos desde el material vegetal relevado.	59
1.3.2 Determinación de presencia y frecuencia de aislados fúngicos obtenidos de dos sustratos diferentes (plantas y muestras de rastrojo)	59
1.3.3 Desarrollo de colonias de la colección fúngica	61
1.3.4 Caracterización de aislados de G/C por marcadores macro y micromorfológicos	62
1.3.5 Identificación molecular por secuencias de fragmentos y caracterización por RAPDs	78
1.4 Discusión	87
1.5 Conclusiones	91
CAPÍTULO 2: Caracterización de las interacciones entre cultivos y el complejo G/C y detección de fuentes de resistencia a la enfermedad.	93
<i>Sección I: SOJA</i>	
I 2.1 Introducción	93
I 2.2 Materiales y Métodos	97
I 2.2.1 Ajustes metodológicos. Aplicación del 3° Postulados de Koch	97
I 2.2.2 Aplicación del 3° Postulados de Koch	103
I 2.2.3 Siembra, inoculación y cuantificación en el 1° año de experimentación	104
I 2.2.3.1 Aplicación de 4° Postulado de Koch	107
I 2.2.4 Siembra, inoculación y cuantificación en el 2° año de experimentación	107
I 2.3 Resultados	108

I 2.3.1 Ajustes metodológicos. Aplicación del 3° postulados de Koch con los aislados obtenidos en el capítulo 1	108
I 2.3.2 Resultados del 1° año de experimentación	111
I 2.3.3. Resultados del 2° año de experimentación	115
I 2.3.4. Resultado integrado de ambos ciclos experimentales	120
I 2.3.5 Primer reporte de distribución atípica de signos de G/C	129
I 2.4 Discusión	130
I 2.5 Conclusiones	134
 <i><u>Sección II: MAÍZ</u></i>	
II 2.1 Introducción	136
II 2.2 Materiales y Métodos	141
II 2.2.1 Ajustes Metodológicos. Aplicación del 3° postulados de Koch con los aislados identificados en el capítulo 1	141
II 2.2.1.1 Material Biológico fúngico y vegetal	141
II 2.2.1.2 Propuesta de Escala de Severidad	143
II 2.2.1.3 Aplicación del 4° Postulado. reaislados e identificación a partir del material inoculado	146
II 2.2.2 Siembra e inoculación en condiciones seminaturales de invernadero. 1° año de experimentación	146
II 2.2.2.1 Selección de los híbridos del cultivo hospedante maíz y de los aislados de G/C	146
II 2.2.2.2 Metodología aplicada para evaluar IPPA	148
II 2.2.3 Siembra e inoculación en condiciones de campo. 2° año de experimentación	150
II 2.2.3.1 Colección fúngica e inocular y hospedantes seleccionados	150
II 2.2.3.2 Inoculación a campo	151
II 2.2.1.3 Evaluación y Cuantificación	152

II 2.3 Resultados	154
II 2.3.1 Efectividad de punto de inoculación para ambos años de experimentación	154
II 2.3.2 Resultados del 1° año de experimentación	155
II 2.3.2.1 Aplicación del 4° postulados de Koch, re – aislado e identificado a partir del material inoculado	159
II 2.3.3 Resultados del 2° año de experimentación	160
II 2.3.3.1 Aplicación del 4° postulados de Koch, re – aislado e identificado a partir del material inoculado en el 2 año de experimentación	161
II 2.3.4 Resultados Comparativos de ciclos experimentales a) individuales y b) analizados integralmente	161
II 2.3.4.1 Analisis de las interacciones años por genotipos de maiz	165
II 2.4 Discusión	169
II 2.5 Conclusiones	171
CAPÍTULO 3: Efecto de la secuencia de cultivos (rotación) sobre las interacciones de soja y aislados del complejo G/C bajo condiciones seminaturales. Estudio epidemiológico	173
3.1 Introducción	173
3.2 Materiales y Métodos	178
3.2.1 Experimentación seminatural en condiciones parciales de invernadero	178
3.2.2 Evaluación y cuantificación de la enfermedad.	179
3.3 Resultados	181
3.3.1 Resultados de los dos ciclos agrícolas	181
3.3.2 Aplicación del 4° postulados de Koch, reaislado e identificado a partir del material cosechado	189
3.4 Discusión	190
3.5 Conclusiones	193

Conclusión Final	195
Bibliografía	199
Anexo	228

ÍNDICE DE CUADROS (Sección Soja / Maíz (números romanos) – Capítulo- - orden
(número arábigo)

I 2 - 1 Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)	111
I 2 - 2 Cuadro de interacciones específicas entre los genotipos de soja evaluados y los aislados de G/C115	
I 2 - 3 Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)	116
I 2 - 4 Cuadro de interacciones específicas entre los genotipos de soja evaluados y las cepas de G/C 120	
I 2 - 5 Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)	121
I 2 - 6 Cuadro de interacciones específicas entre los dos ciclos evaluados (años) y los genotipos de soja evaluados.	126
I 2 - 7 Cuadro de interacciones específicas entre los 3 genotipos de soja y las 6 cepas de G/C inoculadas.	127
II 2 - 1 Análisis de la Varianza (SC tipo I)	162
II 2 - 2 Interacción entre los aislados de <i>Colletotrichum spp</i> inoculados en las cañas de maíz y los 3 genotipos de maíz evaluados en los dos años agrícolas	167
3 - 1 Procedencia y hospedante de los aislados de G/C asociados al rastrojo de maíz infectado en ciclo anterior y que fue utilizado como fuente de inóculo seminatural en soja en condiciones de invernadero.	178

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo- - orden (número arábigo)

1 - 1 Mapa de la República Argentina y países limítrofes donde se indican las 5 localidades o áreas de recolección de muestras con síntomas de antracnosis causada por <i>G/C</i>	51
1 - 2 a: Tallos de maíz con síntomas de antracnosis causado por <i>Colletotrichum</i> spp: Tallos de maíz con acérvulas (signos) de <i>Colletotrichum</i> spp. Tallos de soja con síntomas de atizonamiento o antracnosis; Tallos de soja con acérvulas (signos) de <i>Colletotrichum</i> spp	52
1 - 3 Porciones de tallos de soja y de maíz inoculados con micelio de <i>Colletotrichum</i> spp.	54
1 - 4 Secciones de tallo sembrados en placas de petri con APGA; Placa de Petri con APGA con colonias de <i>Colletotrichum</i> sp; cultivo puro de <i>Colletotrichum</i> spp obtenido por transferencia o repique a tubo de ensayo con medio APGA en plano inclinado	59
1- 5 Colonia de <i>Aspergillus niger</i>	62
1 - 6 Colonia, esporodoquios y macroconidios de <i>F. graminearum</i>	62
1 - 7 Acérvulas con setas de <i>Collectotrichum</i> spp	62
1 - 8 Conidios <i>C. graminicola</i> ; Conidios <i>C. gloeosporioides</i>	62
1 - 9 Conidios curvos tipo luna de <i>C. graminicola</i> ; colonia en tubo inclinado de APGA; colonia en caja de petri en APGA, con presencia de acervulas (flecha roja) con sus setas negras.	65
1 - 10 Conidios curvos tipo sonrisa de <i>C. truncatum</i> ; peritecios, signo sexual de <i>C. truncatum</i> ; colonia en tubo inclinado de APGA; tallo de soja con presencia de micelio y gutulas color crema en APGA	66
1 - 11 Conidios curvos y acervula con setas oscuras en medio de APGA; conidios curvos de <i>C. graminicola</i> ; Colonia en tubo inclinado de APGA; e: tallo de soja con acervulas de <i>C. graminicola</i> .	67
1 - 12 Conidios curvos en medio de APGA; acervulas con setas negras en APGA; colonia en tubo inclinado de APGA; tallo de soja con acervulas alineadas de <i>C. truncatum</i>	68
1 - 13 Conidios cilíndricos con bordes redondeados en medio de APGA; micelio de <i>Colletotrichum</i> con presencia de gútulas anaranjadas	69
1 - 14 Conidios curvos de <i>C. graminicola</i> en medio de APGA; acérvulas con setas de color negras alargada; micelio de <i>Colletotrichum</i> spp afelpado de color negruzco, tubo inclinado en APGA	70
1 - 15 Conidios curvos de <i>C. graminicola</i> en medio de APGA; presencia de dos tipos de conidios, unos falcados y otros más pequeños ovalados; caña de maíz con presencia de acérvulas	70
1 - 16 Conidios de <i>C. truncatum</i> en medio de APGA; colonia de <i>C. truncatum</i> con gútulas naranjas; colonias en tubo inclinado en medio de APGA; tallo de soja con infección latente con signos	72
1 - 17 Conidios de <i>C. truncatum</i> en medio de APGA; tallo de soja con acérvulas ubicadas linealmente; colonia de <i>C. truncatum</i> en tubo inclinado en medio de APGA.	73
1 - 18 Conidios y acérvulas de <i>C. graminicola</i> en medio de APGA; tubo inclinado en medio de APGA con colonia de <i>C. graminicola</i> ; planta de soja inoculada con AC17	74
1 - 19 Conidios de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de APGA; c: colonia de <i>C. truncatum</i> en tubo inclinado en medio de APGA.	75

1 - 20 Conidios de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de APGA; colonia de <i>C. truncatum</i> en tubo inclinado en medio de APGA; colonia de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de APGA; acérvulas en medio de APGA	76
1 -21 Conidios de <i>C. truncatum</i> en medio de APGA; colonia de <i>C. truncatum</i> en tubo inclinado en medio de APGA.	77
1 - 22 Conidios de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de APGA; colonia de <i>C. gloeosporioides</i> en caja de petri en medio de APGA, donde se observa el crecimiento de la colonia, atizonamiento del aislado AC32	78
1 - 23 Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata mostrando los productos de amplificación de ADN a partir de la técnica de RAPDs utilizando los cebadores OPA1 y OPA6 y en 10 aislados de la colección de <i>Collectotrichum</i> spp	79
1 - 24 Dendrograma de los aislados de <i>Collectotrichum</i> spp obtenido en base al análisis de presencia ausencia de bandas generadas por la técnica de RAPDs utilizando los cebadores OPA 1 y OPA 6	80
1 -25 Gel de agarosa mostrando la calidad del ADN genómico obtenidos de los 10 aislados de G / C	84
1 - 26 Productos de amplificación de la región ITs1-5.8s-ITs4 del ADNr de 10aislados de la colección de <i>Colletotrichum</i> sp. obtenidos a partir de los cebadores ITs1 e ITs4	84
(Seccion Soja / Maiz (números romanos) – Capítulo- - orden (número arábigo)	
I 2 - 1 Plantas de soja a inocular e inoculadas en la cámara de crecimiento, bandejas con los genotipos de soja preparados para ser noculados en invernadero.	97
I 2 - 2 Tallos de soja con sintomas de antracnosis, se observa la presencia de acérvulas, signo de la enfermedad.	98
I 2 - 3 Colección de aislado de G/C en tubos con medio de APGA	98
I 2 - 4 Planta de soja inoculada con el aislado AC13, se observa el comienzo de la expresión de la enfermedad; planta de soja inoculada con el aislado AC 24	103
I 2 - 5 Invernadero de vidrio donde se realizó la siembra e inoculaciones de los genotipos de soja con los distintos aislados; plantas de soja inoculadas en macetas	105
I 2 - 6 Tallos de soja obtenidos de las distintas regiones sojeras y maiceras con síntomas de atizonamiento y acérvulas; aislados que se multiplicaron en APGA	105
I 2 - 7 Valor promedio de Severidad (SE %) de antracnosis en las cepas de G/C, utilizadas en el ajuste metodológico, referenciados en la Tabla I 2 - 3	110
I 2 - 8 Plantas de soja para inocular en la cámara de luz; tallos de soja con síntomas de antracnosis, presencia de acérvulas; tallos de soja con atizonamiento; placas de APGA con tallos de soja con síntomas (izquierda) y asintomáticos (derecha)	111
I 2 - 9 Valor promedio de Severidad (SE%) expresado en porcentaje de los entrenudos infectados de los cultivares estudiados: cv Corsoy 79; cv DM 4870; cv 155	112
I 2 - 10 Valor promediode Severidad de entrenudos (SE %) de las cepas de G/C en los 3 cultivares (genotipos) cv Corsoy 79; cv DM4870 y cv155 en el 1° año de experimentación.	113
I 2 - 11 Valores promedios de Severidad (SE %) expresados en porcentaje de los entrenudos infectados con las 6 cepas de <i>Colletotrichum</i> spp (valor promedio de las cepas) en los 3 genotipos de soja.	114

I 2 - 12 Tallos de soja inoculados con el aislado AC16; siembra en APGA de los tallos de soja sintomáticos y asintomáticos pos inoculación; tallos de soja en APGA con signos y síntomas de <i>Colletotrichum</i>	115
I 2 - 13 Comparación de los cultivares estudiados: Cv Corsoy 79; Cv DM4870; Cv 155, obtenido a través de los valores promedios de Severidad expresados en porcentaje (SE %) de los entrenudos inoculados e infectados con G/C	117
I 2 - 14 Virulencia de las cepas de <i>Colletotrichum spp</i> de cada aislado: AC1, AC6, AC13, AC16, AC24 y AC32, referenciados en la Tabla 2, expresado por el valor promedio de Severidad de entrenudos (SE %) de antracnosis en los 3 cultivares (genotipos)	118
I 2 - 15 Valores promedios de Severidad de entrenudos (SE %) expresados en porcentaje de los entrenudos infectados con las 6 cepas de <i>Colletotrichum spp</i> (valor promedio de las cepas) en los 3 genotipos evaluados	119
I 2 - 16 Severidad expresada en porcentaje (SE %) de antracnosis en los 3 genotipos de soja (valor promedio), inoculados con las 6 cepas de <i>Colletotrichum spp</i> en los dos ciclos evaluados	121
I 2 - 17 Severidad expresada en porcentaje (SE %) de antracnosis en los entrenudos de los tres genotipos estudiados: 1: Cv Corsoy 79; 2: Cv DM 4870; 3: Cv 155	122
I 2 - 18 Efecto de la antracnosis en los genotipos de soja, sobre los entrenudos infectados con diferentes aislados de <i>Colletotrichum spp</i>	123
I 2 - 19 Severidad de entrenudos (SE %) promedio expresada en porcentaje de antracnosis causada por la virulencia de las 6 cepas de G/C	124
I 2 - 20 Interacción aislado fúngico (6 aislados) <i>Colletotrichum</i> x ambiente (2 Años), evaluado según la variable Severidad % promedio de antracnosis en los entrenudos sintomáticos del valor promedio de los 3 genotipos	125
I 2 - 21 Interacción aislado fúngico (6 aislados) <i>Colletotrichum</i> x ambiente (2 Años), evaluado según la variable Severidad % promedio de antracnosis en los entrenudos sintomáticos del valor promedio de los 3 genotipos	126
I 2 - 22 Valores promedios de Severidad expresada por el porcentaje (%) de antracnosis observadas en los entrenudos infectados de 3 genotipos de soja con las 6 cepas de G/C	128
I 2 - 23 Tallo de soja inoculado con presencia de acérvulas (signo de <i>Colletotrichum spp</i>) distribuidas en forma alineada; acérvulas distribuidas al azar y en forma alineada; tallo de soja inoculado con presencia de acérvulas distribuidas al azar.	129
II 2 - 1 Ciclo de vida de <i>Colletotrichum graminicola</i>	139
II 2 - 2 Invernáculo donde se realizaron las inoculaciones; planta de maíz preparada para ser inoculada en invernadero	141
II 2 - 3 Colonias de diferentes aislados de <i>Colletotrichum</i> seleccionados para ser multiplicados en APGA y posteriormente inoculados en condiciones de invernadero	142
II 2 - 4 Planta de maíz para inocular	143
II 2 - 5 Estado adulto de los híbridos de maíz inoculados bajo la cubierta plástica; punto de inoculación del aislado AC 1.	147

II 2 - 6 Cañas de maiz con síntomas de atizonamiento; tallos de soja con síntomas de puntuaciones al azar; tallos de mandarina con síntomas de antracnosis	148
II 2 - 7 Cañas de maíz inoculadas en el invernadero; caña de maíz inoculada y con síntomas de atizomamiento; cañas de maíz recolectadas con síntomas de antracnosis ; cañas de maíz inoculada con el aislado AC16	150
II 2 - 8 Siembra de los híbridos de maiz; inoculación por inyección y recolección de cañas inoculadas	152
II 2- 9 Sintomatología característica de antracnosis en cañas inoculadas con AC1 y AC32	153
II 2 -10 Evaluación de la efectividad de los sitios de inoculación en base a valores promedio de Severidad de entrenudos (%) para antracnosis en maíz	155
II 2 - 11 Rangos de Incidencia de Entrenudos expresados en porcentaje (IE%) en los 4 híbridos de maíz evaluados en el 1° año de experimentación	156
II 2 - 12 Rangos de Incidencia de Entrenudos expresados en porcentaje (IE%) infectados con los 10 aislados de <i>Colletotrichum</i> spp	157
II 2 - 13 Rangos de <i>Severidad</i> expresados en porcentaje (SE %) de antracnosis en maíz, en los híbridos que fueron estudiados en el 1° año de experimentación	158
II 2 - 14 Rangos de <i>Severidad</i> promedio expresados en porcentaje (SE%) infectados con los 10 aislados de <i>Colletotrichum</i> spp	159
II 2 -15 Cañas de maiz inoculadas con el aislado AC16, con sintomas de atizonamiento de <i>Colletotrichum</i> spp; Colonias de <i>Colletotrichum</i> spp obtenidas a partir de las cañas sintomáticas inoculadas	159
II 2 - 16 Evaluación de la Severidad Entrenudos expresada en porcentaje (SE %) de los híbridos estudiados en el 2° Año de experimentación	160
II 2 - 17 Evaluación de la Severidad Entrenudos expresada en porcentaje (SE %) de los aislados inoculados en las cañas de maíz de los híbridos en estudio	161
II 2 - 18 Comparación de IE % promedio expresado en porcentaje de los dos años de experimentación. En el análisis se utilizaron los 3 híbridos que fueron estudiados en ambos años agrícolas	163
II 2 - 19 Valores de Severidad Entrenudos (SE %) expresado en porcentaje de los 3 híbridos evaluados en los dos ciclos agrícolas	164
II 2 - 20 Evaluación de los porcentajes de Severidad Entrenudos, (SE%) en los diferentes aislados inoculados.	164
II 2 - 21 Rangos de Severidad promedio expresados en porcentaje (SE %) de la interacción entre los años agrícolas y genotipos de maíz	165
II 2 -22 Interacción de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp (AC) en ambos años agrícolas, expresados en rangos de Severidad entrenudos promedio en porcentaje	166
II 2 – 23 Interacción entre los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp inoculados en las cañas de maíz y los 3 genotipos de maíz evaluados en los dos años agrícolas	167
II 2 – 24 Evaluación de la incidencia de los entrenudos infectado con <i>Colletotrichum</i> spp (IE %) al ser inoculados	168

3 - 1 Ciclo biológico de <i>Colletotrichum</i> spp.	175
3 - 2 Estrategias de infección adoptadas por las especies de <i>Colletotrichum</i> spp	177
3 - 3 Invernadero con cobertura plástica superior con una malla antigranizo, siembra de los surcos con las variedades de soja y los carteles blancos que se observan indican cada AC	179
3 - 4 Tallos de soja con síntomas de atizonamiento con presencia de acérvulas (signos) distribuidas al azar; tallos de soja con presencia de acérvulas distribuidas al azar y en forma lineada	180
3 - 5 Comparación de los 2 ciclos agrícolas, expresados por los valores promedios de Severidad en porcentaje (SE %) de los tallos de soja de 3 genotipos	182
3 - 6 Comparación de los cultivares estudiados expresados por los valores promedio de SE % de 3 cultivares de soja en su respuesta a la infección por 5 aislados de <i>Colletotrichum</i> spp	183
3 - 7 Comparación de los aislados estudiados, expresados por los valores promedio de la Severidad de entrenudos (SE %) indicados en porcentaje	184
3 - 8 Valores promedio de Severidad expresado en porcentaje de los entrenudos infectados (SE %) en cultivares de soja en su respuesta a la infección por los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp	185
3 - 9 Valores de Severidad promedio, expresado en porcentaje en el comportamiento de 3 cultivares de soja en un manejo de siembra directa, con rastrojo en superficie como fuente de inóculo, en cada año agrícola evaluado.	186
3 - 10 Interacción año agrícola por aislados expresados en porcentaje. de los valores de severidad de entrenudos promedio	187
3 - 11 Valores de Severidad Entrenudos (SE %) promedio, expresados en porcentaje, en la interacción genotipo por aislado de <i>Colletotrichum</i> spp	189
3 - 12 Siembra de tallos de soja infectados con AC16 en APGA y la formación de colonias, confirmación del 4° postulado de Koch; tallos de soja infectados con AC16 mostrando la presencia de acérvulas color crema	189

ÍNDICE DE TABLAS: Capítulo- - orden (número arábigo)

1 - 1 Cebadores utilizados en la amplificación de los aislados, secuencia y especificidad respecto a las distintas especies de <i>Collectotrichum</i> spp	55
1 - 2 Aislados de <i>Collectotrichum</i> spp de diferentes hospedantes que fueron analizados por fragmentos polimórficos amplificados por PCR utilizando los cebadores ITS 1 e ITS 4	57
1 - 3 Procedencia y hospedante de los aislados de <i>Glomerella/ Colletotrichum</i> que fueron incluidos en el programa de inoculaciones cultivos – aislados G/C	58
1 - 4 Valores de frecuencia relativa expresados en porcentaje (Fr %), de los patógenos obtenidos de tallos de soja y maíz de diversas áreas ecológicas	60
1 - 5 Valores de Incidencia (%) de los principales agentes patógenos en muestras de rastrojos de maíz	60
1 - 6 Detalle de codificación, hospedantes, localidades agro ecológicas de procedencia de los aislados de <i>Glomerella-Colletotrichum</i>	63
1 - 7 Hospedantes y procedencia de la colección de aislados del complejo <i>Glomerella /Colletotrichum</i> obtenidos	64
1 - 8 Identificación morfológica de colonias y fructificaciones de los principales aislados obtenidos de la colección <i>Glomerella / Colletotrichum</i> indicando procedencia y hospedante	65
1 - 9 Nómina de los aislados G/C y sus respectivos hospedantes que fueron caracterizados molecularmente por RAPDs mediante los cebadores OPA 1 y OPA6	78
1 - 10 Dendogramas obtenidos con los cebadores individuales OPA 1, 6, 3, 5 y 8 para los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp usados en las Inoculaciones	82
1 - 11 Validación de la identidad de cada aislado de <i>Glomerella / Colletotrichum</i> por marcadores morfológicos (MM) y la caracterización molecular por RAPDs	83
1 - 12 Validación de la identidad de cada aislado de <i>G / C</i> por marcadores morfológicos y la secuenciación del marcador molecular por ITS 4 con su puntuación (score) y porcentaje de identidad	845
1 - 13 Validación de la identidad de cada aislado de <i>G/C</i> identificado por su procedencia por marcadores morfológicos (MM) y moleculares molecular (MMo) por RAPDs y ITS 4	85
Sección Soja / Maiz (números romanos) – Capítulo- - orden (número arábigo)	
I 2 -1 Escala con 5 grados de severidad propuesta para cuantificar antracnosis en soja	101
I 2 - 2 Aislados de G-C inoculados en soja con el detalle de hospedante y procedencia agroecológica	106

I 2 - 3 La severidad promedio de la antracnosis de soja producidos por cepas de diferentes especies de <i>Colletotrichum</i> spp. obtenidas de distintos hospedantes y localidades, inoculadas en soja cv DM4870	109
I 2 - 4 Cumplimiento del 4° postulado de Koch mediante el reaislado de <i>Colletotrichum</i> spp a partir de tallos de soja inoculados e incubados en APGA	110
II 2 - 1 Detalle de codificación, localidades agro ecológicas de procedencia y hospedante de aislados de <i>Colletotrichum</i> (AC) utilizados en el ajuste metodológico	142
II 2 - 2 Característica de los híbridos comerciales de maíz inoculados con diferentes aislados de <i>Glomerella-Colletotrichum</i> en condiciones de invernadero durante el ajuste metodológico	142
II 2 - 3 Escala con 5 grados de severidad propuesta para cuantificar antracnosis en maíz	145
II 2 - 4 Comportamiento de los híbridos comerciales de maíz inoculados con diferentes aislados de <i>Glomerella-Colletotrichum</i> en condiciones de campo durante el ajuste metodológico	147
II 2 - 5 Detalle de codificación, hospedantes, localidades agro ecológicas de procedencia de los aislados de G-C.	148
II 2 - 6 Detalle de codificación, hospedantes, localidades agro ecológicas de procedencia de aislados inoculados de G-Cen el 1° año de experimentación	149
II 2 - 7 Característica de los híbridos comerciales de maíz inoculados con los aislados de la Tabla II 2 - 6 en condiciones de campo en el 2° año de experimentación	151
3 - 1 Cuadro de Análisis de la Varianza de las interacciones entre años, cultivares y aislados	181
3 - 2 Interacción entre cultivar (genotipo) y aislados de <i>Glomerella / Colletotrichum</i>	188

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AC	Aislado de <i>Colletotrichum</i>
AM	Antracnosis en maíz
AS	Antracnosis en soja
<i>C. gl</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
<i>C. gr</i>	<i>C. graminicola</i>
<i>C. tr</i>	<i>C. truncatum</i>
Cv(s)	Cultivar(es)
dpi	días post inoculación
Fig.	Figura
Fr	Frecuencia relativa
G/C	<i>Glomerella/Collectotrichum</i>
Horas	hs
I	Incidencia
IE	Incidencia de Entrenudos
IPP	Interaccion Planta Patógeno
IPPA	Interaccion Planta Patógeno Ambiente
L	Litro
mA.	Miliamperio
MMo	Marcador(es) Molecular(es)
MM	Marcador (es) Morfológico
MR	Moderadamente Resistente
MS	Moderadamente Susceptible

Mt	Millones de toneladas
Mha	Millones de hectáreas
Mz	Maíz
N	Nitrógeno
P/V	Peso sobre volumen
pb	Pares de bases
PK	Postulados de Koch
PM	Planta(s) Muerta(s)
PPP	Planta Patógeno Ambiente
PV	Planta (s) Viva (s)
R	Resistente
s	Segundo
Se	Severidad
S	Susceptible
SE	Severidad de Entrenudos
Sj	Soja
Sm	Similitud
t	Toneladas
TAE	Tris-Acetato, EDTA
udE	Unidades de Euclidea
vf	Volumen final
v/v	Volumen sobre volumen
%PM	Porcentaje de Plantas Muertas
μm	Micron

RESUMEN

Las enfermedades constituyen un factor limitante para la producción vegetal tanto en el rendimiento como en la calidad de la semilla de cereales y oleaginosos. La antracnosis es una enfermedad asociada al cultivo de soja y maíz, causada por las especies de hongos que conforman un complejo conocido como enfermedades de fin de ciclo (EFC). El complejo fúngico *Glomerella/Colletotrichum* (G/C) es un binomio constituido por un Ascomycota (fase sexual, perfecta o teleomorfo) y un Deuteromycota (fase asexual, imperfecta o anamorfo), que causa antracnosis en diversas especies vegetales de las familias *Fabaceae*, *Poaceae*, *Solanaceae* y *Rosaceae*. Este complejo G/C muestra amplia *variabilidad* genética y especificidad fisiológica al interactuar con diferentes genotipos de un mismo y/o diferentes hospedantes. Los objetivos del trabajo fueron **a)** Validar morfológica y molecularmente las identidades de la colección de aislados del complejo G/C obtenidos en plantas sintomáticas de diferentes familias y especies de hospedantes y diversos ambientes de la zona núcleo; **b)** Caracterizar el comportamiento (avirulencia/virulencia) de los diversos aislados del complejo fúngico y la reacción (resistencia/susceptibilidad) de los hospedantes en base a la observación fenotípica e identificar fuentes de resistencia a la enfermedad en los cultivos evaluados y **c)** Evaluar el complejo G/Cy sus interacciones bajo condiciones seminaturales en una rotación soja – maíz. Durante dos ciclos agrícolas, se evaluaron las asociaciones resultantes de la interacción de 3 genotipos de soja y 5 híbridos de maíz con 6 aislados G/C obtenidos de tallos sintomáticos de ambos cultivos y de cítricos, provenientes de las provincias de Santa. Fe, Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos. La identidad fue propuesta por macro y micromorfología y validada molecularmente por RAPDs y secuenciación de amplicones de ITs. Las inoculaciones en soja se realizaron por herida en el estado fenológico de V3. Las evaluaciones se realizaron según los parámetros de Incidencia (IE) y Severidad de entrenudos (SE). Las inoculaciones en maíz se realizaron con jeringa en el estado Vt y R1. Se evaluó IE % y SE % cada 10 días posterior a la inoculación hasta finalizar el ciclo

del cultivo. En ambos cultivos (soja y maíz) se pudo determinar una Escala de 5 grados para cuantificar severidad de antracnosis en entrenudos. Tanto los cultivares de soja como los de maíz mostraron diferencias en su respuesta de resistencia y susceptibilidad, expresados en IE y SE promedio frente al patógeno, y se detectaron además interacciones específicas significativas. Los aislados de *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* provenientes de cultivos de soja y de mandarina fueron los más virulentos en las inoculaciones de maíz. Mientras en soja, las cepas de *C. graminicola*, *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* resultaron virulentas según la severidad de antracnosis en los entrenudos. Las infecciones se produjeron con mayor severidad en el segundo entrenudo avanzado hacia el ápice y hacia la base. Para el cumplimiento del tercer objetivo se realizó un ensayo en parcelas bajo cubierta antigranizo, simulando condiciones naturales, donde se sembraron los tres genotipos de soja sobre rastrojo de maíz infectado independientemente con cinco cepas de G/C provenientes de hospedantes maíz y soja. Estos resultados mostraron que los genotipos de soja se infectaron y expresaron síntomas de antracnosis causadas por aislados de diferentes hospedantes y zonas agroecológicas, registrándose diferencias significativas en todas las interacciones. En este sistema de rotación maíz – soja (ambos hospedantes de G/C), el rastrojo de maíz infectado de antracnosis resultó efectivo como fuente de inóculo primario de *C. graminicola*, *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* e iniciar un proceso patógeno en los genotipos de soja. Demostrando un riesgo epidemiológico para un sistema productivo basado en la alternancia de cereales y oleaginosos, implementado y generalizado entre los productores de la región centro. Por ello, la determinación de genotipos de soja y maíz con respuestas diferenciales (R, MR/MS y S) frente a diferentes cepas del patógeno, permitirá su incorporación en futuros programas de mejoramiento.

Palabras claves: Antracnosis; Soja, Maíz, *Collectotrichum spp*; Interacciones Planta Patógeno; Epidemiología.

Abstract

Morphological, molecular and physiological characterization of the Colletotrichum / Glomerella - Glycine max system and its bio-epidemiological relationship with other hosts in the core producing area of Argentina.

Caracterización morfológica, molecular y fisiológica del sistema Colletotrichum/Glomerella – Glycine max y su relación bio-epidemiológica con otros hospedantes en la zona productora núcleo de Argentina.

Diseases constitute a limiting factor for plant production, both in the yield and quality of cereal and oilseed seeds. Anthracnose is a disease associated with the cultivation of soybeans and corn, caused by the species of fungi that make up a complex known as end-of-cycle diseases (CFEs). The *Glomerella / Colletotrichum* (G/C) fungal complex is a binomial consisting of an Ascomycota (sexual, perfect or teleomorphic phase) and a Deuteromycota (asexual, imperfect or anamorphic phase), which causes anthracnose in various plant species of the Fabaceae families, Poaceae, Solanaceae and Rosaceae. This G/C complex shows wide genetic variability and physiological specificity when interacting with different genotypes of the same and / or different hosts. The objectives of the work were a) To validate morphologically and molecularly the identities of the collection of isolates of the G/C complex in symptomatic plants of different host families and species and various environments of the core zone; b) Characterize the behavior (avirulence / virulence) of the various isolates of the fungal complex and the reaction (resistance / susceptibility) of the hosts based on phenotypic observation and identify sources of resistance to the disease in the evaluated crops and c) Evaluate the G/C complex and its interactions under semi-natural conditions in a soybean-corn rotation. During two agricultural cycles, the associations resulting from the interaction of 3 soybean genotypes and 5 maize hybrids with 6 G/C isolates obtained from symptomatic stems of both crops and citrus fruits from the Santa Fe, Buenos Aires, Córdoba and Entre Ríos provinces, were evaluated. The identity was proposed by macro and micro-morphology and molecularly validated by RAPDs and ITS amplicon sequencing. Soybean inoculations were performed by wound in the phenological state of V3. The evaluations were carried out according to the Incidence (IE) and Internode Severity (SE) parameters. Corn inoculations were performed with a syringe in the Vt and R1 state. IE% and SE% were evaluated every 10 days after inoculation until the end of the cultivation cycle. In both crops (soybeans and corn), a 5-degree Scale could be determined to quantify anthracnose severity in internodes. Both soybean and corn cultivars showed differences in their resistance and

susceptibility response, expressed in average IE and SE against the pathogen, and significant specific interactions were also detected. Isolates of *C. truncatum* and *C. gloeosporioides* from soybean and mandarin crops were the most virulent in maize inoculations. While in soybeans, the strains of *C. graminicola* and *C. gloeosporioides* and *C. truncatum* were virulent according to the severity of anthracnose in the internodes. Infections occurred more severely in the second internode advanced towards the apex and towards the base. To fulfill the third objective, a trial was carried out in plots under hail cover, simulating natural conditions, where the 3 soybean genotypes were planted on corn stubble independently infected with 5 G / C strains from corn and soybean hosts. The results showed that soybean genotypes were infected and expressed anthracnose symptoms caused by isolates from different hosts and agro-ecological zones, registering significant differences in all interactions. In this corn-soybean rotation system (both G/C hosts), anthracnose-infected corn stubble was effective as a source of primary inoculum for *C. graminicola*, *C. truncatum* and *C. gloeosporioides* and to start a pathogenic process in the soybean genotypes. Demonstrating an epidemiological risk for a production system based on the alternation of cereals and oilseeds, implemented and widespread among producers in the central region. Therefore, the determination of soybean and corn genotypes with differential responses (R, MR / MS and S) against different strains of the pathogen, will allow their incorporation in future breeding programs.

Keywords: anthracnose; soybean, corn, *Collectotrichum sp*; Plant Pathogen Interactions; Epidemiology.

ORGANIGRAMA DE TRABAJO

El contenido de este trabajo de tesis y los objetivos fueron organizados y presentados en Capítulos, los cuales fueron distribuidos y organizados de acuerdo a su relación temática y experimental:

Introducción General

Planteo del Problema

Hipótesis

Objetivo General

Objetivos Específicos

Capítulo 1:

*Validar morfológica y molecularmente las identidades de una colección de aislados del complejo *Glomerella/Colletotrichum* obtenidos en plantas sintomáticas de diferentes familias y especies de hospedantes y diversos ambientes de la zona de producción agraria.*

Capítulo 2

Caracterizar el comportamiento (avirulencia/virulencia) de los diversos aislados del complejo fúngico y la reacción (resistencia/susceptibilidad) de los hospedantes en base a la observación fenotípica externa, e identificar fuentes de resistencia a la enfermedad en los cultivos evaluados.

Sección I: Soja

Sección II: Maíz

Capítulo 3:

*Evaluar el complejo *Glomerella/ Colletotrichum* y sus interacciones bajo condiciones semi naturales en una rotación soja – maíz (ambos hospedantes de Antracnosis).*

Conclusiones finales

Bibliografía

Anexo

INTRODUCCIÓN

Introducción General

La agricultura argentina está fuertemente identificada con cuatro cultivos de granos: trigo, maíz, girasol y soja. Ello se debe tanto a la superficie dedicada a su producción como a los ingresos que generan sus exportaciones (Satorre et al., 2005). Las condiciones agroecológicas de la Argentina para tales cultivos están entre las más productivas del mundo y convirtieron al país en uno de los pocos capaces de alimentar habitantes de regiones menos favorecidas, pues si bien no se encuentra entre los principales productores mundiales de dichos cultivos, con capacidad de exportación, participa de manera importante en el comercio internacional de granos (Satorre et al., 2005).

Entre los años 60 y 70 y en el marco de la denominada revolución verde, la producción agropecuaria local incorporó, aunque tardía e imperfectamente, la mecanización, el uso de fertilizantes/biocidas y las semillas híbridas. Más tarde, la introducción masiva del cultivo de la soja y el comienzo de la siembra directa en reemplazo de la convencional sentaron las bases para la adopción de futuras tecnologías. En los años 90 se introdujeron las primeras semillas transgénicas. La posibilidad de disponer de genes y adelantos biotecnológicos, por un lado, y de variedades de semillas altamente compatibles con las condiciones de climas y suelos locales, por el otro, facilitaron el “armado” de un nuevo paquete técnico. Concomitantemente se sumaron dos elementos: la disponibilidad local de maquinaria y tecnologías de proceso para la siembra directa y la abundante oferta de biocidas y fertilizantes (Bisang et al., 2008).

La agricultura ha avanzado en la última década hacia esquemas productivos más complejos, que necesariamente requieren manejar mayor cantidad de especies. La moderna tecnología agropecuaria se caracteriza por una mayor participación de la ciencia, y por la incorporación de tecnologías de información a las más conocidas de insumos y procesos que dominaron el agro pampeano desde los años 60 (Satorre et al., 2005).

La soja (*Glycine max* L) es actualmente la semilla oleaginosa de mayor importancia en el mundo y su cultivo es la actividad más relevante del sector agropecuario argentino. En nuestro país los primeros lotes fueron sembrados en la década del 60 en el sur de Santa Fe. A partir de los años 70 protagonizó una fuerte expansión, que continúa en la actualidad y que modificó profundamente la estructura de la producción agropecuaria y agroindustrial argentina. De ser un cultivo casi irrelevante para la producción agrícola de la Argentina a comienzos de la década de los 70, se convirtió en el cultivo estrella del campo argentino. En el año 2006 representó alrededor del 50% del área sembrada en el país (Aizen et al., 2008).

El cultivo de la soja se ha convertido en la actividad económica de mayor importancia del sector agropecuario y durante la última década su producción creció en forma sostenida. La principal razón de este incremento fue la adopción de la semilla genéticamente modificada. El empleo de esta semilla, resistente al herbicida glifosato, permitió reducir el uso de agroquímicos además de facilitar la siembra directa y así disminuir costos de producción. La soja ha modificado profundamente la estructura de la producción agropecuaria y agroindustrial de nuestro país. La expansión de este cultivo desplazó a otros tradicionales como girasol, maíz o sorgo, e incluso numerosos productores ganaderos o lecheros, abandonaron su actividad para dedicarse al cultivo de soja, alentados por los menores costos de producción y mayores márgenes de ganancia. La semilla transgénica tuvo amplia aceptación entre los productores: casi la totalidad de la superficie sembrada corresponde a soja genéticamente modificada. La semilla no transgénica solo es empleada en la elaboración de productos específicos como bebidas a base de soja o alimentos proteicos, en consonancia con la imagen natural que caracteriza a estos productos. En estos casos la comercialización se realiza a través de la coordinación contractual entre productor y elaborador (Mendez et al., 2009).

Respecto a los cereales, la Familia *Poaceae* incluye al trigo (*Triticum aestivum*), al arroz (*Oryza sativa*) y al maíz (*Zea maíz*) en orden de volumen de producción a nivel mundial de esos tres cultivos: el maíz, es el producto de valor que ha evolucionado positivamente a lo largo de su historia. Con el correr de los años, las industrias vinculadas a la cadena del maíz se han ido desarrollando en forma progresiva, transformando un grano cuyo único destino era la alimentación humana en una materia prima esencial para el desarrollo de múltiples procesos industriales. Es el grano forrajero por excelencia, pero además se distingue por sus múltiples posibilidades de utilización en diversos procesos industriales. Luego de su procesamiento, se obtiene una gama de productos cada vez mayor, convirtiéndolo en el insumo fundamental de industrias chicas, medianas y grandes, que generan riqueza y empleo (SAGyP, 2017).

En la producción argentina de maíz, que a comienzos de la década del 90 totalizaba unos 8 millones de toneladas anuales, no sólo se lograron incrementos en la cantidad de grano producido, sino que además son destacables los avances en materia de calidad. Los motivos del crecimiento son muchos, pero entre los principales podemos mencionar: el aumento de la superficie dedicada a su cultivo; la disponibilidad en el mercado de nuevos híbridos de mayor potencial de rendimiento y mejor resistencia a enfermedades y plagas, aptos para satisfacer la demanda de los diferentes destinos; el incremento en el área fertilizada; la creciente utilización del sistema de siembra directa; la incorporación de la práctica de riego complementario; el

recambio del parque de cosechadoras y a partir del 2000 el uso de semillas transgénica (Maizar, 2006).

Planteo del problema

Considerando la relevancia de la producción vegetal que a nivel mundial provee vestimenta, muebles y, fundamentalmente, alimento-sustrato y vivienda-alojamiento para el hombre, animales y diversos organismos, es oportuno inferir las consecuencias que derivan de las pérdidas registradas anualmente causadas por las adversidades de origen biótico (enfermedades, insectos y malezas). Las reducciones sobre la producción de todos los cultivos oscilan entre el 31 y 42% (media de 36,5%), estimándose que el 14,1% son generadas por patógenos (Agrios, 2005b). El número y la gravedad de las enfermedades infecciosas han aumentado de manera constante, especialmente desde principios de los años noventa, informados por Wrather et al. (2010; 1997) y Hartman et al. (2015; 1999). En este contexto, la producción sustentable de alimentos para la población mundial constituye uno de los principales desafíos actuales y las enfermedades vegetales constituyen un factor de riesgo sostenido. Por ello, es necesario conocer los aspectos bio - epidemiológicos de las principales poblaciones patógenas y especialmente de aquellas con amplia variabilidad genética y especificidad fisiológica y que pueden interactuar con diferentes genotipos de un mismo hospedante y/o diferentes hospedantes de diversas especies vegetales (Pioli et al., 2003 b; Prusky et al., 2000).

Referencia del cultivo de soja y estado sanitario

El cultivo de soja y sus subproductos continúa en escala ascendente, principalmente por la entrada de China a los mercados demandantes de esta oleaginosa y el crecimiento sostenido de la producción e industrialización, que lo convirtieron en un recurso relevante para la economía de Argentina (Rossi et al., 2006). Actualmente, Argentina es el tercer productor mundial de poroto de soja, con el 18% del total del mercado, y es el cuarto país productor de harina de soja del mundo, con una participación del 13% del global, detrás de China, EE. UU y Brasil (Informe BCR 2018). El país se caracteriza por ser un importante productor a nivel mundial de soja y sus derivados (aceite, harina y biocombustibles). Representa aproximadamente el 55% de la superficie sembrada, la producción de soja ocupa un poco más de 20 millones de hectáreas. Además, en cuanto a la distribución de la producción por provincia, Buenos Aires ocupa el primer lugar, seguida por Córdoba y Santa Fe (Saharrea et al., 2017).

El área de siembra se incrementó a través de los diferentes ciclos agrícolas, siendo de 5,9 millones (M) de hectáreas (ha) en el ciclo 1995/96; 12,7 M ha en 2003/04; 16,1 M ha en 2006/07

hasta alcanzar los 20 Mha sembradas en 2016/17. El 82,7 % es producido en la subregión pampeana norte que comprende las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y Entre Ríos (entre 30 y 36° Lat. sur) mientras que el resto lo comparten 11 provincias (Informe Anual SAGyP, 2017).

La producción se incrementó desde 12,7 Millones de toneladas (Mt) en 1995/96; a 35,5 Mt en 2003/04; 48 Mt en 2009/10; y osciló entre 50 y 60 Mt en 2014-2017. Se exporta el 78% de este volumen producido, que representa aproximadamente el 25% de las divisas que genera la Argentina (Calzada y Corina, 2017).

El 17 % de la producción total del país corresponde a la provincia de Santa Fe (Informe Anual SAGyP, 2017) que además concentra una moderna infraestructura para la industria aceitera con una terminal que se extiende a lo largo del río Paraná dividido en tres muelles en torno a la ciudad de Rosario (33° Lat. Sur) a partir de los cuales, el grano y/o sus subproductos son exportados a diferentes destinos (Rossi et al., 2006). El 75 % del volumen producido a nivel nacional es transportado a este polo agro-industrial, que se ha constituido en una de las zonas portuarias exportadoras de soja más importante del Mercosur y el mundo (Pontón et al., 2006; ENAPRO, 2017).

Se estima que el volumen de actividad económica involucrado en torno a la producción de soja equivale a un 5,5% del producto bruto interno argentino, ligado a la utilización de insumos tales como agroquímicos y fertilizantes; pero también relacionado a la aplicación de biotecnología para el desarrollo de semillas y al perfeccionamiento en las maquinarias (Calzada y Corina, 2017; Ploper et al., 2011).

La soja se produce en Argentina desde los años 60 y tanto el sistema productivo como el panorama fitosanitario se fue modificando. Si bien inicialmente la soja era considerada un cultivo sano, las enfermedades causadas por la acción de hongos, bacterias y virus fitopatógenos han emergido durante las últimas tres décadas (Cabrera et al., 2004); siendo aproximadamente 40 las patologías reportadas como responsables de pérdidas de calidad y rendimientos (Ploper et al., 2004; 2015; Wrather et al., 2010).

Como antecedente, en 1980 sólo en el cultivo de soja y en EE. UU, se registraron pérdidas por enfermedades estimadas en 7 Mt. Entre las patologías consideradas más severas por causar la mayor mortandad de plantas por ciclo de cultivo, se encuentran las provocadas por *Macrophomina* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum* spp y *Phomopsis* spp. Todas ellas, además, son de importancia económica en otros países productores (Sinclair y

Backman, 1989; Pioli, et al., 2000; Distefano et al., 2013). A nivel mundial las pérdidas de rendimiento causadas por las enfermedades en el cultivo de soja oscilan entre un 10 y un 15%. Para la Argentina, dichas pérdidas fueron aproximadamente del 8 al 10% de la producción (2, 8 a 3, 5 Mt) (Ivancovich et al., 2013).

El panorama fitosanitario actual de Argentina es diferente al de hace más de 20 años. Se están produciendo elevadas pérdidas de calidad y rendimiento, por la acción de hongos, bacterias y virus fitopatógenos. El uso de semillas procedentes de provincias como Salta, Tucumán y Córdoba, promovió la aparición de patologías no mencionadas en el área como las “manchas foliares” producidas por *Alternaria spp.*, *Phyllosticta sojicola* y *Corynespora cassiicola* además de mildiu (*Peronospora manshurica*). En toda la región núcleo se consideran endémicas por su aparición anual las siguientes enfermedades: mancha marrón o mancha parda de la hoja producida por *Septoria glycines*, el tizón de hoja y vaina (*Cercospora kikuchii*) son enfermedades foliares tardías, que coexisten en las regiones productoras de soja en Argentina, reduciendo el potencial del rendimiento de grano y calidad sanitaria en semillas; este complejo: mancha marrón (*Septoria glycines*) y tizón de hoja y vaina (*Cercospora kikuchii*) se consideran las más importantes en cuanto a su prevalencia, incidencia y severidad en relevamientos realizados por Carmona (2010) en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe desde 2003 a 2008, la mancha marrón estuvo presente en el 100% de los lotes involucrados con un rango de severidad foliar de 17 a 46%, mientras que el tizón morado se presentó sólo en el 53% de los mismos con valores de severidad que alcanzaron al 3% (Carmona et al., 2010). Además de este complejo se suma el tizón de tallo y vaina (*Diaporthe phaseolorum var. sojiae*), con la aparición de MOR, causada por *Cercospora sojina*, que emergió como una de las enfermedades más importantes de la historia de la soja argentina y también algunos integrantes del complejo *Diaporthe/Phomopsis* en el sur de la provincia de Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos (Cabrera et al., 2004; Giorda y Valone, 1997; Pioli y Morandi, 2005; Benavidez et al., 2010) siendo ocasional el ataque de antracnosis del tallo y vainas (*Colletotrichum truncatum*) (Carmona et al., 2011a; 2015).

De esta manera, las enfermedades llamadas de fin de ciclo (EFC), la mancha ojo de rana (MOR) y las pudriciones de raíz y tallo se han convertido en las más importantes, relacionadas principalmente con el sistema de producción bajo siembra directa y monocultivo. (Carmona et al., 2015). Existen por otra parte, enfermedades causadas por mancha anillada (*Corynespora cassiicola*); tizón de la hoja de *Cercospora* (*Cercospora kikuchii*) y la roya asiática de la soja (*Phakopsora pachyrhizi*) y la aparición en varios ciclos del oidio (*Microsphaera*

diffusa) lo cual se ha convertido en pocos años en un factor de preocupación para los productores de soja (Plopper et al., 2015; Reznikov et al., 2019).

La introducción de éstos y otros patógenos en lotes de soja libres de enfermedades se debió a factores exógenos de diversa naturaleza, tanto climáticos (viento y precipitaciones), como humanos (traslado, diseminación y siembra de semillas infectadas e intercambio de germoplasma) siendo ambas fuente de inóculo primario (Pioli et al., 1997, 2000). Posteriormente, la población de patógenos se perpetuó e incrementó la cantidad de inóculo potencial por asociación parasítica progresiva con sus hospedantes alternativos y rebrotes del cultivo (en el caso de biotrófos), o asociados a los restos de cosecha en aquellos capaces de cumplir una etapa de supervivencia saprofitica (hemibiotrófos o necrotrofos) (Pioli et al., 2003; Agrios, 2005).

Como resultado de este proceso, en Argentina las pérdidas en el rendimiento causadas por enfermedades fueron creciendo en el tiempo (Distéfano y Gadban, 2007; Plopper et al., 2004; Wrather et al., 2001), llegando a tener mermas en el ciclo 2015/2016 de alrededor de 2190 kilos (kg) por hectárea, viéndose acentuado por factores climáticos particulares, como el fenómeno “Niño”, el cual centró su actividad de intensas lluvias en el centro de la Región Pampeana durante el período reproductivo de los cultivos estivales más importantes. El centro y sur de Santa Fe y el centro de Córdoba recibieron y acumularon 300 mm promedio mensual, encabezando las marcas máximas de precipitaciones de los últimos 50 años. De esta manera, se promovieron condiciones conductivas y favorables para la presencia de enfermedades y crecimiento exponencial de patógenos en el cultivo de soja y otros cultivos (Informe semanal BCR, 2016).

Referencia del complejo fúngico G/C causal de Antracnosis en soja y maíz.

Fundamentación del proyecto y estado actual del conocimiento

El complejo fúngico *Glomerella-Colletotrichum* (G/C) produce la enfermedad conocida como antracnosis en diversas especies vegetales de las familias *Fabaceae*, *Poaceae*, *Solanaceae* y *Rosaceae* entre otras; dando muestra de su amplia variabilidad genética y poca especificidad fisiológica al interactuar con diferentes genotipos de un mismo hospedante y/o diferentes hospedantes (Von Arx et al., 1970; Manandhar y Hartman, 1999; Prusky et al., 2000).

Este hongo fue determinado como Ascomycota en su fase sexual, perfecta o teleomorfo (*Glomerella*) y como un Deuteromycota en su fase asexual, imperfecta o anamorfo (*Colletotrichum*), por ello son reconocidos con un binomio genérico (G/C) constituido por un teleomorfo y un anamorfo, respectivamente (Von Arx, 1970; Manandhar y Hartman, 1999), que incluye diversas especies (Alexopoulos et al., 1996; Weir et al., 2012).

Es un patógeno hemibiotrófo con dos fases distintivas, una parasítica asociada a los tejidos activos de la planta y otra saprofítica con posterior supervivencia sobre los tejidos vegetales necrosados o muertos (Agrios, 2005). La observación del desarrollo de la enfermedad presenta dos niveles en la expresión fenotípica de la patogénesis en la planta: a) externa o macroscópica sobre los órganos vegetales, y b) interna o microscópica (histológico) a nivel de los tejidos internos (O'Connell y Bailey, 1991; Pioli et al., 2004). El ciclo del patógeno comienza con una etapa inicial biotrófica y asintomática durante el período de incubación seguida por una fase destructiva o necrotrófica que da como resultado síntomas (reacción del vegetal) y formación de estructuras del patógeno fúngico (signos). Este tipo de infección fue descrita como hemibiotrofia intracelular en G/C (Li Forseille et al., 2007) y otros complejos fúngicos (Pioli et al., 2004, 2005). O'Connell et al., (2012) aportaron a esta capacidad hemibiotrófica de *Colletotrichum spp* sugiriendo la capacidad de este patógeno para la colonización intracelular, donde las hifas biotróficas entregan efectores de proteínas y metabolitos a la célula vegetal, y la presencia de inductores y enzimas antes y durante la etapa biotrófica, mientras que hidrolasas y transportadores regulan el cambio a la etapa necrotrófica.

Antracnosis en soja: La primera aparición de antracnosis se informó en 1917 en China y, desde entonces, ha sido reportado en las regiones templadas de producción de soja (Tiffany et al., 1951). La enfermedad es principalmente asociada con la especie fúngica *Colletotrichum truncatum* (Hyde et al., 2009), que también puede infectar otros cultivos como lentejas, guisantes, garbanzos y frijoles (Weidemann et al., 1988). Este patógeno fue primero descrito por Andrus y Moore (1935) y luego fue clasificado en el género *Glomerella* en su estado sexual o teleomorfo; y sus sinónimos anamorfos: *Vermicularia* (considerado obsoleto) y el actualmente utilizado: *Colletotrichum* (Index Fungorum 2015). En Brasil, la antracnosis se detectó por primera vez en 1961 en Rio Grande do Sul (EMBRAPA 2008; Rogério, 2016). En su interacción con la soja, G/C produce pequeños canchales en cotiledones y pecíolos, enrollamiento de láminas foliares y defoliación prematura, y atizamiento de tallos y vainas. El hongo afecta también el número y la calidad de semillas (frecuentemente asintomáticas), reduce el rendimiento y el stand de plántulas en pre y pos emergencia (Manandhar et al., 1995; Manandhar y Hartman, 1999). Las especies que también se han reportado como agentes causales de enfermedades en la soja en otros países fueron: *C. coccodes* (Riccioni et al., 1998), *C. gloeosporioides* (Chen et al., 2006; Mahmodi et al., 2013), *C. destructivum* (Ramos et al. 2013), *C. chlorophyti* (Hang et al., 2013) y la más reciente *C. incanum* (Yang et al., 2014) (Rogério et al., 2016).

Yang et al., (2014) estableció a *Colletotrichum incanum* y *C. truncatum*, como el agente

causal más comúnmente reportado de la antracnosis de la soja. Tienen conidios curvos y apresorios de forma irregular. *C. incanum*, que fue capaz de causar síntomas de antracnosis en la soja, se describió completamente en base a una combinación de características morfológicas y análisis de secuencias multigénicas. El patógeno se encontró en Illinois (EEUU) a una frecuencia más alta que *C. truncatum*. En Brasil hasta 2007 la identificación de *C. truncatum* en los aislados muestreados evidenció que es el único agente causal de antracnosis de soja, con relevancia genética y variabilidad morfológica y patogénica, así como un amplio origen geográfico (Rogério et al., 2016). Sin embargo, Barbieri et al., (2017) publicó un primer informe de *C. cliviae* asociado con la antracnosis de la soja en Brasil.

Los aislados de *C. truncatum* y *C. destructivum* muestran variabilidad morfológica en sus colonias, en el tamaño de cuerpos fructíferos y en su patogenicidad (Manandhar et al., 1995; Manandhar y Hartman, 1999). Por ello, la identificación de *Colletotrichum* requiere estudios basados en las características morfológicas, culturales, especificidad con el hospedante (Du et al., 2005) y técnicas moleculares como herramienta complementaria para diferenciar tanto aislados de una misma especie como especies aisladas de uno o más hospedantes (Alameda et al., 2005).

Ramos y sus colaboradores (2013) informaron sobre la presencia y caracterización molecular de especies de *Colletotrichum* de soja en Argentina a partir de zonas con síntomas típicos de antracnosis obteniendo veintiséis aislados que fueron identificados como *C. truncatum* (73%) y *C. destructivum* (26%). La caracterización genética fue realizada por método de AFLP y los resultados mostraron una gran variabilidad intra-específica.

Las especies *C. truncatum*, *C. destructivum*, *C. coccodes* y *C. gloeosporioides* producen apresorios que se ponen en contacto con los tejidos superficiales de la planta y permiten la penetración directa a través de la cutícula y pared celular vegetal. Este evento biológico constituye una ventaja adaptativa que les permite ampliar el rango de hospedantes (Prusky et al., 2000). Durante los primeros estadios del cultivo, las hifas de infección quedan circunscriptas al punto de inoculación, mientras que en los estadios reproductivos la enfermedad se hace sistémica (Manandhar et al., 1986; Van Dyke and Mims, 1991; Riccioni et al., 1998). Las etapas de desarrollo parasíticas de las especies de *Colletotrichum* pueden separarse en: 1) deposición en la superficie del hospedante, 2) fijación de la conidia en la superficie, 3) germinación de la conidia, 4) producción del apresorio, 5) penetración de la epidermis de la planta, 6) crecimiento de la colonización del tejido del hospedante y 7) producción de acérvulas y esporulación (Rodríguez López et al., 2009). El hongo produce un apresorio melanizado con dimensiones variables de 6

a 20 x 4 a 12 μm , a partir del cual se produce una púa de infección que penetra y atraviesa la cutícula mediante enzimas que degradan la pared celular, permaneciendo el patógeno en forma latente hasta los últimos estadios reproductivos (Beno et al., 2000; Prusky et al, 2000).

Actualmente, la prevalencia de antracnosis se ha incrementado, en base a informes recurrentes de epidemias y pérdidas de rendimiento severas. El conocimiento sobre la variabilidad morfológica, cultural y molecular de *C. truncatum* en América del Sur es crucial para el manejo de la enfermedad. Dias et al., (2019) mostró tres tipos de conidiogénesis de *C. truncatum*, a) los conidios producidos en células conidiógenas fialídicas en los extremos de las hifas; b) conidios producidos en células conidiógenas de acérvulas y c) los conidios se producían en setas fértiles, diferenciadas en el extremo distal, formando células conidiógenas (un mecanismo previamente no reportado para *C. truncatum*).

Relaciones epidemiológicas entre asociaciones del complejo C / G con otros hospedantes semi extensivos y maíz

El área centro sur de Santa Fe se destaca no sólo por sustentar una producción relevante de soja y cereales (maíz, trigo y sorgo) a nivel provincial (Informe de la BCR 2017/18) sino además otros desarrollos agrícolas alternativos de tipo semi extensivos como la lenteja (*Lens culinaris* L), mixtos con siembra de especies anuales y perennes como alfalfa (*Medicago sativa* L) e intensivos hortícolas de pimiento, tomate y frutilla (*Capsicum annuum* L., *Lycopersicon sculentum* L., *Fragaria x ananasa* Duch, respectivamente). Muchos de estos cultivos son hospedantes del complejo G/C y sufren patologías originadas por algunas de sus especies, entre ellas, algunas también patógenas de soja (Pioli et al., 2003b; Agueci et al., 2005, Prusky et al., 2000).

La antracnosis de la lenteja es causada por *C. truncatum* (Buchwaldt et al., 2004) y en evaluaciones sobre la reacción de cultivares frente al patógeno se reportan respuestas de susceptibilidad y de resistencia parcial a *C. truncatum*, expresada como una reducción en el tamaño de las lesiones, esporulación y tasas de desarrollo de la enfermedad (Chongo et al., 1999). *C. truncatum* incluye diversidad de aislados con diferente patogenicidad al interactuar con otras fabáceas tales como alfalfa (*Medicago sativa*), caupí (*Vicia faba* L.) y arveja (*Pisum sativum* L.) (Anderson et al, 2000; Gibson et al., 1994).

En relación a alfalfa, las enfermedades foliares más relevantes y severas son causadas por *Colletotrichum*, *Pseudopeziza*, *Phoma*, *Leptosphaerulina*, *Stemphylium*, y *Stagonospora*. Particularmente la antracnosis en alfalfa es causada por *C. trifolii*, que puede ser controlada

mediante estrategias culturales y genéticas; ya que en algunas evaluaciones de germoplasma se identificaron genotipos resistentes a diferentes razas del patógeno (O'Neil y Saunders, 1994; O'Neil et al., 1996). O'Neil et al., (1997) ha estudiado la diversidad genética de otras especies de *Colletotrichum* tales como *C. destructivum* y *C. dematium* también consideradas patógenas de alfalfa.

En el caso de frutilla, la antracnosis es originada por un complejo de especies de *Colletotrichum* que incluye a *C. fragariae* y *C. acutatum* como también a *C. dematium* (sin. *C. truncatum*) y *C. gloeosporioides* (Howard et al., 1992; Maas et al., 1998). Estas dos últimas especies, además, son agentes causales de antracnosis en pimiento (Manandhar et al., 1995), en soja (Hartman et al., 1999) y lesiones foliares en algunas malezas concomitantes de soja (Pioli et al., 2003a).

Asimismo, la antracnosis en cítricos es causada por dos especies de *Colletotrichum* spp: *C. acutatum* que produce lesiones en el follaje y flores provocando defoliación y caída de frutos como en la lima *Citrus × aurantifolia*) y *C. gloeosporioides* que produce la muerte regresiva, mancha foliar y pudrición poscosecha de frutos. Las lesiones sintomáticas son similares a canchales típicos (o tejido necrótico deprimido) cubiertos de acérvulas y masas de conidios de color anaranjado (signos del patógeno) (Prusky et al., 2000). Las pérdidas económicas más importantes se producen durante la etapa de fructificación (Freeman et al., 1998). *C. gloeosporioides* es predominantemente un patógeno pos-cosecha en los frutos cítricos y puede sobrevivir en el campo como un saprófito común en fruta y otros tejidos de la planta. Como ocurre con otras especies de *Colletotrichum* y otros patógenos fúngicos, *C. gloeosporioides* reduce su actividad en la estación seca y se activa cuando las condiciones ambientales le son favorables para su desarrollo, cumpliendo un modo de infección hemibiotrófico en el que ambas fases: parasítica o biotrófica (asociada a los tejidos activos de la planta) y necrotrófica, se producen secuencialmente (Meenakshi y Saurabh, 2015).

La antracnosis también se detectó en *Oxalis corniculata* en Santa María, Brasil, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, actuando como reservorio de inóculo y provocando diversas enfermedades, principalmente antracnosis foliar en una amplia gama de hospedantes. En Brasil, se informó que *C. gloeosporioides* fue la causa de la mancha foliar de *Capsicum* spp., *Carica papaya*, *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cucumis melo*, *Cucurbita pepo*, *Fragaria × ananassa*, *Glycine max*, *Gossypium* spp., *Malus domestica*, *Mangifera indica*, *Manihot esculenta*, *Olea europaea*, *Prunus persica*, *Solanum lycopersicum* y *Vitis* spp (Bellé et al., 2019).

En relación al cultivo de maíz, éste posee excelente palatabilidad y alto contenido nutricional, aspecto que lo favorece en relación a otros cereales, siendo un importante insumo para la alimentación humana y animal. Este cultivo brinda además materia prima para numerosos usos industriales como la producción de almidón, alcohol, jarabes, aceites, biocombustibles y plásticos (Watson et al., 1988; Wayne Smith et al., 2004).

La producción mundial de maíz estimada para el ciclo 2017/18 alcanzaría 1031,86 Mt (USDA, 2017), sin embargo, se necesitarían 368 Mt más de maíz y de trigo que la producción actual, para satisfacer en el año 2020 los requerimientos alimenticios de los países en desarrollo. EE. UU, China, Brasil, Unión Europea y Argentina son los principales países productores y existe una demanda internacional sostenida de los productos obtenidos de la transformación del maíz como carne vacuna, porcina, lácteos, pollos, huevos; productos de la molienda húmeda como los biocombustibles y de la molienda seca como el almidón. En la producción mundial en el ciclo 2018/19, Argentina esta en 5° lugar, según datos del 2019 proporcionados por USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos) (Maizar, 2019).

En Argentina, el cultivo de maíz se ha posicionado en un lugar de excelencia en su producción donde *el paquete biotecnológico y desarrollo genético le brindaron al productor las herramientas necesarias para mantener e incrementar la productividad del cultivo aun durante las últimas décadas* (SAGPyA, 2003) y donde tanto el maíz como el trigo tendrán producciones en el ciclo 2018/ 19 récord, de 57 y de 19,5 Mt, respectivamente. Esto refleja “la paridad entre gramíneas y soja, fundamental para la sostenibilidad del sistema productivo y el cuidado de nuestros suelos” (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2019).

En el ciclo agrícola 2018/19, la producción de maíz fue de 51,5 Mt obtenidas en una superficie de 7,1 Mha con un rendimiento promedio de 86,2 qq/ha. Las principales provincias productoras son Córdoba, Buenos Aires, Santa Fe, La Pampa y Entre Ríos con rendimientos variables (SAGyP, 2019).

Sin embargo, todas estas cualidades están en riesgo o pueden ser modificadas por enfermedades, tales como antracnosis, ya que el maíz es hospedante del complejo G/C. En las zonas maiceras de EE. UU y del mundo, los patógenos de origen fúngico causan enfermedades en los cariopsis y en espiga (Mc Gee et al., 1988; Shurtleff et al., 1992) y pueden provocar pérdidas cuali y cuantitativas estimadas en 9,4% anual (White et al., 1999). Entre ellos, se identificaron *Colletotrichum graminicola* y *C. cereale*, que luego fueron considerados sinónimos

y reconocidos como *C. graminicola* (Wilson et al., 1914) debido a la morfología similar y un rango común de gramíneas hospedantes.

En Argentina, en la provincia de Santa Fe durante el ciclo agrícola 2010/11, *C. graminicola* causó una enfermedad foliar en los primeros estadios y podredumbres de tallo y raíz en plantas adultas (Sillón et al., 2011). Esta enfermedad considerada de fin de ciclo produjo junto a los tizones (*Exserohilum turcicum* – sinonimia: *Helminthosporium turcicum* y *Bipolaris maydis* – sinonimia: *Helminthosporium maydis*), mayor nivel de severidad/intensidad y relevancia epidemiológica en los cultivos de segunda fecha de siembra, marcando una diferencia importante respecto de los cultivos sembrados en octubre y noviembre, donde la enfermedad de mayor severidad fue la roya común (*Puccinia sorghi*) (Sillon et al., 2008, 2014; Sinavimo2017).

En el ciclo agrícola (2011-2012), Dias et al., (2012) monitorearon la prevalencia, severidad y distribución de las enfermedades de maíz en 59 lotes ubicados en las principales zonas productoras del país, desde el sur de Buenos Aires al norte de Salta. La antracnosis en maíz obtuvo valores de 5% de prevalencia. Se evaluó además la extensión de la siembra de maíz posibilitando dos períodos de siembra: tempranas y tardías. A partir de estas evaluaciones Dias et al. (2012) definieron a la antracnosis foliar como una enfermedad emergente en el maíz (Giménez Pecci et al., 2017).

Durante los últimos ciclos agrícolas, las pudriciones en tallo y raíz han aparecido con una alta frecuencia e intensidad, produciendo la muerte prematura o quiebre del tallo y su posterior vuelco. Entre los agentes causales se encuentra un complejo de hongos: *Fusarium graminearum* (forma asexual) *Giberella zeae* (forma sexual); *Fusarium verticillioides* (Syn *F. moniliforme*); *Stenocarpella spp.* (*Diplodia spp.*); *Macrophomina phaseolina* y *Colletotrichum graminicola*, estas podredumbres sobreviven en restos culturales y suelo, favoreciendo la proliferación de la enfermedad (Carmona et al, 2006).

Gatica et al. (2014) analizó y diferenció genéticamente 35 aislados de *C. graminicola* provenientes de nueve localidades de la región pampeana y logró separar además los aislados de Buenos Aires y de Santa Fe por el patrón de los marcadores ISSR, mostrando claras diferencias genéticas.

C. graminicola produce tres patologías durante su etapa parasitaria en maíz: a) tizón de plántulas, b) antracnosis o atizonamiento foliar con infecciones secundarias en hojas y tallos, y c) la podredumbre del tallo o caña en plantas adultas, por colonización sistémica y producción conidial en el xilema, que deriva en dos expresiones sintomáticas: a) “stalk rot” - podredumbre

basal y senescencia temprana de la caña, combinada ocasionalmente con b) “top dieback” –que es el marchitamiento de las hojas y entrenudos superiores durante la antesis (Bergstrom y Nicholson, 1999; Venard y Vaillancourt, 2007 b). La resistencia al atizonamiento foliar y a la podredumbre del tallo puede ser controlada por pocos genes de efecto mayor y/o varios genes de efecto menor, no obstante, ambos mecanismos parecen funcionar independientemente (Carson et al., 1980; 1981; Badu-Apraku et al., 1987). Los genes que confieren resistencia a la antracnosis foliar no necesariamente confieren resistencia a la podredumbre del tallo y viceversa (Bergstrom et al., 1999). En la actualidad la antracnosis del maíz está bien controlada en los EE. UU mediante el uso de cultivares resistentes, pero aún puede ser problemática en los países en desarrollo. Bergstrom y Nicholson (1999) sugirieron posibles razones para infecciones repentinas en América del Norte, entre ellas, mostraron cambios en el medio ambiente (es decir, prácticas de cultivo), cambios en los genotipos del hospedante o la aparición de cepas o razas de hongos más virulentas; y la combinación de ellas.

El hongo *C. graminicola* puede infectar el maíz durante varias fases del crecimiento de la planta, dando como resultado el tizón de las plántulas, el tizón de las hojas o la pudrición del tallo (Bergstrom y Nicholson, 1999). El tizón de las plántulas puede ocurrir tan rápidamente en los cultivares susceptibles que puede producir la muerte, pero la mayoría de las plantas pueden desarrollarse más rápido que el hongo y simplemente desarrollar lesiones ovales concéntricas en el tejido de la hoja infectada. El tejido de las plantas más viejas tiene menos probabilidades de escapar del daño. La infección de hojas por *C. graminicola* conduce a la formación de lesiones cloróticas en 1-2 días (Venard y Vaillancourt, 2007 b; Crouch y Beirn, .2009).

Durante años *C. graminicola* fue considerado el responsable de la antracnosis de los cereales en maíz y sorgo (Sutton et al., 1968; Holliday et al., 1980; Wharton et al., 2001). Sin embargo, los análisis de las secuencias de rDNA y análisis genéticos de DNA, junto a estudios de apareamientos y morfología del apresorio han demostrado que los aislados de maíz y sorgo pertenecen a especies distintas (Sherriff et al., 1995; Vaillancourt y Hanau, 1992). Los aislados obtenidos de maíz se incluyeron en *C. graminicola* y los de sorgo en *C. sublineolum* (Sutton et al., 1980; Bergstrom & Nicholson, 1999). No obstante, otros autores consideran que *C. graminicola* (Ces.) Wils y *C. sublineolum* (Syn. *C. sublineolum* Henn in Kab. & Bubák) son sinónimos o el mismo patógeno (Casela et al., 2001). Sin embargo, Venard y Vaillancourt (2007 a) consideran que *C. sublineolum*, está estrechamente relacionado con *C. graminicola*, causando podredumbre del tallo y tizón foliar en sorgo, pero esta especie no parece infectar al maíz en el campo. Este fenómeno fue investigado más a fondo comparando la capacidad de esta cepa de *C.*

sublineolum versus *C. graminicola* para infectar hojas de maíz sin herir (ya sea plántulas o maduras) y raíces de plántulas. *C. graminicola* infectó y colonizó eficientemente todos estos tejidos, pero *C. sublineolum* no colonizó con éxito ninguno de ellos. Esto sugiere la interesante posibilidad de que la resistencia del maíz a *C. sublineolum* es condicional a) a su edad o estado de desarrollo y b) al tejido específico (Venard y Vaillancourt, 2007a).

La diversidad de interacciones entre las especies hospedantes mencionadas y el complejo G/C constituyen un desafío fisiológico-genético para los mecanismos de defensa de los cultivos en estudio y un riesgo epidemiológico, considerando que: a) la fuente de inóculo primario de G/C son los residuos de cosecha infectados y b) los cultivos hospedantes del complejo G/C comparten las áreas productivas en el esquema de rotación o secuencia de cultivos anuales (Buchwaldt et al., 1996, Bergstron y Nicholson, 1999). Actualmente las alternativas de control para *Colletotrichum* spp. son variadas debido a que la estrategia más común, los fungicidas, han causado resistencia en los organismos patógenos, los fungicidas en precosecha o poscosecha constituyen la principal forma de reducir las pérdidas por esta enfermedad. Sin embargo, su uso indiscriminado ha tenido como consecuencia la resistencia de los microorganismos patógenos (Valenzuela et al., 2016).

En particular, el proceso de infección hemibiotrófica empleado por *Colletotrichum* spp y los factores que controlan la transición de la colonización biotrófica a la patogénesis necrotrofica, es actualmente un área de investigación intensiva en el género.

Actualmente no se sabe qué elementos genéticos son responsables del cambio de la hemibiotrofia a la necrotrofia, pero se tiene la hipótesis de que la producción de enzimas pectonolíticas, como se ve en *C. lindemuthianum* y *C. gloeosporioides*, desempeña un papel en el proceso (Crouch y Beirn, 2009).

Además, el incremento en el avance de la enfermedad se ha relacionado con el aumento de la senescencia de las hojas, lo que indica una relación entre las respuestas de defensa del hospedante y la activación de los genes de patogenicidad, aunque aún no se conocen las señales de esta transición (Münch et al., 2008).

Asimismo, considerando la diversidad de especies de G/C y sus mecanismos de variación genética, principalmente la hibridación y recombinación génica, promueven la aparición de variantes y nuevas razas fisiológicas del patógeno (Agrios 2005; Prusky et al., 2000) y las limitaciones que puede presentar la identificación basada en macro y micromorfología, exige el uso complementario de técnicas moleculares (Li Forseille et al., 2007). En comparación con los

métodos de diagnóstico convencionales basados en el aislamiento y el cultivo de hongos, las técnicas basadas en PCR son más rápidas y precisas y pueden proporcionar tanto información cualitativa como cuantitativa sobre el patógeno (Li Forseille et al., 2007).

El conocimiento biológico y morfológico de G/C, las estrategias desarrolladas por el patógeno durante su ciclo biológico y las reacciones de defensa vegetal en los cultivos hospedantes en estudio (soja y maíz) permitirá seleccionar y aplicar alternativas de control integrado que combinen métodos bio-epidemiológicos y genéticos, más efectivos y sustentables.

HIPÓTESIS

1. Existe variabilidad entre los genotipos de soja y maíz frente a distintos aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de diferentes eco agroambientes de la región pampeana argentina.
2. Las técnicas experimentales desarrolladas durante las inoculaciones artificiales permiten evaluar las interacciones del genotipo, el patógeno y el ambiente y caracterizar las respuestas de resistencia / susceptibilidad del hospedante y avirulencia / virulencia del patógeno para este sistema en Argentina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer *aspectos biológicos fisiológicos* de las estrategias parasitarias y de supervivencia desarrollada por el complejo *Glomerella/Colletotrichum* y la respuesta inducida en soja /maíz y otros hospedantes relacionados a fin de definir estrategias de control integrales, efectivas y sustentables en la zona productora núcleo de Argentina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar morfológica y molecularmente las identidades de una colección de aislados del complejo *Glomerella/Colletotrichum* obtenidos en plantas sintomáticas de diferentes familias y especies de hospedantes y diversos ambientes de la zona de producción núcleo argentina.

2. Caracterizar el comportamiento (avirulencia/virulencia) de los diversos aislados del complejo fúngico y la reacción (resistencia/susceptibilidad) de los hospedantes en base a la observación fenotípica, e identificar fuentes de resistencia a la enfermedad en los cultivos evaluados.

3. Evaluar el complejo *Glomerella/ Colletotrichum* y sus interacciones bajo condiciones semi naturales en una rotación soja – maíz, ambos hospedantes de Antracnosis.

Capítulo 1

Aislamiento, caracterización morfológica y validación molecular de una colección de aislados de *Glomerella* /*Colletotrichum*

Objetivo Específico

Validar morfológica y molecularmente la identidad de una colección de aislados del complejo *Glomerella/Colletotrichum* obtenidos en plantas sintomáticas de diferentes familias de hospedantes y diversos ambientes de la zona de producción núcleo argentina.

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 La enfermedad y su agente causal

La palabra *antracnosis*, derivada del griego anthrax (carbón), significa ennegrecimiento y con este término se denomina al grupo de enfermedades que afectan al follaje (hojas, tallos y frutos) de los cultivos, produciendo manchas oscuras y/o lesiones con el centro deprimido y el borde elevado. Gran parte de los casos reportados de antracnosis citan como agente etiológico al complejo *Glomerella* Stonem – *Colletotrichum* Corda (Agrios, 2005).

El complejo G/C constituye un binomio fúngico cuyo ciclo biológico completo incluye a una fase sexual, perfecta o teleomorfo (G: identificada como División Ascomycota, Clase Pyrenomycete,) y una fase asexual, imperfecta o anamorfo (C: identificada como Deuteromycota, Clase: Coelomycete, Orden: Melanconiales) (Alexopoulos et al., 1996).

Colletotrichum spp presenta amplios antecedentes que involucran su historia taxonómica y biológica. Este género fúngico fue establecido por Corda et al., en 1831 e identificado por su macro y micromorfología. Sus fructificaciones presentan setas y se denominan acérvulos, en ellas se originan los conidios hialinos que forman una masa viscosa (o gútula) de coloración anaranjada o cremosa. Inicialmente, hubo confusión en la identidad de *Colletotrichum* spp. y *Vermicularia*, este último género, mucho más antiguo, había sido revalidado por Fries en 1825, cuya característica principal era la presencia de cuerpos de fructificación semejantes a estroma. En 1884, Saccardo consideró que los cuerpos de fructificación de *Vermicularia* constituían una fase previa del desarrollo del acérvulo de *Colletotrichum* spp (Menezes et al., 2006).

La fase sexual identificada oportunamente como *Glomerella* por Stonem en 1898, fructifica en peritecios globosos o subglobosos, a veces alargados en forma piriforme, presenta un mucrón, que cuando está presente, suele ser muy corto, en raros casos se han encontrado con

varios mucrones alargados (Stonem et al., 1898). Los avances en los estudios permitieron que Shear y Wood (1913) investigaran el género *Glomerella* y *G. cingulata* reportando treinta y cuatro hospedantes diferentes, siendo extremadamente variable en todos los hospedantes estudiados.

Las formas de *Glomerella* muestran tanta variabilidad que es posible obtener en los cultivos variaciones aisladas que pueden no ser comunes en los ascomicetos como grupo o incluso dentro del género *Glomerella*. Sin embargo, el hecho de que en ocasiones dos cepas sexuales puedan estar presentes agrega otro factor a considerar relacionado con el desarrollo de etapas ascógenas (Edgerton et al., 1914). Edgerton et al. (1912, 1914) fue el primero en reconocer y describir las cepas en *G. cingulata*, abriendo así un nuevo enfoque para el estudio de su variabilidad (Struble y Keitt, 1950).

El género *Colletotrichum* spp es compuesto de muchas especies, pero existen limitaciones en las relaciones dentro de algunos de estos complejos de especies, que aún no se han resuelto. Por lo tanto, la investigación sobre secuencias de ADN de genomas fúngicos y otros enfoques moleculares será de gran valor para resolver la filogenia del género, así como en establecer una relación evolutiva del mismo. La variabilidad y la patogenicidad todavía es necesaria para caracterizar genéticamente utilizando análisis de polimorfismo de la región ITS y por otras técnicas moleculares relevantes (Sharma et al., 2011).

Las especies más relevantes citadas como causantes de la antracnosis de soja y maíz en todo el mundo, especialmente en condiciones de clima cálido húmedo, son: *C. truncatum* (Schwein) Andrus y W.D. Morre = *C. dematium* (Pers.) Grove y *Glomerella glycines* (F. Lehm) y F.A. Wolf (anamorfo: *C. destructivum* O'Gara) y *C. graminicola* (Carmona et al., 2006; Dias et al., 2019; Ramos et al., 2013; Sillón, et al., 2008; Vaillancourt et al., 1990). Estos hongos fueron aislados también en otros hospedantes, entre ellos se incluye alfalfa y numerosas malezas como *Oxalis corniculata* (Bellé et al., 2019; Manandhar y Hartman, 1999; Hartman et al., 1999).

1.1.2 Biología y variabilidad de G/C

El complejo G/C es reconocido por ser patógeno y altamente destructivo en un amplio rango de hospedantes (cereales, pastos, legumbres, vegetales, ornamentales y cultivos perennes incluidos árboles frutales) y ambientes (tropicales y subtropicales). Actualmente, la prevalencia de antracnosis está aumentando, con informes recurrentes de epidemias severas y pérdidas de rendimiento expresivas (Dias et al., 2019). Posee gran potencial de infección cruzada, esta última es consecuencia de la capacidad infectiva de varias de sus especies sobre un único hospedante o

por la facultad de una especie para atacar diversos hospedantes (Afanador-Kafuri et al., 2003; Agrios, 2005; Talhinhos et al., 2005). Dada la importancia mundial de *Colletotrichum*, fue incluido entre los diez principales patógenos de plantas por su importancia bio-epidemiológica y económica (Dean et al., 2012). Su variabilidad genética y especificidad fisiológica se manifiesta en la amplia gama de hospedantes, en las interacciones específicas que establecen las diferentes especies sobre un mismo genotipo del hospedante o una misma especie fúngica con diferentes genotipos de un mismo y/o diferentes hospedantes (Manandhar y Hartman, 1999; Menezes et al., 2006). La variabilidad genética de G/C se traduce además en la macromorfología de sus colonias, en la micromorfología de las estructuras asexuales y sexuales y la expresión de síntomas (Incremona et al., 2009a). La microscopía óptica y el análisis de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPDs) son herramientas importantes para el estudio de la variabilidad de los aislados (Dias et al., 2019).

Por lo tanto, la identificación de las especies de G/C asentada sólo con base morfológica se vuelve compleja e incierta debido a la variabilidad en la expresión de los caracteres fúngicos, exigiendo la aplicación conjunta de otros métodos que posibiliten una diferenciación correcta y de mayor certeza (Alameda et al., 2005).

1.1.3 Caracterización morfológica y molecular de *Glomerella* /*Colletotrichum*

Las especies de *Colletotrichum* spp proveen un excelente modelo para el estudio de las interacciones hospedante – patógeno. En los últimos años su estudio ha sido de interés colectivo y desde diferentes perspectivas fenotípicas y moleculares (Munch et al., 2008; Cannon et al., 2000). Hasta el momento han sido liberadas las secuencias del genoma de las especies *C. graminicola*, *C. higginsianum* y *C. orbiculare* (Damm et al., 2009). No obstante, algunos proyectos están siendo ejecutados en dirección al conocimiento de la sistemática, ecología e interacción del género (Damm et al., 2009; Cannon et al., 2000).

a) Caracterización morfológica

El concepto taxonómico "von Arxian" para *Colletotrichum* spp mostró un gran número de especies sinónimos con los nombres de *C. graminicola* (para las especies que habitan en el suelo) y *C. gloeosporioides* (para las especies que no viven en el suelo con conidios rectos). Sin embargo, los estudios de Von Arx y Müller (1954) y Von Arx et al. (1957) no se basaron en el examen directo del material tipo de todas las especies, posteriormente se descubrió que parte de la sinonimia propuesta en estos documentos era incorrecta (Weir et al., 2012). *Colletotrichum*

cereale es una especie de esporas falcadas descrita por primera vez por Selby y Manns (1909), pero fue considerado sinonimia de *C. graminicola* por Wilson solo cinco años después (Hyde et al., 2009).

C. gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc. es uno de los patógenos más comunes y ampliamente distribuido en el mundo (Sutton, 1992; Cannon et al., 2000). Desde su descripción original (como *Vermicularia gloeosporioides* Penz.) se ha asociado con al menos 470 géneros hospedantes diferentes (Sutton, 1980), ya sea como un organismo primario causante de enfermedades o aislado de partes de plantas deterioradas. Es especialmente frecuente en los trópicos, pero también se ha registrado en una amplia gama de hábitats templados y subtropicales. Este patógeno ha sido definido por Sutton (1980) y Baxter et al. (1983) utilizando principalmente las características de los conidios, los cuales se consideraban cilíndricos con extremos redondeados y menores a 4,5 µm de diámetro (Hyde et al., 2009).

En cuanto a *C. truncatum*, Chongo et al. (2002) en su estudio sobre lenteja realizaron una descripción morfológica de los aislados utilizados en su trabajo los mismos eran ligeramente falcados y cónicos en los extremos con tamaño promedio de 15,4 / 16,6 µm × 5,4 µm (rango: 11,4-21,5 × 4,1-5,8). Este rango de tamaño es similar al de *C. truncatum* descrito por Sutton (1992). Sin embargo, en otros experimentos de este autor, los conidios de sus aislados fueron ligeramente más cortos, más anchos y menos falcados que los de *C. truncatum* de soja (Manandhar et al., 1985; Staples y otros, 1976). En estudios presentados por Ford et al. (2004) se describe a los conidios de *C. truncatum* en soja como falcados, puntiagudos en ambos extremos, generalmente más largos y estrechos.

La antracnosis en soja se asocia principalmente con *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus y Moore con conidios falcados (syn. *C. dematium* var. *truncata*), estadio sexual *Glomerella truncata* (Armstrong y Banniza) (Sharma et al., 2011; Armstrong – Cho, 2006; Hyde et al., 2009). Sin embargo, las siguientes especies también se han asociado con la antracnosis de la soja (Hartman, 1999): *C. coccodes* (Wallr.) Hughes, *C. destructivum* O'Gara (teleomorfo = *G. glycines* Lehm. Y Wolf), *C. graminicola* (Ces.) Wils. y *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz y Sacc. (teleomorfo = *G. cingulata* (Stonem). En la década actual, dos especies con conidios falcados: *C. chlorophyti* Chandra y Tandon y *C. incanum* (Yang) Haudenschild y Hartman, también fueron informados como agentes causales de esta enfermedad en los EE. UU (Yang et al., 2012; 2014). Finalmente, *C. cliviae* fue reconocido recientemente como otro miembro del complejo de antracnosis de soja en Brasil (Dias et al., 2019).

b) Caracterización molecular de G/C

El advenimiento y la aplicación de métodos moleculares a gran escala revolucionaron la investigación en el género *Colletotrichum* (Bailey y Jeger, 1992). Los estudios se centraron en variaciones intraespecíficas; Dale et al., (1988) detectaron polimorfismos en el ADN en *C. gloeosporioides*, mientras que Braithwaite y Manners (1989), Masel et al., 1990 y Braithwaite et al., 1990 informaron que las variantes de esta especie tenían un número variable de cromosomas.

Las primeras aplicaciones de datos de secuencias de ácidos nucleicos para distinguir entre especies de *Colletotrichum* fueron publicadas por Mills et al. (1992) y Sreenivasaprasad et al. (1992), quienes identificaron la variación de secuencia en la región ITs 1 de ADN entre seis especies de *Colletotrichum* spp, así como la detección de polimorfismos en la misma región entre cepas de *C. gloeosporioides* obtenidos de diferentes hospedantes.

Existen varias técnicas moleculares que han sido puestas en práctica como una herramienta auxiliar de la taxonomía clásica de hongos. Dentro de ellas pueden citarse: i) técnicas basadas en la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (acrónimo del inglés: “polymerase chain reaction”) que incluyen entre otras los polimorfismos en la amplificación al azar del ADN genómico o RAPDs (acrónimo del inglés: randomly amplified polymorphic DNAs) y ii) las técnicas basadas en la hibridación homóloga de fragmentos de ADN como son la obtención de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (acrónimo del inglés restriction fragment length polymorphism) (Menezes et al., 2006).

La caracterización molecular por RAPDs utilizando oligonucleótidos decámeros permite diagnosticar diferentes niveles taxonómicos, pudiendo discriminar a niveles intraespecíficos (Galli et al., 2007; Bueno Dos Reis Junior et al., 2002). Cordeiro de Almeida (2005) caracterizó la agresividad de aislados de *Colletotrichum* pero estos marcadores RAPDs fueron eficientes también para caracterizar aislados agresivos como *Fusarium graminearum* Schwabe del trigo (*Triticum aestivum* L) y del triticale (híbrido de *Triticum* sp. x *Secale* cereale).

Debido a la plasticidad fenotípica presentada por las especies del género *Colletotrichum* spp. y otros complejos fúngicos, se promueve el uso integrado de métodos morfológicos, moleculares y bioquímicos para abordar estudios taxonómicos en este importante grupo de hongos (Menezes et al., 2006; Pioli et al., 2003; Hernandez et al., 2015; Peruzzo et al., 2019).

El análisis de RAPDs permitió describir la diversidad genética en poblaciones de *C. truncatum* en los principales países productores de soja, como Argentina y Brasil, revelando particularmente la diversidad genética entre los aislados de *C. truncatum* (Dias et al.,

2019). Sharma et al., (2011) describió la importancia de la secuenciación de ADN de genomas fúngicos; ya que son técnicas de gran valor durante el proceso de identificación de especies como complemento de la caracterización morfológica (Sreenivasaprasad et al., 1996; Farr et al., 2006; Cannon et al., 2008; Cai et al., 2009; Hyde et al., 2009).

El objetivo del presente capítulo fue validar morfológica y molecularmente la identidad de la colección de aislados del complejo *Glomerella/Colletotrichum* obtenidos en plantas sintomáticas de diferentes familias y especies hospedantes y diversos ambientes de la zona de producción núcleo argentina.

1. 2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Obtención de aislados de *Glomerella/Collectotrichum* (G/C)

El inóculo de G/C se obtuvo a partir de muestras procedentes de diversas localidades y ecosistemas de la región agrícola pampeana, provincias de Santa Fe, Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba (Fig 1 - 1). Se recolectaron porciones de tallos infectados como también tallos disponibles como residuos de poscosecha y con síntomas de antracnosis, tales como: atizonamiento de la caña en maíz (Fig 1 - 2a), en plantas de soja, (Fig 1 - 2c) y otros hospedantes como alfalfa y mandarina.

1.2.2 Aislado y conservación de las cepas fúngicas

La caracterización morfológica y la validación molecular de los distintos aislados recolectados se realizó en áreas equipadas con recursos de Fitopatología y secciones de Laboratorios asignados a la Especialidad (Lab. Biodiversidad BioVyM y Lab Pramin) en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), donde las muestras fueron acondicionadas para su conservación y posterior procesamiento y aplicación de técnicas de aislamiento fúngico en laboratorio (Postulados de Koch) (Agrios, 2005).

Las cepas fúngicas fueron aisladas en medio de cultivo por diferentes métodos:

a) Captura directa de conidios a partir de las acérvulas de *Colletotrichum* spp desarrollados sobre tallos, pecíolos y frutos (Fig. 1 - 2 b y d). Estos conidios se sembraron en placas de Petri con medio Agar Papa Glucosa Acidulado (APGA) con 2 % de glucosa y 1% de ácido láctico al 25 % v/v (volumen sobre volumen) y se incubaron durante 7 días a 27 ± 1 °C en oscuridad hasta observar el desarrollo de las colonias fúngicas (Pioli et al., 2004).

b) Residuos de poscosecha: Aislado en medio de cultivo: se tomaron secciones de 0,5 cm de tallos con síntomas disponibles como residuos postcosecha (Fig. 1 - 2a y 1 - 2c), se desinfectaron superficialmente en etanol 70% v/v (5 -10 s) y en hipoclorito de sodio 0,6% v/v (45 a 60 s) según grosor y consistencia de la muestra, luego se lavaron en agua estéril, se secaron en papel absorbente y se transfirieron a placas con medio APGA. Las placas fueron incubadas durante 7 días a 27 ± 1 °C en oscuridad hasta observar el desarrollo de las colonias (Incremona et al., 2009a).

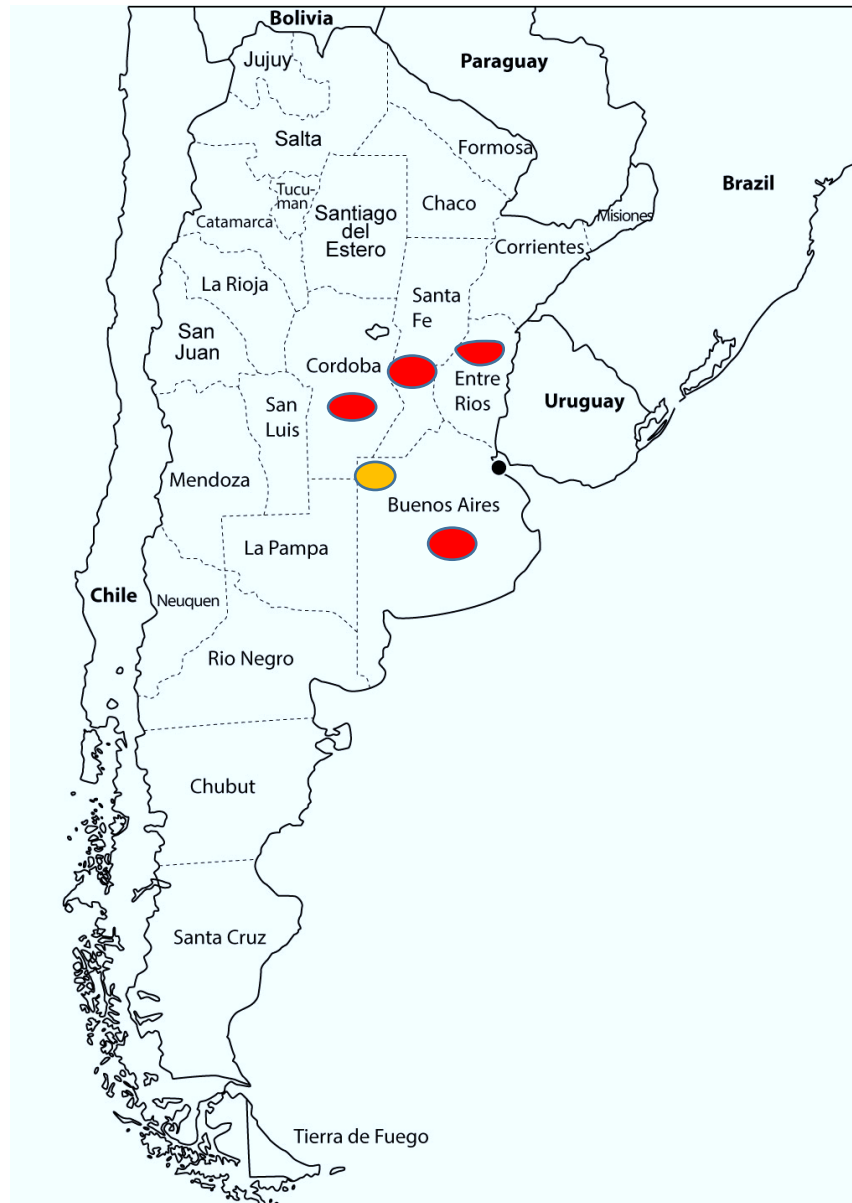


Fig. 1 -1: Mapa de la República Argentina y países limítrofes donde se indican las 5 localidades o áreas de recolección de muestras con síntomas de antracnosis causada por *Glomerella / Colletotrichum*. Cuatro de los sitios se localizaron en provincias de Buenos Aires (O 58° 22' 38.03''; S 34° 36' 47.34''); Córdoba (O 64° 10' 51.78'', S 31° 24' 48.6''); Entre Ríos (O 60° 16' 52'', S32° 02' 52') y Santa Fe (O 60° 42' 0''; S 31° 37' 59.99'') -áreas sombreadas en rojo; y la localidad de Bandalaló Pcia Buenos Aires (O 63°21', S35°00') -área sobreada en color amarillo.

A partir del margen de las colonias puras se tomaron pequeñas porciones de micelio de cada aislado G/Cy se sembraron en placas de 5 cm de diámetro y/o tubos con medio APGA solidificado en plano inclinado o en plano recto. Estos últimos, una vez observado el desarrollo fúngico puro, se cubrieron con vaselina estéril y luego tanto los tubos como las placas se conservaron a 4°C (Pioli et al., 2007). Posteriormente se realizaron repiques periódicos

(semanalmente) de cada cepa G/C para lograr su reactivación y verificar su estado de pureza y viabilidad (Riccioni et al., 1998; Pioli et al., 2000; EMPPO, 2004; Dokken et al., 2007).

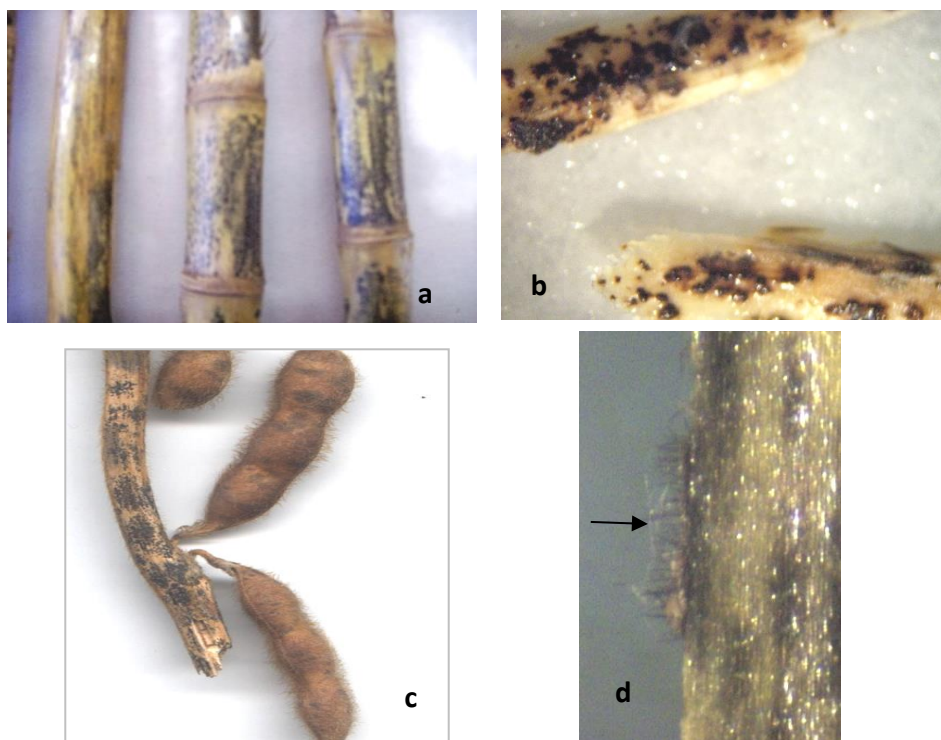


Fig 1- 2: **a:** Tallos de maíz con síntomas de antracnosis causado por *Colletotrichum* spp; **b:** Tallos de maíz con acérvulas (signos) de *Colletotrichum* spp.; **c:** Tallos de soja con síntomas de atizonamiento o antracnosis; **d:** Tallos de soja con acérvulas (signos) de *Colletotrichum* spp.

1.2.3 Determinación de la presencia y frecuencia de aislados fúngicos en las muestras

Para determinar la presencia y predominio de las especies de G/C en las muestras recolectadas para el estudio, se calcularon 2 parámetros:

Frecuencia Relativa (Fr) de las colonias fúngicas asociadas al rastrojo, calculada como: $Fr \% = (\text{n}^\circ \text{ de placas colonizadas por un determinado género y/o especie fúngica} / \text{n}^\circ \text{ total de placas evaluadas}) \times 100$ (Incremona et al., 2009a).

Incidencia (I), calculada como: $I \% = (\text{n}^\circ \text{ de secciones de tejido infectado por un determinado género y/o especie fúngica} / \text{n}^\circ \text{ total de secciones de tejido evaluadas}) \times 100$. La variable I % se analizó mediante Anova factorial para los hongos más relevantes por su potencialidad patogénica, con datos transformados con $\sqrt{x+1}$ y sin transformar (Pioli et al., 2000; Incremona et al., 2009a).

1.2.4 Caracterización morfológica y determinación de identidad de las cepas de *Glomerella* /*Colletotrichum*

Para favorecer el proceso de esporulación del hongo y el desarrollo abundante de fructificaciones sexuales o asexuales, típicas de *Glomerella* /*Colletotrichum* respectivamente, se aplicaron dos técnicas:

- a) Exposición de los cultivos puros a un período de incubación prolongada de 14 días (mínimo), con temperatura de 27 ± 1 °C y alternancia de 12 h de luz / 12 h de oscuridad (Correa Londoño et al., 2007).

- b) Colonización de tejidos con desinfección agresiva previa: se tomaron secciones de tallo de soja y maíz extraídos de plantas en crecimiento activo. Estas porciones de tejido debían ser sanos, asintomáticos, externa e internamente y de similar tamaño a los previamente descritos. Fueron sometidos a una desinfección agresiva de 1 min en alcohol 70% y 10 min en hipoclorito de sodio 2%, con tres enjuagues en agua destilada estéril y luego se secaron. Estas secciones se distribuyeron en placas de Petri con medio APGA (pobre en glucosa, 1%) (International Fusarium Laboratory Workshop, 2010). Luego se tomaron pequeñas porciones de micelio de cada aislado G/C obtenidos de los residuos de pos cosecha de maíz y soja y se sembraron sobre las secciones de tallo de soja y maíz desinfectadas previamente; las placas fueron incubadas a 27 ± 1 °C hasta promover fructificaciones y facilitar la caracterización fúngica (Fig 1 - 3) (Incremona et al., 2009 b).

Los aislados del complejo G/C obtenidos se identificaron y agruparon de acuerdo a similitudes basadas en la macromorfología de las colonias (forma, textura y pigmentación) y micromorfología (cuerpos fructíferos, medición de esporos de origen asexual y sexual, y tamaño y forma de los apresorios). Las observaciones se realizaron con microscopio estereoscópico SWIFT con objetivos de 2x y 4x, y microscopio óptico LEICA DM500 con objetivos de 40x y 100x (Pioli et al., 2007; Incremona et al., 2009) y se compararon con claves y referencias taxonómicas específicas: Clave de Genero de Hongos Imperfectos (Armstrong et al., 2006; Bailey et al., 1992; Barnett et al., 1998; EMPPO, 2004; Hartman et al., 1999).

Se priorizó la caracterización bio-morfológica de *C. truncatum* (Syns *C. dematium*); *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) y *C. graminicola* (teleomorfo *G. graminicola*), asociadas a soja y otros hospedantes y en el caso de estos 2 últimos, por ser capaces de producir ambas estructuras del binomio taxonómico: el sexual-teleomorfo y asexual-anamorfo.

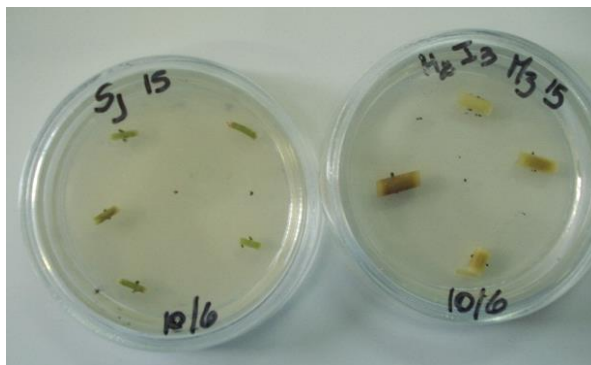


Fig 1 –3: Porciones de tallos de soja (izquierda) y de maíz (derecha) inoculados con micelio de *Colletotrichum* spp.

1.2.5 Caracterización molecular y validación de la identidad de *Glomerella/Colletotrichum*

La identificación de las diferentes especies del complejo *Glomerella/Colletotrichum* se realizó mediante técnicas moleculares (Cannon et al., 2000).

a) *Análisis de polimorfismos por amplificación al azar del ADN (RAPDs)*

Se utilizó la técnica de RAPDs basada en la amplificación de segmentos no específicos del ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico (Castiglione et al., 1993; Makino et al., 1994; Snowdon y Langsdorf, 1998; Amalraqibshamran et al., 2018). Son utilizados cebadores decámeros con secuencia arbitrarias de nucleótidos (Operon Technologies inc. Alameda, California, USA) que permiten generar productos de amplificación por PCR, los cuales son analizados en geles de agarosa o poliacrilamida (Gonçalves Barros et al., 2008).

Se seleccionó un grupo de 10 aislados G/C en base a su diversidad de origen (procedencia) y hospedante: cereal, forrajera y frutícola. Los aislados se desarrollaron a 27 ± 1 °C en placas de Petri con medio APGA y en oscuridad. A partir de las colonias desarrolladas durante 5-6 días de incubación, se realizó la extracción del ADN total de acuerdo al método de Dellaporta et al. (1983) con pequeñas modificaciones (Svetaz et al., 2006); y en los últimos análisis se utilizó un Kit de extracción de Wizard® Genomic DNA, Promega A1120 (Hernández et al., 2015).

El control de calidad e integridad del ácido deoxirribonucleico de cada aislado se evaluó por la presencia de una banda de alto peso molecular; mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 0,7 % en 1x de amortiguador TAE (Tris-Acetato EDTA) a 40 mA. A fin de visualizar las bandas se realizó una tinción de los geles con SYBR Safe (colorante de cianina) (Invitrogen) (Hernández et al., 2015).

Las mezclas de reacción con un volumen final (vf) de 25 μ L estuvieron compuestas de: 5 mM de cada dNTP (desoxinucleósido trifosfato) (1 μ L); 5 μ L de Go Taq® Reaction Buffer, 4,5

μL de cebador Xng/μL; 0,25 μL de AmpliTaq ácido deoxiribonucleico Polimerasa (5 unidades/μL) (Fernández & Hanlin, 1996; Pioli et al., 2003). Los cebadores utilizados se seleccionaron a partir de trabajos previos (Sant’Anna et al., 2010; Chen et al., 2006, Du et al., 2005) donde fueron sugeridos como marcadores efectivos para separar y diferenciar especies de *Colletotrichum* spp., ellos fueron: OPA1, OPA3, OPA5, OPA6y OPA8 (Operon Technologies, USA) (Dias, 2014) (Tabla 1 - 1). El OPA1 y OPA6 fueron utilizados en estudios previos y permitieron diferenciar géneros fúngicos, entre ellos a *Colletotrichum* (Peruzzo et al., 2010; Budassi et al., 2011).

Tabla 1 - 1: Cebadores utilizados en la amplificación de los aislados, secuencia y especificidad respecto a las distintas especies de *Colletotrichum* spp.

CEBADOR	SECUENCIA	AMPLIFICACIÓN (Especificidad)
OPA 1	(5´CAGGCCCTTC 3´)	General
OPA 6	(5´GGTCCCTGAC 3´)	General
OPA 3	(5´AGTCAGCCAC 3´)	<i>C. graminicola</i>
OPA 5	(5´AGGGGTCTTG 3´)	<i>C. truncatum</i>
OPA 8	(5´GTGACGTAGG 3´)	<i>C. graminicola</i> y <i>C. truncatum</i>

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Bio-Rad T100 con una etapa preliminar de tres minutos (min) a 94 °C, una etapa que consta de 40 ciclos de un min a 94 °C, un min a 35 °C y dos min a 72 °C. Finalmente, una vez realizados los 40 ciclos, se procedió a una etapa final de diez min a 72 °C (Gally et al., 2007; Hernández et al., 2015).

Los productos de amplificación fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturizantes y/o geles de agarosa al 2%. Se utilizó un equipo de electroforesis de geles de poliacrilamida Modelo S2 (Life Technologies). Como marcador de peso molecular se empleó DNA LADDER 100 pb (Invitrogen™), que incluye 15 fragmentos entre 100 y 1500 pb y un fragmento adicional de 2072 pb, en una concentración de 1 μg/μL. La visualización de las bandas se realizó de acuerdo al manual técnico del DNA Silver Staining System (Promega) para tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata (nitrato de plata 0,1 % p/v, formaldehído 0,07 % v/v). El revelado se realizó en una solución conteniendo 30 g/l de carbonato

de sodio (MERCK), 0,05 % de formaldehído y 2,5 mg/l de tiosulfato de sodio hasta la observación de las bandas y se detuvo la reacción con ácido acético 10 % v/v. Los patrones de bandas se analizaron directamente sobre los vidrios sobre un transiluminador de luz blanca (Hernández et al., 2015).

A partir de los perfiles de bandas obtenidos en los geles de poliacrilamida, para cada uno de los aislados de *Colletotrichum spp* y cada cebador (OPA-1, OPA-6, OPA-3, OPA-5 y OPA-8) de RAPDs utilizado, se construyó una matriz de datos, donde el valor 1 indica presencia y el valor 0 indica ausencia de la banda. La misma fue analizada por análisis de conglomerados y Distancia Euclídeana incluido en el Programa Infostat (Galli et al., 2007; Pioli et al., 2003).

b) Análisis complementario por secuenciación de fragmentos polimórficos amplificados por PCR utilizando cebadores específicos ITS 1 e ITS 4

Se seleccionó un grupo de aislados indicados en la Tabla 1- 2

Extracción de ADN fúngico y determinación de calidad y cantidad de ADN fúngico

Las colonias fúngicas puras se reactivaron realizando un repique en medio APGA e incubadas a 26 ± 2 °C. Luego de cinco días, el micelio de cada uno de los aislados fue recolectado con escalpelo (uno a cinco mg de tejido fresco) en microtubos de centrifuga de 1,5 mL (Pioli et al., 2003). La extracción de ADN genómico de los aislados se realizó con un Kit de extracción de Wizard® Genomic DNA, Promega A1120 (Hernández et al., 2015). El control de calidad e integridad del ácido deoxiribonucleico genómico de cada aislado se evaluó por la presencia de una banda de alto peso molecular; mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 0,7 % en 1x de amortiguador TAE a 40 mA. A fin de visualizar las bandas se realizó una tinción de los geles con SYBR Safe (Invitrogen) (Hernández et al., 2015; Pioli et al., 2016).

Amplificación en PCR y secuenciación

A partir de la muestra de cada aislado (Tabla 1-2) se secuenció una región del ADN ribosomal, la ITS1-5.8s - ITS4 del ADNr, amplificada mediante los cebadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Una fracción del producto de amplificación de cada aislado fue visualizado como única banda obtenida por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y tinción con SYBR Safe para validar la efectividad de la PCR.

Posteriormente los productos de amplificación fueron enviados a secuenciar a la compañía MACROGEN (Seúl, Korea). La identificación molecular se realizó comparando la secuencia obtenida contra todas las secuencias nucleotídicas de hongos reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tabla 1 - 2: Aislados de *Colletotrichum* spp de diferentes hospedantes que fueron analizados por secuenciación de fragmentos polimórficos amplificados por PCR utilizando los cebadores ITS 1 e ITS 4.

Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp	Hospedante
AC 1	Maíz
AC 6	Maíz
AC 7	Alfalfa
AC 8	Alfalfa
AC 13	Maíz
AC 15	Soja
AC 16	Soja
AC 24	Mandarina
AC 25	Soja
AC 32	Soja

1.2.6. Aislados *Glomerella/Colletotrichum* seleccionados para las Interacciones de planta, patógeno y ambiente (PPA)

A partir de la colección caracterizada morfológicamente, los 10 aislados de *Glomerella/Colletotrichum* caracterizados molecularmente (Tabla 1 - 2) fueron incluidos en la primera serie (ciclo 2013-14) del programa de inoculaciones previsto para los cultivares de soja e híbridos de maíz más relevantes de la región productiva pampeana.

En una instancia posterior, a partir de la colección de 10 aislados (Tabla 1 -2) se realizó una segunda selección de seis aislados de G/C (Tabla 1 - 3) en base: *al hospedante* de origen del

aislado, *región agroecológica* (ambiente) y la *virulencia* del aislado G/C en las interacciones evaluadas; y aquellos que permitieron diferenciar hospedantes resistentes y susceptibles, para realizar la segunda serie de inoculaciones (ciclo 2013-14) del programa previsto.

Tabla 1- 3: Procedencia y hospedante de los aislados de *Glomerella/ Colletotrichum* que fueron incluidos en el programa de inoculaciones cultivos – aislados G/C.

Aislados de <i>Colletotrichum spp</i> (AC)	Procedencia	Coordenadas geográficas	Hospedante
AC 1	Pergamino (Bs As)	60° 34' 24.9" O, 33° 53' 23.8" S	Maíz
AC 6	Bombal (Sta. Fe)	61° 19' 05"O, 33° 27' 29" S	Maíz
AC 13	Elortondo (Sta. Fe)	61° 37' 00" O, 33°42'00"S	Maíz
AC 16	Bandaló (Bs As)	63° 21'O, 35° 00' S	Soja
AC 24	Helvecia (Sta Fe)	60° 05' 00"O, 31° 06' 00"S	Mandarina
AC 32	Firmat (Sta. Fe)	61° 29' 00" O, 33° 27' 00" S	Soja

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Diversidad de aislados obtenidos desde el material vegetal relevado

Los aislados obtenidos de tejidos de soja, maíz y restos de cosecha de maíz de lotes infectados (Fig 1 - 4 a) ubicados en diferentes regiones agroecológicas, mostraron diversidad fúngica, en cuanto a su macro y micromorfología (Fig 1 - 4 b).

Una vez obtenidas las colonias fúngicas se determinó su identidad en base a la macromorfología y las mismas se conservaron en tubos inclinados de APGA (Fig 1 - 4 c).



Fig. 1 - 4: **a.** Secciones de tallo sembrados en placas de petri con APGA; **b:** Placa de Petri con APGA con colonias de *Colletotrichum* spp; **c:** Cultivo puro de *Colletotrichum* spp obtenido por transferencia o repique a tubo de ensayo con medio APGA en plano inclinado.

1.3.2 Determinación de presencia y frecuencia de aislados fúngicos obtenidos de dos sustratos diferentes (plantas y muestras de rastrojo)

La Tabla 1 – 4 muestra los valores de *Frecuencia relativa* (Fr %) de los aislados fúngicos obtenidos desde *plantas sintomáticas* de diferentes regiones agroecológicas de las provincias de Santa Fe (Bombal, San Genaro, Elortondo, Esperanza, Buenos Aires (Pergamino, Banderoló), Córdoba y Entre Ríos (Fig 1.1) mostrando lo siguiente: *Gliocladium* spp. (5,8%), *Aspergillus niger* (9,6%) (Fig. 1 - 5), *A. flavus* (11,5%), *Penicillium* spp. (5,8%), *Phomopsis* spp. (5,8%), *Fusarium* spp. (13,8%), *F. graminearum* (Fg) (13,5%) (Fig. 1 -6), *Alternaria* spp. (Al) (19,2%), *Glomerella/Colletotrichum* spp. (G/C) (21,2%) (Fig. 1 – 7, 8) y *F. oxysporum* (Fo) (25%)

Tabla 1 - 4: Valores de frecuencia relativa expresados en porcentaje (Fr %), de los patógenos obtenidos de tallos de soja y maíz de diversas áreas ecológicas.

Patógeno	Frecuencia relativa (%)
<i>Gliocladium</i> spp	5,8%
<i>Aspergillus niger</i> (Fig. 1 - 5)	9,6%
<i>Aspergillus flavus</i>	11,5%
<i>Penicillium</i> spp.	5,8%
<i>Phomopsis</i> spp.	5,8%
<i>Fusarium</i> spp.	13,8%
<i>Fusarium graminearum</i> (Fig. 1 - 6)	13,5%
<i>Alternaria</i> spp.	19,2%
<i>Glomerella/Colletotrichum</i> spp. (Fig. 1 – 7 y 8)	21,2%
<i>Fusarium oxysporum</i>	25%

Adicionalmente al evaluar muestras de rastreo de maíz procedentes de diferentes regiones ecológicas por ser un sustrato o reservorio de inóculo fúngico se observaron diferencias en la colonización fúngica conjunta de los géneros *Fusarium* (F) y *Colletotrichum* (Co) ($F= 4,04$; $p< 0,0002$). (Tabla 1 - 5).

Las muestras de rastreo procedentes de Buenos Aires y Córdoba mostraron la mínima I% de F y Co, mientras las muestras de Santa Fe mostraron los valores intermedios (10 a 16%) y mayores (25 a 30%) de I% de F y Co (Incremona et al., 2009a).

Tabla 1 - 5: Valores de Incidencia (%) de los principales agentes patógenos en muestras de rastros de maíz.

Muestras de rastros de maíz		% Incidencia de <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Colletotrichum</i> spp.		Test Duncan
1	Pcia. Bs. As.		1,0	a
2	Pcia. Bs. As.		1,0	a
3	Pcia. Córdoba		1,0	a
4	Pcia. Bs. As.		1,0	a
6	Pcia. Sta. Fe		9,7	ab
7	Pcia. Sta. Fe	9 a 17 %	10,3	ab
9	Pcia. Sta. Fe		16,4	ab
8	Pcia. Sta. Fe		25,2	b
10	Pcia. Sta. Fe	25 a 30%	27,0	b
5	Pcia. Sta. Fe		29,9	b

De las especies aisladas e identificadas del género *Fusarium*, las más relevantes por su importancia epidemiológica y patogénica fueron: *F. graminearum* (F. g.) y *Fusarium oxysporum* (F.o). Esto se debe a que F.g es el agente causal de la podredumbre basal de la caña y de la espiga, y F.o suele aislarse de raíces, tallos de cereales y leguminosas. En cuanto al complejo G/C es el causante de antracnosis en soja y podredumbre de la caña y ápice en maíz.

1.3.3 Desarrollo de colonias de la colección fúngica

Las Figuras 1 –5 a 8 muestran la macro (colonias) y micromorfología (fructificaciones) de los géneros fúngicos obtenidos a partir de las muestras analizadas (Incremona et al., 2009a).

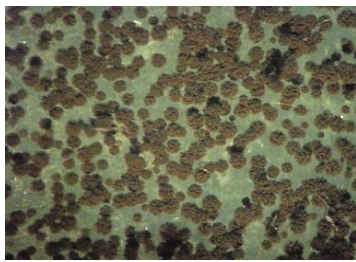


Fig. 1- 5 Colonia de *Aspergillus niger*

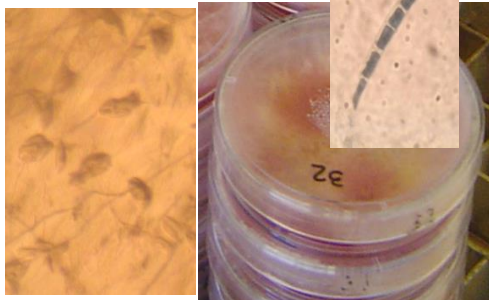


Fig. 1 - 6: colonia, esporoquios y macroconidios de *Fusarium graminearum*

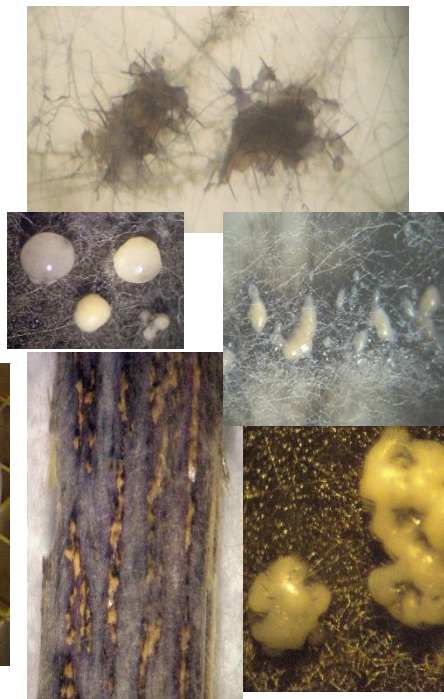


Fig. 1 -7: Acérvulas con setas de *Collectotrichum* spp.

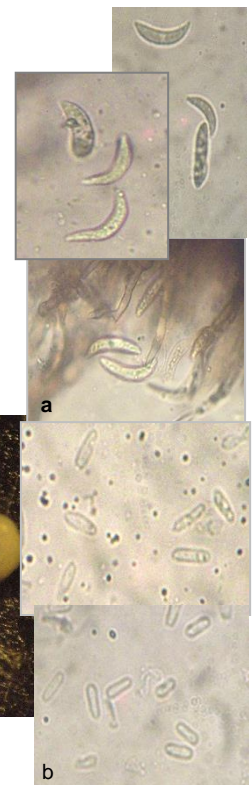


Fig. 1 -8 a. Conidios *Collectotrichum graminicola*. **b** Conidios *C. gloeosporioides*

1.3.4. Caracterización de aislados de *Glomerella/Colletotrichum* por marcadores macro y micromorfológicos

La caracterización morfológica de la colección de aislados del complejo *Glomerella/Colletotrichum*, permitió identificar cepas de *C. truncatum*; *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) y *C. graminicola* (teleomorfo *G. graminicola*) (Tabla 1 - 6), conformando una colección de 10 aislados de G/C identificados morfológicamente y evaluados en invernadero sobre el genotipo DM 4870 en ajuste metodológico. Estas especies de *Colletotrichum* spp son mencionadas dentro del complejo fúngico causal de la antracnosis en soja y en maíz (Tabla 1 – 6).

Tabla 1 - 6: Detalle de codificación, hospedantes, localidades agro ecológicas de procedencia de los aislados de *Glomerella-Colletotrichum*

Aislado de <i>Colletotrichum spp</i> (AC)	Hospedantes	Procedencia	Identificación por marcadores morfológicos
AC1	Maíz	Pergamino (Bs. As)	~ <i>C. graminicola</i>
AC5	Soja	Bombal (Santa Fe)	~ <i>C. truncatum</i>
AC6	Maíz	Bombal (Santa Fe)	~ <i>C. graminicola</i>
AC7	Alfalfa	Entre Ríos	~ <i>C. truncatum</i>
AC15	Soja	Chilibroste (Córdoba)	~ <i>C. truncatum</i>
AC16	Soja	Bandalao (Bs. As)	~ <i>C. truncatum</i>
AC17	Maíz	Entre Ríos	~ <i>C. graminicola</i>
AC23	Soja	Entre Ríos	~ <i>C. gloeosporioides</i>
AC24	Mandarina	Helvecia (Santa Fe)	~ <i>C. gloeosporioides</i>
AC25	Soja	Esperanza (Santa Fe)	~ <i>C. truncatum</i>

~ indica que la determinación de la identidad de los aislados fue realizada en base a caracteres morfológicos.

A dicha colección se incorporaron el AC 8 obtenido de otra especie hospedante –alfalfa– de la provincia de Entre Ríos, el AC32 de hospedante soja de la provincia de Santa Fe, y los aislados AC 11 y AC 13 obtenidos de hospedante maíz del Elortondo provincia de Santa Fe. Estos aislados también fueron caracterizados morfológicamente, lográndose así determinar la identidad de 14 cepas (Tablas1 - 7) obtenidas de 4 hospedantes y diversas áreas ecológicas de las provincias de Santa Fe, Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos.

Los aislados G/C identificados fueron: a) en soja (*Glycine max*), aislados de *C. truncatum*; b) en maíz (*Zea mays*), aislados de *C. graminicola* (teleomorfo *G. graminicola*), aislados de *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) *Colletotrichum.spp.*; c) en alfalfa (*Medicago sativa*) aislados de *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) y d) en mandarina (*Citrus reticulata*) aislados de *C. gloeosporioides* (teleomorfo *G. cingulata*) (Tabla 1 - 7) (Incremona et al., 2009 a - b).

Tabla 1 - 7: Hospedantes y procedencia de la colección de aislados del complejo *Glomerella* /*Colletotrichum* obtenidos.

Aislados	Hospedante	Procedencia	Identificación por marcadores morfológicos
AC1	Maíz	Pergamino (Bs. As)	~ <i>C. graminicola</i>
AC5	Soja	Bombal (Santa Fe)	<i>C. truncatum</i>
AC6	Maíz	Bombal (Santa Fe)	~ <i>C. graminicola</i>
AC7	Alfalfa	Entre Ríos	~ <i>C. truncatum</i>
AC8	Alfalfa	Entre Ríos	~ <i>C. truncatum</i>
AC11	Maíz	Elortondo (Santa Fe)	<i>C. graminicola</i>
AC13	Maíz	Elortondo (Santa Fe)	~ <i>C. graminicola</i>
AC15	Soja	Chilibroste (Córdoba)	~ <i>C. truncatum</i>
AC16	Soja	Bandaló (Bs. As)	~ <i>C. truncatum</i>
AC17	Maíz	Entre Ríos	<i>C. graminicola</i>
AC23	Soja	Entre Ríos	<i>C. gloeosporioides</i>
AC24	Mandarina	Helvecia (Santa Fe)	~ <i>C. gloeosporioides</i>
AC25	Soja	Esperanza (Santa Fe)	~ <i>C. truncatum</i>
AC32	Soja	Firmat (Santa Fe)	~ <i>C. gloeosporioides</i>

~ indica que la determinación de la identidad de los aislados fue realizada en base a caracteres morfológicos.

A continuación, se detallan las características macro y micro-morfológicas observadas en cada uno de los 14 aislados de G/C obtenidos incluidos en la Tabla 1 - 8.

Tabla 1 - 8: Identificación morfológica de colonias y fructificaciones de los principales aislados obtenidos de la colección *Glomerella* / *Colletotrichum* indicando procedencia y hospedante.

AC1 <i>C. graminicola</i> MAÍZ Pergamino (Buenos Aires)	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ
<p>Iniciales: líneas estromáticas marrón claro, puntos negros sobre ellos, gotas de color crema</p> <p>Maduras: colonias con fondo y borde estromático, con borde neto o definido superado por nuevo crecimiento de micelio. Envés fondo laxo oscuro negro. curvos; más gruesos.</p> <p>Estroma: estromático oscuro a negro, borde neto o definido superado por nuevo crecimiento de micelio. Envés fondo laxo oscuro negro. Aplanado. Con pelos</p>	<p>Los conidios son anchos, curvos, a la madurez tienen forma de hoz.</p> <p><u>Tamaño promedio:</u> Largo: 21.36 – 23.36 μm. Ancho: 5,05 μm Órganos de resistencia: clamidosporas, con 2 a 3 gotas dentro de cada conidio.</p> <p>Acérvulas: maduras con setas negras. Tamaño: 37, 40, 40, 40,43μm</p> <p>Iniciales: puntos negros sobre ellos gotas color crema.</p> <p>Maduras: setas y negras</p>
<p>Fig 1 - 9: a, b y c: conidios curvos tipo luna de <i>C. graminicola</i>; d: colonia en tubo inclinado de APGA; e: colonia en caja de petri en APGA, con presencia de acervulas (flecha roja) con sus setas negras.</p>	

Tabla 1 - 8: Continuación

AC5 <i>C. truncatum</i> Grupo II. SOJA Bombal (Santa Fe)	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ
<p>Inicial: colonia aplanada, color gris claro con algunas hifas blanquecinas. Colonias con pelos blancos que dan un aspecto elevado. Presencia de gúttulas color crema.</p> <p>Madura: base estromática de color verde oliva a negro, cubierta por micelio blanco grisáceo, a veces afelpado. Fondo con áreas estromáticas oliváceo a negro, formando grumos o motitas que luego constituyen los esclerocios. Bordes de las colonias irregulares negros, punteados, radiales o estriados.</p> <p>Envés: negro aparentemente homogéneo, pero en la lupa se ve entramado.</p>	<p>Conidios curvos, delgados, tipo sonrisa.</p> <p>Acérvulas: fructificaciones son negras y se muestran gúttulas de color gris claro o crema. Al madurar se presentan con setas negras. (47, 45, 43, 37, 50) x 2,75</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 21,79μm Ancho: 2,75μm o menor Grupo II</p>
<p>Fig 1 - 10: a y b: conidios curvos tipo sonrisa de <i>C. truncatum</i>; c: peritecios, signo sexual de <i>C. truncatum</i>; d: colonia en tubo inclinado de APGA; e: tallo de soja con presencia de micelio y gúttulas color crema en medio de APGA.</p>	

Tabla 1 - 8: Continuación

AC6 <i>C.graminicola</i> MAÍZ Bombal (Santa Fe)	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ
<p>Inicial: Pelo blanco aplanado (frente)</p> <p>Madura: Tinte rojizo (envés) con borde negro Sustancia mucilaginosa marrón sobre el material. Puntos negros muy pequeños. Setas (27, 40; 40 um)</p> <p>Fondo rosado con tintes rosa viejo. Colonia con micelio blanco-grisáceo. Envés borravino.</p> <p>Estroma: discontinuo, negruzco</p>	<p>Curvos y rectos. (tipo boomerang) Con 2 a 3 gotas dentro de cada conidio. Conidios unicelulares gutulados, algunos rectos otros con forma de hoz.</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 18,44 - 20,12 μm Ancho:3.3 μm</p> <p>Acérvulas negras y pequeñas. Setas oscuras (27, 40; 40 um).</p>
<p>Fig 1 – 11: a: conidios curvos y acérvula con setas oscuras en medio de APGA; b y c: conidios curvos de <i>C. graminicola</i>; d: colonia en tubo inclinado de APGA; e: tallo de soja con acervulas de <i>C. graminicola</i>.</p>	

Tabla 1 - 8: Continuación

AC7 <i>C. truncatum</i> ALFALFA Entre Ríos	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales
Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ	Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ
<p>Inicial: colonia oscura brillante con grumos, con pelos blancos</p> <p>Madura: base estromática de color verde oliva a negro, cubierta por micelio blanco grisáceo, envés: fondo con áreas estromáticas oliváceo a negro, bordes irregulares negros, formando grumos.</p>	<p>Conidios: delgados, curvados levemente, no tabicados, con célula central. Puntas redondeadas en sus extremos.</p> <p>Acérvulas con gúttulas crema. Setas cortas (25; 20, 22, 30, 24, 30) x 2,75.</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 27.6μm Ancho: 3.8 μm</p>
<p>Fig 1 - 12: a y b: conidios curvos en medio de APGA; c: acervulas con setas negras en APGA; d: colonia en tubo inclinado de APGA; e: tallo de soja con acervulas alineadas de <i>C. truncatum</i>; f: tallo de soja con micelio de <i>Colletotrichum</i> spp, presencia de gúttulas cremas.</p>	
AC8 <i>C. truncatum</i> ALFALFA Entre Ríos	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales
Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ	Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ
<p>Inicio: micelio escaso de crecimiento lento. Pelo ralo, adherido a la base.</p>	<p>Conidios curvos, no tipo sonrisa</p> <p>Acérvulas sobre áreas estromáticas, con gúttula conidial color crema grisácea.</p>

<p>Madura: base estromática de color verde oliva a negro, cubierta por micelio blanco grisáceo, micelio con copos o motitas blancos luego oscuros. Gúttulas naranjas.</p> <p>Envés: fondo con áreas estromáticas oliváceo a negro, bordes más netos o regulares negros y estromáticos.</p>	<p>Setas: 57.2µm.</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 8.7 – 9.9 µm Ancho: 5.3 µm</p>
--	--

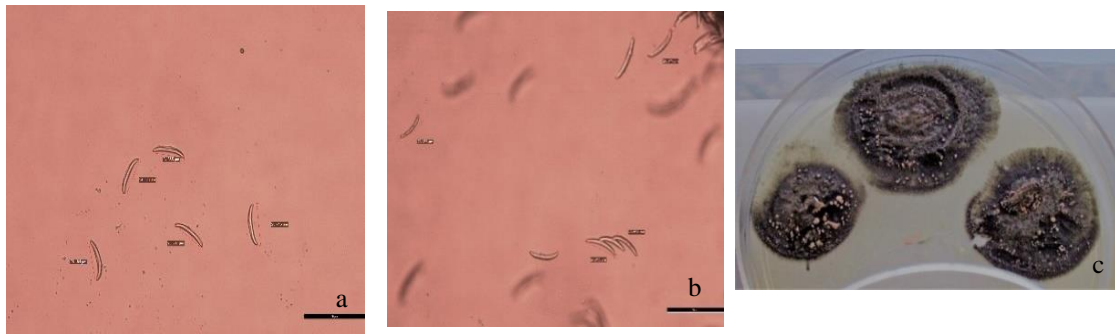


Fig. 1 – 13: a y b: conidios cilíndricos con bordes redondeados en medio de APGA; c: micelio de *Colletotrichum truncatum* con presencia de gúttulas anaranjadas.

AC11 <i>C. graminicola</i> MAÍZ Elortondo (Santa Fe)	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(µm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 µ40 x 1 div: 3 µ
<p>Inicial: colonia blanca luego comienza con un aro oscuro y micelio central blanco, formando un copete.</p> <p>Madura: micelio afelpado, de color verde oscuro con tintes rojizos. Con estroma negro. Hifas gruesas tubulares.</p>	<p>Conidios con forma de media luna. Con extremos de puntas finas.</p> <p>Acérvulas con setas largas, oscuras.</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 30.8µm</p>

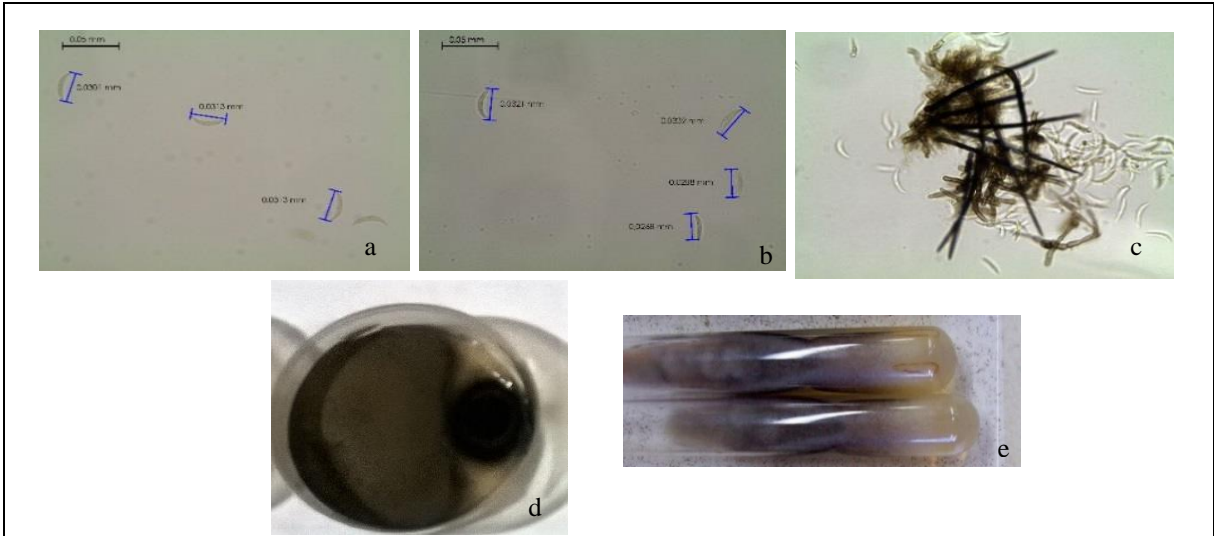


Fig. 1 – 14: **a y b:** conidios curvos de *C. graminicola* en medio de APGA; **c:** acérvulas con setas de color negras alargadas; **d:** micelio de *Colletotrichum* spp afelpado de color negruzco; **e:** colonia en tubo inclinado en APGA.

Tabla 1 - 8: Continuación

AC13 <i>C. graminicola</i> MAÍZ Elortondo (Santa Fe)	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ
<p>Inicial: verde oliváceo, micelio elevado grisáceas con tintes de pelo blanco.</p> <p>Madura: en placas: micelio elevado-afelpado de color verde oliváceo grisáceo. La base de las colonias es estromática, cubierta por micelio, por ello, es observado en los bordes de las colonias. Textura del estroma es denso oscuro-negro y aplanado, con bordes irregulares y estriados. Sobre él se ubican las fructificaciones (acérvulas). En tubo: verde oliváceo a negro, afelpada, plana. Envés: micelio negro, estriado discontinuo, más evidente en los bordes.</p>	<p>Inicial: acérvulas con exudado (cirro) color crema.</p> <p>Madura: acérvulas con cirro naranja se ven como exudados globosos color crema y mucilaginosas. Setas negras, alongadas. Distribución de acérvulas: localizadas a las zonas estromáticas de los bordes de las colonias. Curvos con una gútula clara en el centro.</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 24.1μm Ancho:3.25 μm Conidios: presencia de dos tipos de conidios, unos falcados y otros más pequeños ovalados.</p>
<p>Fig. 1 - 15: a: conidios curvos de <i>C. graminicola</i> en medio de APGA; b- d : presencia de dos tipos de conidios, unos falcados y otros más pequeños ovalados; e: caña de maíz con presencia de acérvulas; f: colonia de <i>C. graminicola</i> en tubo inclinado en APGA.</p>	

Tabla 1 - 8: Continuación

AC15 <i>C. truncatum</i> (Grupo II o III) SOJA Chilibroste (Córdoba)	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ
<p>Inicial: colonia oscura irradiada, plana con finos pelos blancos sobre la misma.</p> <p>Maduras: colonias aplanadas con un círculo verdoso a griseáceo. Rodeadas por pelos blancos. En el envés de color oscuro. Gúttulas color crema al inicio y luego se tornan color naranja.</p>	<p>Conidios tipo sonrisa, alargados, con puntas alargadas.</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 30,3 μm</p>
<p>Fig. 1 - 16: a y b: conidios de <i>C. truncatum</i> en medio de APGA; c: colonia de <i>C. truncatum</i> con gúttulas naranjas; d: colonias en tubo inclinado en medio de APGA; e: tallo de soja con infección latente con presencia de signos (acérvulas) : f: acérvulas</p>	

Tabla 1 - 8: Continuación

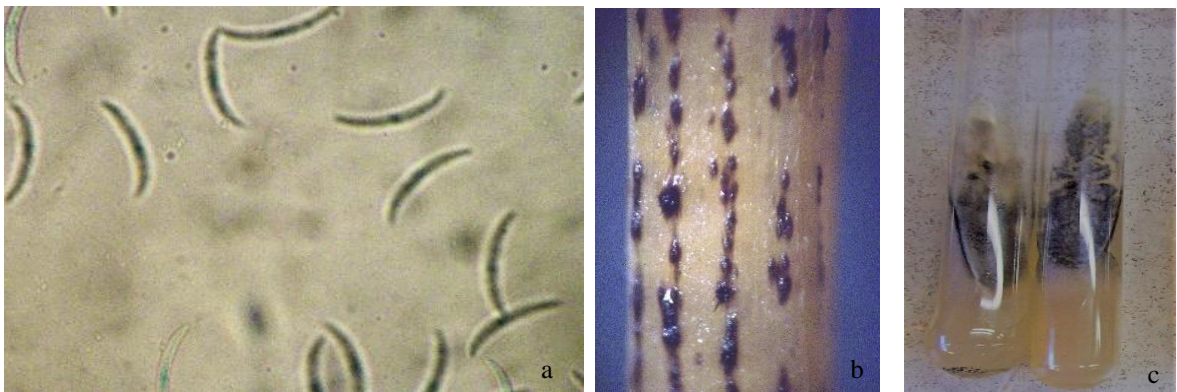
AC16 <i>C. truncatum</i> SOJA Banderoló (Buenos Aires)	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ y 40 x 1 div: 3 μ
<p>Inicial: colonias oscuras, planas irradiada, sin sobre elevarse.</p> <p>Maduras: colonias de color cremas a negro. Con setas negras pequeñas. Pelos blancos sobre el micelio. En colonias maduras pasan de color verde a negro. Brillosa. Con grumos. Enves: estroma con puntos negros y estriado. Gutulas color crema que luego se tornan naranjas.</p>	<p>Conidios ligeramente curvos, con bordes redondeados, delgados y sin célula central</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 21.1μm // Ancho: 2.75 μm</p> <p>Acérvulas: Negras abundantes o desarrolladas estroma. Ovals o alongadas, extremo cónico hemisférico o truncado con numerosas y pequeñas setas.</p> <p>Setas marrones oscuras o negras y abundantes, forma de aguja, 3- 8 x 60 a 300 μm.</p>
	
<p>Fig. 1 - 17: a: conidios de <i>C. truncatum</i> en medio de APGA; b : tallo de soja con acérvulas ubicadas linealmente; c: colonia de <i>C. truncatum</i> en tubo inclinado en medio de APGA.</p>	

Tabla 1 - 8: Continuación

AC17 <i>C. graminicola</i> MAÍZ Entre Ríos	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ
<p>Inicial: colonias blancas con bordes oscuros.</p> <p>Maduras: el haz del micelio de color blanco a grisáceo claro tornándose oscuro, micelio formado por cordones o mechones irregulares mas oscuros.</p> <p>Areas estomáticas segmentadas distribuidas en el centro y bordes</p> <p><u>Envés:</u> fondo blanquecino,</p>	<p>Conidios ligeramente curvos.</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u></p> <p>Largo: 21.3μm // Ancho: 1 a 1,5μm</p> <p>Acérvulas: Negras abundantes o desarrolladas estroma.</p> <p>Setas marrones oscuras o negras con forma de aguja.</p>
<p>Fig. 1 - 18: a: conidios y acérvulas de <i>C. graminicola</i> en medio de APGA; b y c: tubo inclinado en medio de APGA con colonia de <i>C. graminicola</i>; d: planta de soja inoculada con AC17; e: caña de maíz con síntomas de antracnosis inoculada con AC 17.</p>	

Tabla 1 - 8: Continuación

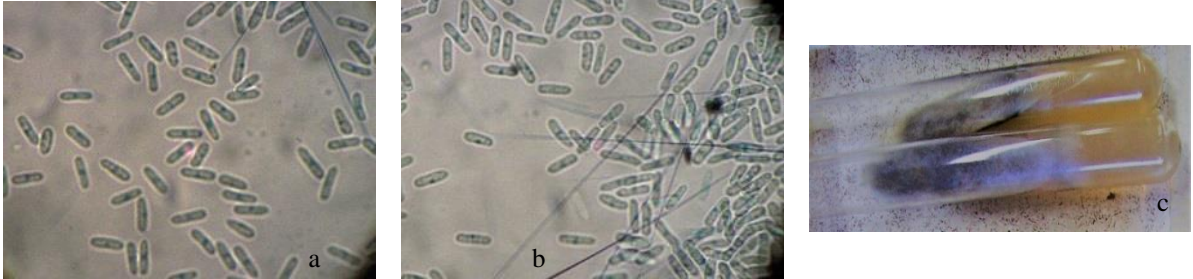
AC23 <i>C. gloeosporioides</i> SOJA Entre Ríos	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ 40 x 1 div: 3 μ
<p>Inicial: rosa claro</p> <p>Maduras: colonias grises o oscura con pelos blancos, elevada, plumosas con gúttulas color cremas.</p> <p><u>Envés:</u> estroma negro entero y irradiado. Color verdosas con radios que van desde el centro de la colonia a los extremos, con puntos negros.</p>	<p>Conidios elipsoidales, con una célula central, en los extremos redondeadas.</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 11.82 μm Ancho: 2.75 μm</p>
 <p>The figure consists of three panels. Panel (a) shows a microscopic view of numerous rod-shaped spores with rounded ends. Panel (b) shows a similar view of spores, some with thin filaments extending from them. Panel (c) shows a glass test tube containing a yellowish, fuzzy growth on an inclined surface, representing a colony of C. truncatum.</p>	
<p>Fig. 1 – 19: a y b: conidios de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de APGA; c: colonia de <i>C. truncatum</i> en tubo inclinado en medio de APGA.</p>	

Tabla 1 - 8: Continuación

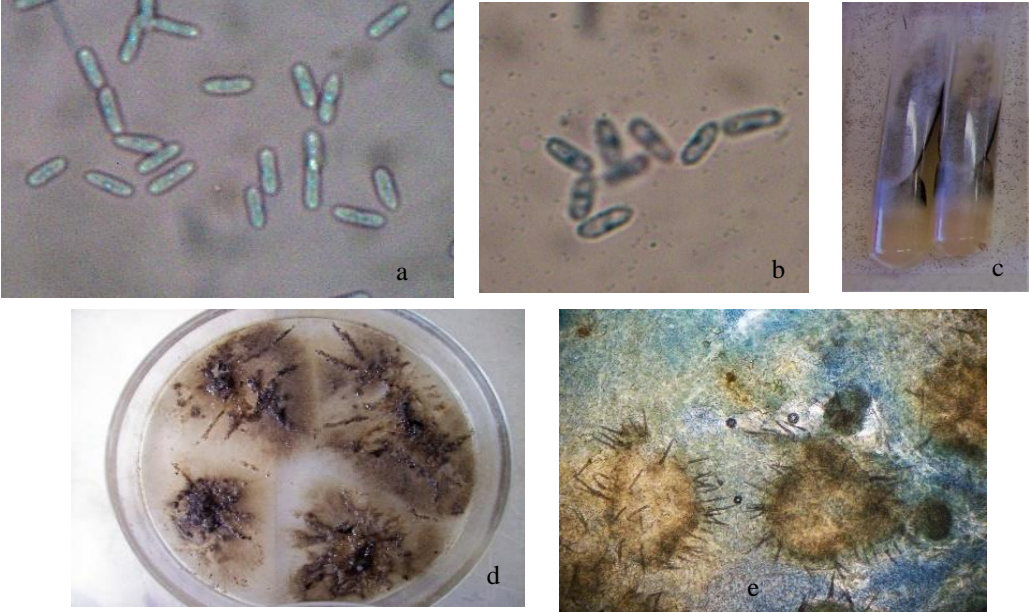
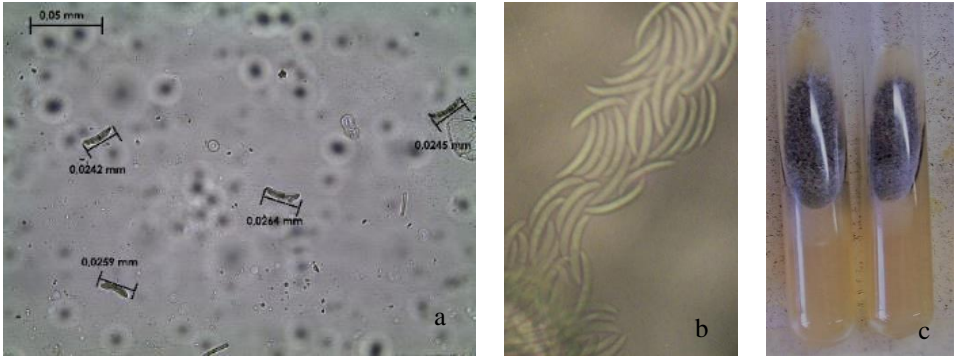
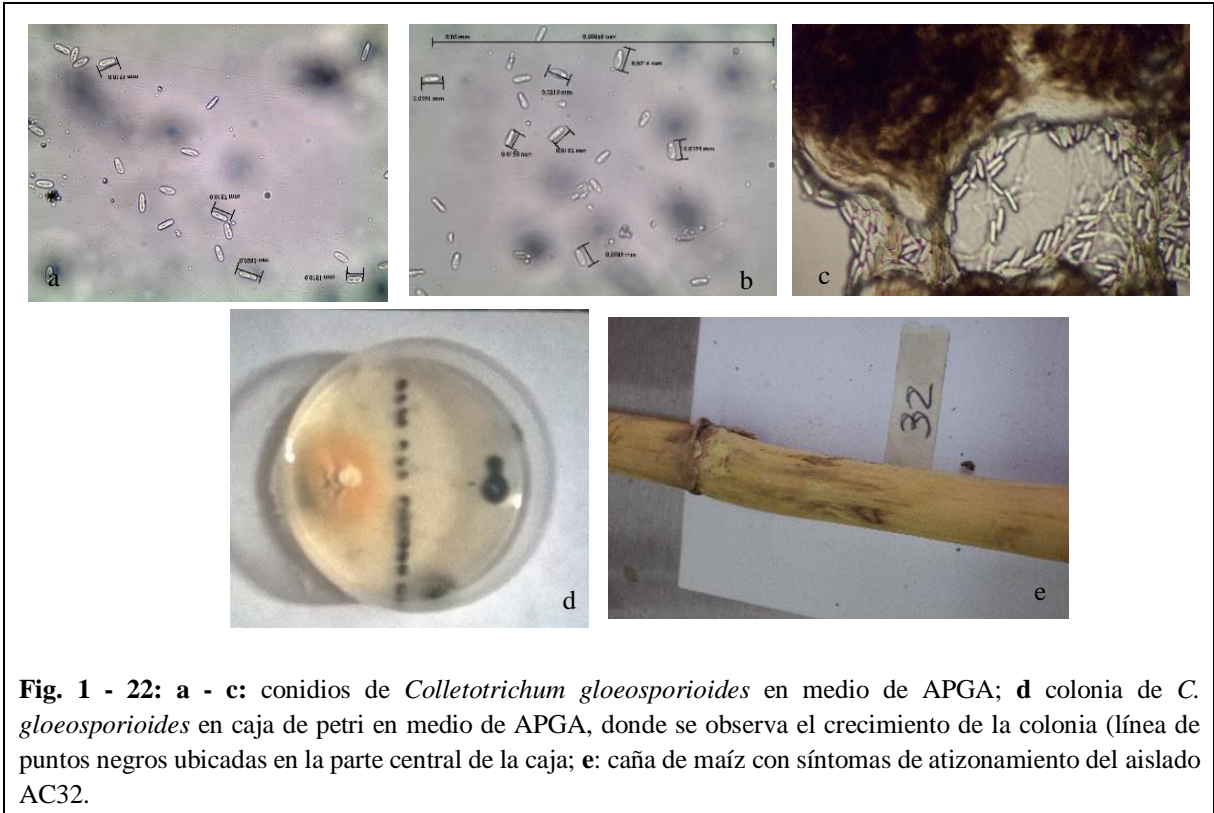
AC24 <i>C. gloeosporioides</i> MANDARINA Helvecia (Santa Fe)	
Colonias	Fructificaciones Asexuales
Bordes y texturas en placas	Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μm 40 x 1 div: 3 μm
<p>Inicial: colonia sobre estroma oscuro más laxo menos consistente o disgregado, radial. Micelio verde oliva cubierto con hifas gris verdoso claro-blanquecino, a veces como un manto afelpado, otras más ralo, con motitas de similar color que la colonia.</p> <p>Madura: puntos naranjas, <u>envés:</u> borde oscuro en cada colonia e interior marrón (beige). Micelio gris oscuro Oscuras con copos color crema a oscuros. Estroma negro (envés). Copos amarillos a negros. Líneas negras.</p> <p>Estroma: oscuro no homogéneamente consistente, disgregado, y radial.</p>	<p>Conidios pequeños bastones cortos divididos en el medio o con una célula naranja.</p> <p>Acérvulas: Inicial: con gútula o cirro color cremoso</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 10.72 μm Ancho: 5 μm</p> <p>Madura: Acérvulas con gútula o cirro color naranja.</p>
	
<p>Fig. 1 - 20: a y b: conidios de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de APGA; c: colonia de <i>C. truncatum</i> en tubo inclinado en medio de APGA; d: colonia de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de APGA; e: presencia de acérvulas en medio de APGA..</p>	

Tabla 1 - 8: Continuación

AC25 <i>C. truncatum</i> Grupo I SOJA Esperanza (Santa Fe)	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ
<p>Incial: grisacea.</p> <p>Madura: colonia oscura, plumosa, con pelos blancos sobre la superficie, cubriéndola en su totalidad. Aterciopelada.</p>	<p>Conidios tipo sonrisa, con extremos finos, con célula central.</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 25 μm</p>
	
<p>Fig. 1 – 21: a y b: conidios de <i>C. truncatum</i> en medio de APGA; c: colonia de <i>C. truncatum</i> en tubo inclinado en medio de APGA.</p>	
AC32 <i>C. gloeosporioides</i> Grupo 3 SOJA Firmat (Santa Fe)	
Colonias Bordes y texturas en placas	Fructificaciones Asexuales Forma, largo y ancho de los conidios(μm) / Acérvulas. 10 x 1 div: 13 μ40 x 1 div: 3 μ
<p>Incial: color crema a claro</p> <p>Madura: micelio afelpado color gris oscuro, con conidios tipo bastones.</p> <p>Estroma: estriado y negro</p>	<p>Conidios en forma de bastón elipsoides alargados con extremos redondeados y células en sus extremos.</p> <p><u>Tamaño Promedio:</u> Largo: 17 μm.</p>



1.3.5 Identificación molecular por secuenciación de fragmentos y caracterización molecular de aislados *Glomerella/Colletotrichum* por RAPDs

a) Caracterización molecular por RAPDs

En la Fig 1 –23 se muestra el perfil de bandas o amplicones obtenidos a partir de la técnica de RAPDs utilizando los cebadores OPA 1 y OPA 6, resueltos en gel de poliacrilamida, de 10 aislados de G/C (Tabla 1 - 9). Los aislados G/C (AC1, AC6, AC7, AC8, AC13, AC15, AC 16, AC24, AC25 y AC32) fueron seleccionados a partir de la colección original (Tabla 1 -7).

Tabla 1 - 9: Nómina de los aislados *Glomerella/Colletotrichum* y sus respectivos hospedantes que fueron caracterizados molecularmente por RAPDs mediante los cebadores OPA 1y OPA6

Aislado de <i>Colletotrichum</i> spp (AC)	Hospedante
AC 1	Maíz
AC 6	Maíz
AC 7	Alfalfa
AC 8	Alfalfa

AC 13	Maíz
AC 15	Soja
AC 16	Soja
AC 24	Mandarina
AC 25	Soja
AC 32	Soja

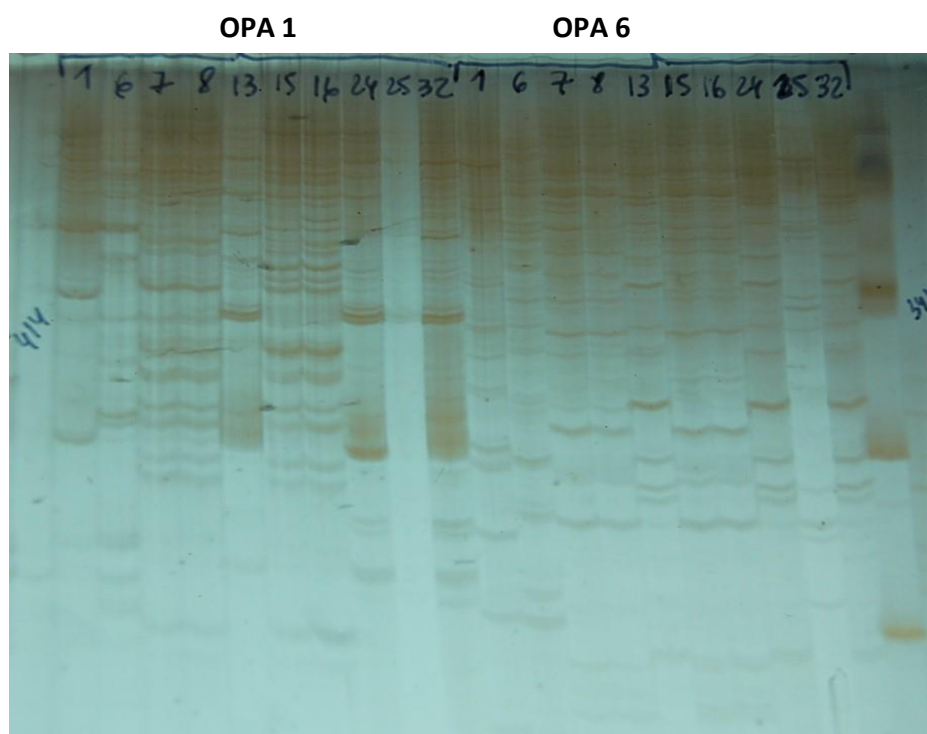


Fig 1 - 23: Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata mostrando los productos de amplificación de ADN a partir de la técnica de RAPDs utilizando los cebadores OPA1 y OPA6 y en 10 aislados de la colección de *Colletotrichum spp*, **1:** aislado de *Colletotrichum spp* de maíz, **6:** aislado de *Colletotrichum spp* de maíz, **7 y 8:** aislado de *Colletotrichum spp* de alfalfa, **13:** aislado de *Colletotrichum spp* de maíz, **15 y 16:** aislado de *Colletotrichum spp* de soja, **24:** aislado de *Colletotrichum spp* de mandarina, **25 y 32:** aislado de *Colletotrichum spp* de soja.

Los perfiles de bandas obtenidos para los aislados evaluados de *Colletotrichum spp* mostraron un tamaño de bandas entre 200 - 2000 y 400 - 1500 pb según el cebador (OPA1 u OPA 6) utilizados (Fig 1 - 23).

El dendrograma obtenido a partir del análisis de estos perfiles se observa en la Fig 1 -24.

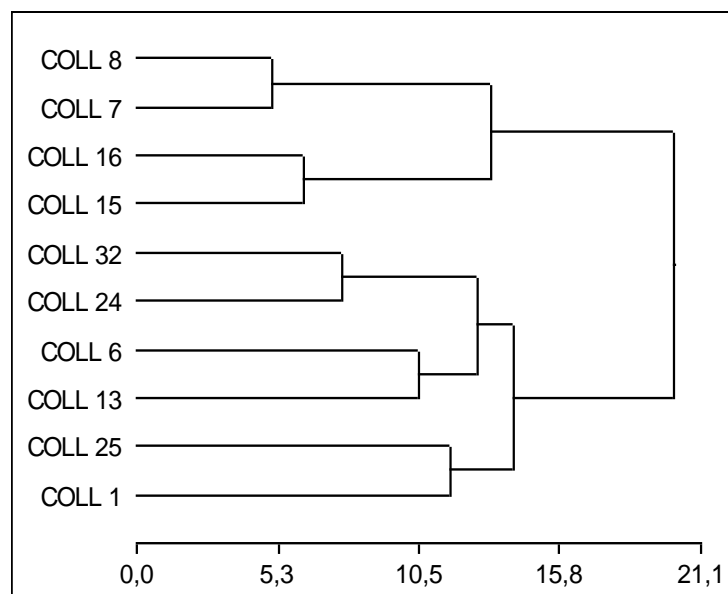


Fig. 1 –24: Dendrograma de los aislados de *Collectotrichum* spp obtenido en base al análisis de presencia ausencia de bandas generadas por la técnica de RAPDs utilizando los cebadores OPA 1 y OPA 6.

La mayor distancia observada fue de 20.06 ud E (unidades Euclidea), que significa que entre los 10 aislados G/C estudiados, existe 78,9 % de Similitud (S) validando que pertenecen al género *Collectotrichum*; ya que *el máximo valor de ud E es menor a 40 ud E y el valor % de similitud S es mayor al valor % mínimo de similitud S requerido para que los aislados se consideren pertenecientes al mismo taxón* (Solomon et al., 2007)

Con el uso de estos 2 cebadores, OPA 1 y 6, se definieron 2 Grupos Mayores (GM₁ y GM₂) a 88,5 y 87% de S respectivamente. El GM₁ contiene a 2 subgrupos: SG₁, SG₂ que están a 96,7 y 94,2% de S respectivamente incluyendo cada uno 2 aislados. Y el GM₂ contiene un SG₃ que contiene dos sub grupos con 2 aislados cada uno.

El **GM₁** contiene:

SG₁ reúne 2 cepas: A8y A7 (Hospedante alfalfa) a 5,3 udE (96,7 % S)

SG₂ reúne 2 cepas A16 y A15 (Hospedante soja) a 5,8 udE (94,2 % S)

El **GM₂** contiene:

SG₃:reúne 2 subgrupos: **Ga** reúne a las cepas A32 (Hospedante soja) y A 24 (Hospedante mandarina) a 7,4 udE (92,6% de S) y **Gb**reúne a las cepas A6 y A 13 (Hospedante maíz) a 10,5 udE (89,5 % S)

SG₄: contiene 2 cepas A25 (Hospedante soja) y A1 (Hospedante maíz) a 11 udE (89 % S).

b) Dendogramas obtenidos para los seis aislados G/C empleados para inocular, analizados por la técnica de RAPDs utilizando los cebadores OPA 1, 3, 5, 6, 8.

En la Tabla 1 –10 se muestran los dendogramas obtenidos a partir del análisis de los fragmentos de amplificación generados por RAPDs utilizando ADN genómico de las cepas de *Colletotrichum spp* y los cebadores OPA 1, OPA 6, OPA 3, OPA 5, OPA 8. La evaluación se realizó utilizando el programa Infostast, por análisis de conglomerados. Distancia:Euclideana. Correlación cofenética= 0,798 (Tabla 1 -10). A partir de los análisis realizados con cada primer, se analizaron numerosas combinaciones hasta seleccionar aquellas que aportaron mayor información y permitieron establecer la relación de similitud o parentesco entre los aislados de G/ C evaluados.

Tabla 1 - 10: Dendogramas obtenidos con los cebadores individuales OPA 1, 6, 3, 5 y 8 para los aislados de *Colletotrichum* spp usados en las inoculaciones.

Cebador 1		Cebador 6		Cebador 3 (<i>C. graminicola</i>)		Cebador 5 (<i>C. truncatum</i>)		Cebador 8 (<i>C. graminicola</i> y <i>C. truncatum</i>)	
Aislado	Hospedante	Aislado	Hospedante	Aislado	Hospedante	Aislado	Hospedante	Aislado	Hospedante
16	Soja	16	Soja	24	Mandarina	32	Soja	32	Soja
6	Maíz	32	Soja	16	Soja	6	Maíz	24	Mandarina
13	Maíz	24	Mandarina	32	Soja	13	Maíz	16	Soja
32	Soja	13	Maíz	6	Maíz	24	Mandarina	13	Maíz
24	Mandarina	6	Maíz	13	Maíz	16	Soja	6	Maíz
1	Maíz	1	Maíz	1	Maíz	1	Maíz	1	Maíz

Criterios para la lectura del Dendograma:

- ✓ se definieron los colores de los aislados y su agrupamiento, que en general, fue como se indica: soja/mandarina en **color verde** y maíz en **color celeste** y los aislados que se separaron de sus grupos se señalaron: en **color rosa** los de soja y en blanco los de maíz.
- ✓ en la columna de los aislamientos este criterio se mantuvo siempre,
- ✓ en la columna de hospedantes se destacaron en amarillo, los casos que no separaron aislados de distintos hospedantes soja y maíz.
- ✓ Se resaltaron en color los cebadores específicos 3 y 8 que aportaron información significativa y general con el cebador 1.

Los diferentes colores muestran la efectividad de los cebadores (Tabla 1- 1) para la validación molecular de los 6 aislados seleccionados. El cebador 3 agrupó de acuerdo a su especificidad a los aislados de *C. graminicola* (AC1, AC6, AC13) diferenciándolos de los aislados de soja y mandarino. El cebador 8 específico para *C. truncatum* y *C. graminicola* diferenció los aislados de *C. graminicola* (AC1, AC 6, AC 13) pero no diferenció los aislados de *C. truncatum* (por caracterización morfológica AC16) de los aislados de *C. gloeosporioides* (AC32 y AC24). El cebador genérico 1 diferenció los aislados de las especies: *C. truncatum* (AC16 de soja), *C. graminicola* (AC 6, AC 13 de maíz) y *C. gloeosporioides* (AC 24 de mandarino y AC 32 de soja). El cebador 6 también logró diferenciar al aislado de *C. truncatum* (AC16 de soja) pero el resto de la información resultó inconsistente de manera similar a lo observado en el caso del cebador 5 (Tabla 1 -11).

Tabla 1 - 11: Validación de la identidad de cada aislado de *Glomerella* / *Colletotrichum* por marcadores morfológicos (MM) y la caracterización molecular por RAPDs

Aislado de <i>Colletotrichum</i> spp (AC) y Hospedante	Identidad por MM	Marcador RAPDs
AC 1 - Maíz	<i>C. graminicola</i>	OP 3 y 8
AC 6 – Maíz	<i>C. graminicola</i>	OP 1, 3 y 8
AC 13 – Maíz	<i>C. graminicola</i>	OP 1, 3 y 8
AC 16 – Soja	<i>C. truncatum</i>	OP 1 y 6
AC 24 - Mandarina	<i>C. gloeosporioides</i>	OP 1 y 8
AC 32 – Soja	<i>C. gloeosporioides</i>	OP 1 y 8

c) Identificación molecular de los aislados fúngicos por secuenciación de fragmentos por ITs.

La Fig. 1 -25 muestra la calidad del ADN genómico extraído de los aislados de *Glomerella* / *Colletotrichum*.

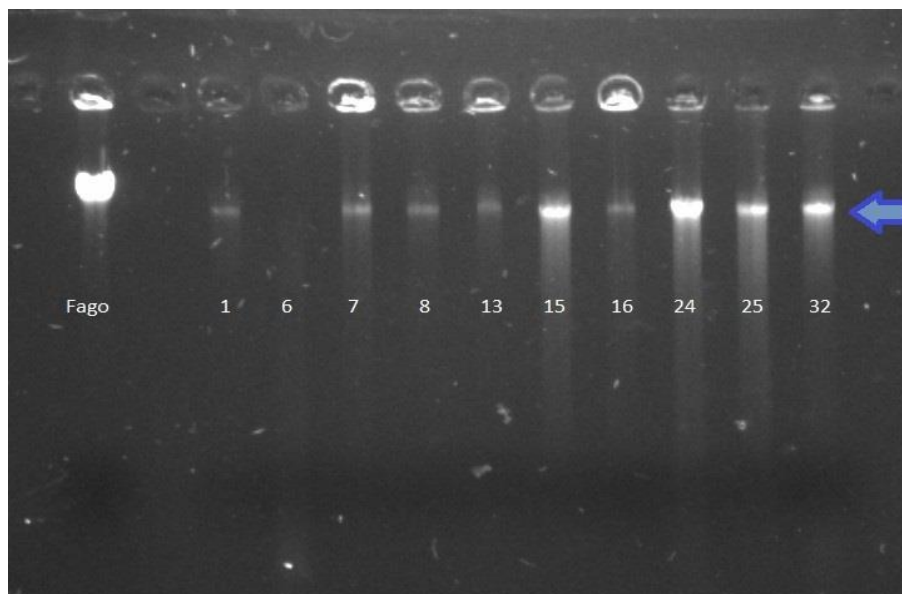


Fig. 1 - 25: Gel de agarosa mostrando la calidad del ADN genómico obtenidos de los 10 aislados de *Glomerella / Colletotrichum*.

Los productos de PCR fueron observados en el gel de agarosa (Fig. 1 – 26) y luego enviados a secuenciar a la compañía MACROGEN (Seúl, Korea). La validación molecular de la identidad de las cepas se realizó comparando la secuencia obtenida para cada aislado contra todas las secuencias nucleotídicas de hongos reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

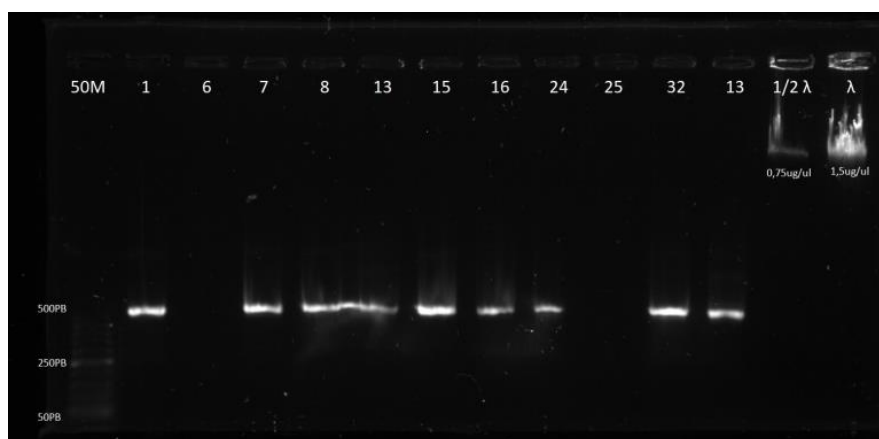


Fig 1 - 26: Productos de amplificación de la región ITS1-5.8s - ITS4 del ADNr de 10 aislados de la colección de *Colletotrichum* spp. obtenidos a partir de los cebadores ITS1 e ITS4.

Este análisis corroboró la identidad (Fig 1 -25) de los siguientes aislados de *Glomerella /Colletotrichum* con su género y especie (Tabla 1 - 12) (Voet, 2004).

Tabla 1 - 12: Validación de la identidad de cada aislado de *Glomerella* / *Colletotrichum* por marcadores morfológicos y la secuenciación del fragmento amplificado por ITs 1 - 4 con su puntuación (score) y porcentaje de identidad.

Aislado de <i>Colletotrichum</i> spp (AC) y Hospedante	Total de puntuación (score)	Porcentaje de Identidad	Identidad validada por secuenciación de la región genómica ITs 1 - 4
AC 7 - Alfalfa	977	99,26	<i>C. truncatum</i>
AC 8 – Alfalfa	979	98,52	<i>C. truncatum</i>
AC 15 – Soja	994	99,45	<i>C. truncatum</i>
AC 16 – Soja	998	99,28	<i>C. truncatum</i>
AC 24 - Mandarina	965	100	<i>C. gloeosporioides</i>
AC 32 – Soja	970	99,44	<i>C. gloeosporioides</i>

Los aislados de *Glomerella/Colletotrichum* fueron validados por secuenciación de la región ITs 1-4 del DNAr (Tabla 1 - 13), excepto los AC 1, AC6 y 13 que por la baja calidad del ADN genómico extraído no se logró secuenciar.

Tabla 1 -13: Validación de la identidad de cada aislado de *Glomerella/Colletotrichum* identificado por marcadores morfológicos (MM) y secuencias moleculares (MMo) por RAPDs y ITS 4.

Aislado de <i>Colletotrichum</i> (AC) y Hospedante	Identidad por MM	Identidad validada por RAPDs	Identidad por secuenciación de la región genómica ITs 1 - 4
AC 1 – Maíz**	<i>C. graminicola</i>	OP 3 y 8	Sin resultados
AC 6 – Maíz**	<i>C. graminicola</i>	OP 1, 3 y 8	Sin resultados

AC 7 - Alfalfa	<i>C. truncatum</i>	OP 1 y 6	<i>C. truncatum</i>
AC 8 – Alfalfa	<i>C. truncatum</i>	OP 1 y 6	<i>C. truncatum</i>
AC 13 – Maíz**	<i>C. graminicola</i>	OP 1, 3 y 8	Sin resultados
AC 15 – Soja	<i>C. truncatum</i>	OP 1 y 6	<i>C. truncatum</i>
AC 16 – Soja**	<i>C. truncatum</i>	OP 1 y 6	<i>C. truncatum</i>
AC 24 – Mandarina**	<i>C. gloeosporioides</i>	OP 1 y 8	<i>C. gloeosporioides</i>
AC 32 – Soja**	<i>C. gloeosporioides</i>	OP 1 y 8	<i>C. gloeosporioides</i>

Los aislados de *Collectotrichum* sp. señalados** y coloreados fueron seleccionados para las inoculaciones

De acuerdo a la información provista por la Tabla 1 – 13, 6 aislados de *Glomerella/Colletotrichum* proveniente de diverso origen (sitio y hospedante) utilizados en las diferentes series de inoculaciones fueron validados en su identidad de género (*Colletotrichum spp*) y su especie por caracterización morfológica y molecular, por secuenciación de fragmentos ITs y tres más caracterizados morfológicamente pueden considerarse validados ya que la caracterización por RAPDs indica porcentaje de similitud mayores a 78,9 % entre los 9 aislados estudiados (Sharma y Tewari, 1998).

1.4 DISCUSIÓN

El género *Collectotrichum* ha sido considerado recientemente como el octavo grupo más importante de hongos patógenos en plantas, en el mundo, con base en la importancia científica y económica percibida (Dean et al, 2012). Nuestro trabajo permitió realizar estudios preliminares en nuestro país y más estrechamente en la zona agrícola núcleo sobre la *caracterización morfológica* donde se identificó una gama de aislados del complejo G/C, obtenidos de 4 hospedantes: cereales, frutícola y forrajero y de dos regiones agroecológicas de la Argentina: de los ámbitos de la Pampa Húmeda y Mesopotamia, ratificando la presencia predominante de este patógeno y su variabilidad. Estos resultados son de importancia epidemiológica considerando la secuencia de cultivos en los sistemas de producción agrícola-ganadera.

Los estudios preliminares, permitieron la evaluación de residuos de cosecha infectados constituyendo el principal reservorio de los patógenos hemi-biotrófos y algunas otras especies fúngicas como *F. graminearum*, *F. oxysporum*, y *Collectotrichum spp*, específicamente en las provincias de Santa Fe, Buenos Aires y Córdoba, que forman parte de la Pampa Húmeda, donde se registran los mayores niveles de producción de los cultivos de soja y maíz, esto último coincide con lo establecido por Ramos et al. (2013) quienes analizaron toda el área de cultivo de soja de Argentina que se encuentra bajo sistemas de siembra directa y determinó que los restos de cultivos que permanecen en la superficie del suelo proporcionan condiciones óptimas para el desarrollo activo de estructuras reproductivas de *C. truncatum* y *C. destructivum* y que cualquier evento de mutación o recombinación sexual o vegetativa se ve incrementada por la alta tasa reproductiva que ocurre en estas condiciones. El nivel de variabilidad genética dentro de las poblaciones de patógenos de plantas proporciona un indicador de la adaptabilidad de los patógenos para superar la resistencia de las plantas y las medidas utilizadas para controlar el patógeno, tal como la aplicación de fungicidas. Considerando que el 90% de nuestros sistemas productivos agrícolas, están basados en el sistema de siembra directa, donde la presencia de rastrojos en superficie son la principal fuente de inóculo, es un desafío encarar una alternativa de manejo en el sistema de labranza equilibrando el sostenimiento de un perfil y la presencia activa y latente de estos patógenos.

La caracterización morfológica pudo determinar que la especie *C. graminicola* en hospedante maíz, presenta valores de tamaño de conidio menores a los descriptos por Manandhar y Hartman (1999), pero con igual forma de conidio. Du et al. en 2005 expresaron

que los aislados pertenecientes a *C. graminicola* produjeron esporas falcadas, pero los aislados de la subfamilia *Poideae* produjeron esporas que varían en forma de falcadas a rectas y fusiformes. Sin embargo, en nuestro trabajo las esporas de *C. graminicola* presentan forma de hoz y media luna (curvos). A diferencia de Sutton (1980) que observó que las colonias de *C. graminicola* se difundían con un margen irregular, el micelio aéreo era esponjoso y gris las masas conidiales de color naranja salmón, con setas en cantidad abundante, nuestras colonias aisladas de hospedantes provenientes de la región núcleo, expresaron una coloración blanca que luego comienza con un aro oscuro y micelio central blanco, formando un copete en su madurez, de micelio afelpado color verde oscuro con tintes rojizos y estromas negros.

Con respecto a *C. truncatum*, Chongo et al. (2002) en su estudio sobre lenteja realizaron una descripción morfológica de los aislados utilizados: los conidios eran ligeramente falcados y cónicos en los extremos, con tamaño promedio de $15,4 / 16,6 \mu\text{m} \times 5,4 \mu\text{m}$ y rango de $11,4-21,5 \times 4,1-5,8 \mu\text{m}$. Este rango de tamaño de los conidios es similar al de *C. truncatum* descrito por Sutton (1992). Sin embargo, en otros trabajos de este autor, los conidios de sus aislados fueron ligeramente más cortos, más anchos y menos falcados que los aislados de *C. truncatum* descritos en soja (Manandhar et al., 1985; Staples et al, 1976). Ford et al(2004) describieron a los conidios de *C. truncatum* en soja como falcados, puntiagudos en ambos extremos, generalmente más largos y estrechos. En este trabajo y en contraposición con estos autores, los conidios de *C. truncatum* en soja fueron curvos, delgados, tipo sonrisa, no tabicados, redondeados en los extremos, con tamaño más largo que los descritos por Chongo et al., (2002) y por Dias et al., (2019) obtenidos del mismo cultivo. Con respecto a las colonias, descritas en esta tesis son de diferente aspecto, color y forma a las referidas por Chongo et al. (2002) pero son coincidentes en los colores de las obtenidos por Dias et al., (2019) que variaron de gris claro a oscuro con masas de esporas naranja o beige / naranja.

En la caracterización de los aislados obtenidos de la región núcleo argentina, se determinó la presencia de *C. truncatum* y *C. gloeosporioides*, proveniente de soja de muestras extraídas de las provincias de Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y Entre Ríos, en coincidencia con varios autores mencionados anteriormente (Manandhar et al., 1985, Latunde-Dada et al., 2001). Si bien *C. truncatum* se ubica dentro de la especie que afecta a *Glycine max*, Cabrera et al., (2001) determinó en plantas de soja con antracnosis la presencia constante de *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. junto a *C. truncatum*, pero las pruebas de patogenicidad fueron positivas solamente con la cepa *C. truncatum truncata*. En esta tesis se demostró por los

postulados de Koch la presencia de *C. gloeosporioides* en genotipos de soja, donde el tamaño de los conidios similar a lo expresado por Bose et al, 1973 con un valor de 11-16 x 4-6 μm . Simmonds (1965) informó conidios 11,9-17,0 x 3,6-5,8 μm (promedio 13,8x4,8 μm) anchos oblongos con extremos redondeados y 11,1-17,7 x 3,1-5,0 μm (promedio 14,0 x 3,7 μm) para *C. gloeosporioides*. Sutton (1992) reconoció a la especie como un grupo heterogéneo con una gran variación en la morfología, aunque según lo expresado por Meenakshi Sharma (2015), estas características no son confiables porque *Colletotrichum spp* con frecuencia produce conidias secundarias de diferentes formas y tamaños. Sin embargo, en cuanto a lo morfológico, diferimos en la forma, color de colonia y tamaño de conidios a lo expresado por Manandhar y Hartman (1999).

En los aislados de alfalfa obtenidos de la región de Entre Ríos se determinó la presencia de *C. truncatum*, en oposición con lo expresado por Damm et al., (2012) que consideró a *C. destructivum* patógeno de alfalfa. La presencia de *C. truncatum* en alfalfa, se ratificó morfológica y molecularmente, en este trabajo.

Nuestros estudios coinciden con Weir y Damm (2012), quienes reportan que la especie *C. gloeosporioides* fue recolectada de citrus y en nuestro hospedante *Citrus reticulata* se determinó también la presencia de *C. gloeosporioides* morfológicamente y la secuenciación de segmento ITs confirmó su presencia.

En la caracterización molecular de los aislados obtuvimos resultados preliminares logrados por el análisis de los cinco oligonucleótidos OPA que muestra que los 9 aislados de *Colletotrichum spp* evaluados, están estrechamente relacionados (> 96 unidades de distancias Euclideas). La corrida electroforética con los productos de amplificación, OPA1 y OPA6 mostró un perfil de bandas entre 200 y 2000 bp. El análisis combinado de ambos cebadores diferenció 2 grupos de cepas estrechamente asociados aunque sin relación morfológica, hospedantes o ambiente.

En cuanto a la secuenciación realizada de los productos de amplificación con cebadores ITs, permitió ratificar la identidad molecular de varios aislados con su correspondiente identidad morfológica, entre ellos los AC7 y AC8 con hospedante alfalfa confirmando la presencia de *C. truncatum*, en contraposición por lo expresado por Manandhar et al., (1985), Latunde-Dada (2001) y lo expresado por Damm (2012) que informaron sólo a *C. destructivum* como patógeno en la alfalfa y soja.

Ramos et al. (2013) informaron sobre la presencia de *C. truncatum* y *C. destructivum* en soja de Argentina validados por AFLP; sin embargo, los aislados AC15, AC16 y AC 32 provenientes de hospedante soja en este estudio, confirmados molecularmente por RAPDs y ITs, correspondieron a *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* en este cultivo.

Respecto del aislado AC 24, cuyo hospedante es mandarina, se identificó como *C. gloeosporioides* tanto molecular como morfológicamente en coincidencia con Freeman (1998) que presenta a *C. gloeosporioides* como un patógeno de poscosecha en esta especie de cítricos sobreviviendo en el campo como saprófito, los aislados AC1, AC6 y AC13 provenientes de maíz, por la técnica de RAPDs, el cebador 3 los diferenció del resto y el cebador 8 que resulto ser específico para *C. truncatum* y *C. graminicola* separo ambas especies en maíz y soja Si bien no se pudo confirmar la identidad genética por secuencias de ITs por la mala calidad del ADN, avalamos los mismos con la caracterización morfológica realizada y por el porcentaje de similitud obtenido RAPDs, confirmando como *C. graminicola* las 3 cepas.

Los cebadores 1, 6 y 8 proporcionaron información significativa en la separación de *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* en los cultivos de soja y mandarina.

En el AC 13 identificado morfológicamente como *C. graminicola*, se encontró la presencia de dos tipos de conidios, unos falcados y otros más pequeños, ovalados, acordando con Sukno et al (2008) quienes describen en *C. graminicola* estos dos tipos de conidios, donde la forma falcada se asocia a acérvulas de las superficies de las lesiones y actuantes en la dispersión de la enfermedad, mientras que los conidios ovalados se encontraron en el interior de tallos y hojas. En cuanto a la identidad molecular, este aislado correspondió a *C. graminicola* validado morfológicamente.

De acuerdo a lo expresado por Menezes et al., (2006) y por Dias et al., (2019) la técnica de RAPDs como una herramienta auxiliar en la caracterización de la taxonomía de hongos, permitió ampliar el conocimiento de este patógeno y sumar una característica molecular a lo morfológico, determinando la taxonomía de este género.

En coincidencia con Dias et al., (2019) el sistema de marcadores moleculares (RAPDs) fue capaz de establecer un alto grado de similitud entre y dentro de las poblaciones (aislados) de *Colletotrichum spp* y las especies *C. truncatum* y *C. gloeosporioides*, lo que permitió orientar la búsqueda y determinar fuentes de resistencia en el germoplasma de *Glycine max*.

1.5 CONCLUSIONES

- ✚ Los patógenos fúngicos *Fusarium* spp y *Colletotrichum* spp. fueron los géneros más relevantes aislados de plantas y restos de cosecha de soja y maíz en la región pampeana, dando los mayores registros en la provincia de Santa Fe.
- ✚ Se determinó morfológica y molecularmente la presencia de tres especies de *Colletotrichum* sp. causales de Antracnosis: *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* en el hospedante soja, *C. graminicola* en maíz, *C. gloeosporioides* en mandarina y *C. truncatum* en alfalfa.
- ✚ Estas tres especies del género *Colletotrichum* causales de antracnosis (*C. truncatum*, *C. gloeosporioides* y *C. graminicola*), validadas morfológica y molecularmente, están distribuidas en las provincias de Santa Fe, Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos.
- ✚ Los conidios de *C. truncatum* obtenidos de variedades de soja, fueron curvos, delgados, no tabicados redondeados en el extremo y más largos que los descritos por la mayoría de los autores.
- ✚ La especie *C. graminicola* de hospedante maíz, proveniente de la región núcleo, presenta conidios menores a los informados por Manandhar y Hartman (1999), con forma de hoz y media luna.
- ✚ En el aislado AC13 proveniente de maíz descrito morfológica y molecularmente. se identificaron los dos tipos de conidios, falcados y ovalados, en concordancia con Sukno (2008).
- ✚ La técnica de RAPDs y la secuenciación de los fragmentos amplificados con cebadores ITs sirvieron como herramientas auxiliares que fortalecieron y validaron la identificación realizada por marcadores morfológicos, expresando la plasticidad fenotípica de los patógenos.

Capítulo 2

Caracterización de las interacciones entre cultivos y el complejo *Glomerella* /*Colletotrichum* y detección de fuentes de resistente a la enfermedad

Sección I: Soja

Objetivo Específico

Caracterizar el comportamiento (avirulencia/virulencia) de los diversos aislados del complejo fúngico y la reacción (resistencia/susceptibilidad) de los hospedantes en base a la observación fenotípica, e identificar fuentes de resistencia a la enfermedad en los cultivos evaluados.

I 2.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de la soja (*Glycine max* (L.) Merr) ha sufrido importantes cambios en la expansión del área cultivada y crecimiento sostenido de la producción e industrialización que lo convirtieron en un recurso relevante para la economía argentina (Rossi, 2006). Santa Fe es la tercera provincia en importancia, detrás de Buenos Aires y Córdoba, con el 17,5% de la superficie sembrada, el 22 % de la producción y un rendimiento promedio de 3.200 kg/ha (Ybran et al., 2016), que además concentra una moderna infraestructura para la industria aceitera con 16 puertos en los 200 km en torno a la ciudad de Rosario (33° Lat. Sur) a partir de los cuales, el grano y/o sus subproductos son exportados a diferentes destinos (Rossi, 2006).

El 75 % del volumen producido a nivel nacional es transportado a este polo agro-industrial, que se ha constituido en una de las zonas portuarias exportadoras de soja más importante del Mercosur y el mundo (Pontón et al., 2006).

La soja es el cultivo más importante en Argentina con enfermedades tardías causadas por *Septoria glycines* (Mancha marrón), *Cercospora kikuchii* (Tizón de la hoja y mancha purpura en semillas), *Phomopsis sojae* (Tizón de la vaina y tallo) *Colletotrichum destructivum* y *C. truncatum* causantes de la antracnosis, que en conjunto constituyen el complejo conocido como enfermedades de fin de ciclo (EFC) los que causan un daño promedio de 10 % con un máximo de hasta 30% en el rendimiento del cultivo (Carmona et al., 2014).

En su interacción con este cultivo, el complejo *Glomerella-Colletotrichum* (G/C) comprende un estado sexual y un estado asexual, en términos generales, el estado sexual aporta

a la variabilidad genética y el estado asexual, es responsable de los ciclos secundarios y de su diseminación. La recombinación sexual en la mayoría de especies de este género es poco frecuente en la naturaleza y a la fecha solo 11 de 20 especies, tienen como teleomorfo a *Glomerella* (Wharton y Diaguez, 2004; Santacruz Delgado, 2013).

La enfermedad puede presentarse en todos los estadios del cultivo produciendo el atizamiento u oscurecimiento de tallos y vainas, con pequeños canchales en pecíolos y cotiledones, enrollamiento de láminas foliares y defoliación prematura. El signo característico de la enfermedad en su fase asexual (*Colletotrichum* spp.) es la presencia de acérvulas distribuidas en forma irregular y no alineada sobre los tallos, que es empleada en el diagnóstico de la enfermedad y lo diferencia de otras EFC (Armstrong et al., 2006; EMPPO, 2004; Manandhar y Hartman, 1999). Las dos especies más frecuentemente asociadas al cultivo de soja son *Colletotrichum truncatum* (Schwein Andrus y W.D Moore) (Teleomorfo: *Glomerella truncata* spp nov) (Armstrong-Cho y Banniza, 2006). y *C. destructivum* O'Gara (*Glomerella glycines*, Lehman y F.A. Wolf).

Esta patología afecta diversas especies vegetales de las familias *fabaceae* (*Vicia faba* L) (Buchwald et al., 2004), *poaceae* (Gramíneas) (Casela et al., 2001), *solanaceae* (*Capsicum* spp) y *rosaceas* (*Fragaria ananassa*) entre otras. Este complejo de hongos hemibiótrofos muestra amplia diversidad genética inter e intraespecífica (Buchwald et al., 2004) promoviendo la formación de razas fisiológicas al interactuar con diferentes genotipos de un mismo o diferente hospedante (Von Arx et al., 1970; Domsch et al., 1980; Prusky et al., 2000; Buchwald et al., 2004). La promoción de la aparición de nuevas razas de los patógenos fúngicos e infecciones en nuevos hospedantes constituye un riesgo epidemiológico permanente. El conocimiento de las estrategias desarrolladas por los patógenos durante sus ciclos biológicos y de las reacciones de defensa involucradas en la resistencia inducida (Hammerschmidt et al., 1999), permiten seleccionar y aplicar alternativas de control genético basadas en la búsqueda de resistencia frente a cepas del hongo causante de antracnosis de diferente origen u hospedantes, resultando éstas más efectivas y sustentables.

En el caso de *C. truncatum*, su infección se presenta en las partes aéreas de las plantas en cualquier etapa de crecimiento, pero los síntomas generalmente aparecen durante las etapas iniciales de la plántula o la etapa reproductiva tardía y en la senescencia. La infección permanece latente durante las etapas vegetativas, pero afecta el grado de establecimiento de las

plantas, los rendimientos y la calidad de la semilla a cosecha. En cuanto a la patogenicidad, Mahmaood et al. (1992) reportaron la presencia de esclerocios, estructura de resistencia, formados por *C. truncatum*. La producción de esclerocios permite que el hongo habite en los residuos del suelo y de los cultivos en una forma más resistente que los micelios. Por lo tanto, la epidemiología de la antracnosis puede ser más complicada de lo expuesto hasta el presente.

Por otro lado, se considera que las semillas y los residuos de cosecha son las principales fuentes de infección por *Colletotrichum* spp. La pérdida económica se correlaciona con el porcentaje de vainas infectadas con antracnosis (Chen et al., 2006).

Respecto a *C. destructivum*, el peritecio del teleomorfo *Glomerella glycines* (estado al que se hace referencia en la nomenclatura binomial) se encuentra con frecuencia en los campos de Argentina, lo que indica que el mecanismo sexual es una importante fuente de variabilidad en las poblaciones de esta especie. Sin embargo, la recombinación sexual en la mayoría de las especies de *Colletotrichum* spp es observable esporádicamente (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004; Hyde et al., 2009; Ramos et al., 2013).

La reproducción sexual ocurre con poca frecuencia en las especies de *Colletotrichum* spp y para la mayoría de las especies el teleomorfo aún no se ha descrito en la naturaleza. La reproducción sexual en el caso de *Colletotrichum lentis* puede inducirse con éxito en condiciones de laboratorio, pero nunca se ha informado su presencia en el campo, aunque *C. lentis* es una especie sexual en condiciones de laboratorio, pero no se obtuvieron registros de la presencia de la fase sexual en el lote, sigue siendo un evento no hallado aún. La estructura de la población y la presencia de reproducción sexual en el campo varían entre las especies de *Colletotrichum* spp. *C. gloeosporioides* es una especie sexual en algunos hospedantes, lo que ha llevado a altos niveles de diversidad genética en algunas de sus poblaciones (Weeds et al., 2003), pero este patrón es poco común en el género *Colletotrichum*. *C. graminicola* del sorgo (syn. *C. sublineola*) es una especie para la cual se obtuvo un teleomorfo in vitro pero no se considera que juegue un papel en el campo. (Mennat et al., 2016; Armstrong – Cho et al., 2006).

C. truncatum y *C. destructivum* son patógenos altamente variables en Argentina; Sharma (2009) informó de un alto grado de variabilidad entre diferentes aislados de *C. truncatum* estudiados mediante análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs).

El objetivo del siguiente capítulo fue caracterizar el comportamiento (avirulencia/virulencia) de los diversos aislados del complejo fúngico y la reacción

(resistencia/susceptibilidad) de los hospedantes en base a la observación fenotípica, e identificar fuentes de resistencia a la enfermedad en los cultivos evaluados.

I 2. 2 MATERIALES y MÉTODOS

I 2.2.1 Ajustes metodológicos. Aplicación del 3° Postulado de Koch

Para cumplimentar la caracterización patogénica se realizaron ajustes metodológicos que permitieron evaluar las condiciones ambientales conducentes a la expresión de la enfermedad, los mismos se efectuaron en cámara de crecimiento (Fig I 2 – 1 a) y/o condiciones de invernadero (Fig 2I – 1 b).

Material vegetal

En el experimento preliminar se utilizó el cultivar (cv) comercial DM 4870, el mismo se condujo desde siembra hasta la etapa V₃ (3° nudo con 2° hoja trifoliada totalmente expandida y 3° hoja trifoliada con el borde de sus folíolos sin tocarse) (Fehr & Caviness, 1977) en una cámara de crecimiento. La misma es un habitáculo cerrado con luz blanca (fluorescente) con alternancia de 12 hs luz / 12 hs oscuridad y control de temperatura en un rango promedio de 20 - 30 °C (Fig I 2 – 1a). El diseño de experimento fueron macetas de 1 Litro (L) conteniendo una mezcla de partes iguales de tierra y arena, ubicándose 2 a 3 semillas por maceta. Luego las plantas fueron trasladadas a invernadero cerrado con control de temperatura y aireación (Fig I 2 – 1b.).



Fig I 2 – 1: a) plantas de soja a inocular e inoculadas en la cámara de crecimiento b) Bandejas con los genotipos de soja preparados para ser noculados en invernadero.

a) Recolección del inóculo: Material fúngico

Los aislados de *Glomerella /Colletotrichum* (G/C) fueron obtenidos de porciones de tallos de soja con síntomas de antracnosis (Fig I 2- 2) o bien de la colección fúngica obtenida en el Capítulo 1.



Fig I 2– 2: Tallos de soja con síntomas de antracnosis, se observa la presencia de acérvulas (flecha), signo de la enfermedad.

Se utilizó la misma colección fúngica usada para evaluar maíz (Sección: II, Capítulo: 2). La colección fúngica se obtuvo a partir de tallos con síntomas de antracnosis, cuyos hospedantes fueron: soja, familia fabaceae (punto 1.2.1) y maíz, familia poaceae, especies no cereales como *Citrus reticulata* (mandarina) y *Medicago sativa* (alfalfa) en producción, obtenidos de la región agrícola que abarcó las provincias de Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y Buenos Aires, con características bio-ecológicas diferentes y ya descritos en el Capítulo 1, Tabla 1 - 6.

A este grupo de aislados se los multiplicó y mantuvo en tubos de ensayo con APGA en plano inclinado (Fig I 2 - 3) hasta su uso.

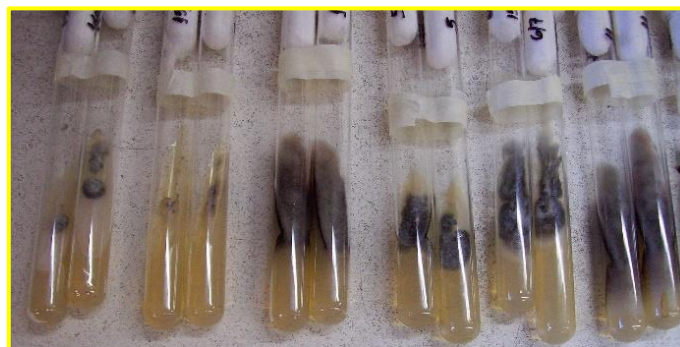


Fig I 2– 3: Colección de aislado de *Glomerella/Colletotrichum* en tubos con medio de APGA.

En esta etapa preliminar y ajuste metodológico se utilizó aislados de G/C, para ser inoculados en el genotipo DM 4870 (Tabla 1 – 6), a esta colección se le incorporaron nuevos materiales, formando una colección de aislados de G/C (Tabla 1-7) validados morfológicamente (Tabla 1- 8).

b) Inoculación: ubicación y forma

Las inoculaciones se realizaron en el estado V₃, cuando las plantas mostraban dos hojas trifoliadas totalmente expandidas. Las mismas se realizaron a través de una herida superficial con aguja delgada en la axila de la hoja unifoliada a partir del 1° entrenudo, donde se ubicó una pequeña porción de micelio fúngico (2 mm²), y se cubrió con vaselina para evitar deshidratación. Luego de las inoculaciones, el experimento se continuó en el invernadero, en condiciones controladas de temperatura, entre 24 – 29 °C (Incremona et al., 2009).

c) Evaluación

Al finalizar los 30 días pos inoculación (dpi) y a fin de cumplimentar el 4° postulado de Koch, se cosecharon entre 4 y 6 porciones de tallos inoculados tanto sintomáticos como asintomáticos / interacción planta patógeno (IPP), se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, se enjuagaron con agua estéril y orearon sobre papel absorbente. Para la confirmación del agente causal y las pruebas de patogenicidad fueron sembradas en APGA hasta desarrollar colonias de G/C (Pioli, et al; 2003). La unidad experimental fue de 4 a 6 porciones de tallo por placa.

El ajuste metodológico se realizó con el objetivo de observar el comportamiento del genotipo de soja utilizado en este experimento preliminar, determinar la sintomatología externa o expresión fenotípica de la enfermedad; la respuesta o su reacción de resistencia/susceptibilidad y la expresión de avirulencia/virulencia de los aislados fúngicos evaluados.

La evaluación de la enfermedad se realizó a través de la observación de la reacción del cultivar inoculado y se cuantificó a través de las siguientes variables.

Incidencia (I %): número de plantas necrosadas sobre el número total de plantas evaluadas por 100 (% PE).

Severidad (S %): sumatoria del área necrosada sobre el número total de plantas evaluadas.

En esta etapa de ajuste metodológico, para realizar las estimaciones de S % se utilizó la Escala de severidad de Nash y Jansen (1973) con 5 grados de porcentaje de severidad de los síntomas de antracnosis (S %) de tejido enfermo: 1: planta sana (0%); 2: planta verde con síntomas de color violáceo- grisáceo (1 a 20%); 3: planta seca con entrenudos grisáceos claro (20 a 40%); 4: planta seca, grisácea con 2 - 3 entrenudos con atizonamiento oscuro (sintomatología característica en antracnosis) (40 a 60%); 5: planta seca, grisácea con 4 - 5 entrenudos con atizonamiento oscuro (antracnosis) (60 a 100%) (Nash y Jansen, 1973).

Las reacciones de I % y S % en cada una de las interacciones de los aislados de *Glomerella/Colletotrichum* por el genotipo de soja evaluado, fueron registradas cada 10 días posteriores a la inoculación (dpi) y hasta finalizar el ciclo de cultivo. Para evaluar la expresión de la enfermedad e implementarlo en las nuevas inoculaciones y evaluaciones (Tabla I 2 - 1).


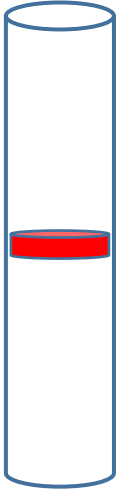


La variable calculada fue la siguiente:


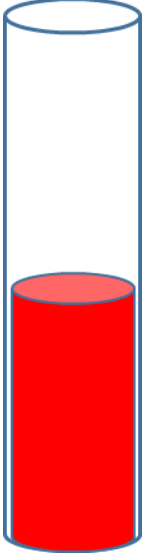

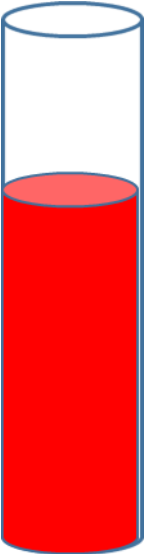

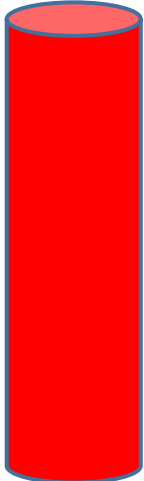
Incidencia de entrenudos (IE %) = (nº de secciones de entrenudos necrosados por un hongo por el nº total de secciones de entrenudos de cada tallo y por tratamiento evaluado) x 100.

Se presentó una propuesta de *Escala de severidad adaptada de Colletotrichum* spp.

Severidad % o área sintomática en cada entrenudo (SE%) Escala de 5 grados: sano; hasta 25; 50; 75 y 100% de área con síntomas de antracnosis: se confeccionó una escala, tomando como base la escala de Nash y Jansen (1973), la cual fue modificada para la evaluación de *Colletotrichum* spp en tallos de soja. La misma está basada en el porcentaje (%) de tejido afectado (severidad), con 5 grados: 1 entrenudo sano con atizonamiento (oscurecimiento) circunscripto al punto de inoculación (0%); 2 hasta 25 % de área con síntomas de oscurecimiento; 3 hasta 50 % de área con síntomas de antracnosis; 4 hasta 75 % de área con síntomas de antracnosis; 5 hasta 100% de área con síntomas de antracnosis (Tabla I 2 -1) (Incremona et al., 2013).

Tabla I 2 – 1: Escala con 5 grados de severidad propuesta para cuantificar antracnosis en soja.

GRADO	SIGNIFICADO	IMAGEN TALLO	ESCALA
1	sano con atizonamiento circunscripto al punto de inoculación		
2	hasta 25 % de área con síntomas de antracnosis		

3	<p>hasta 50 % de área con síntomas de antracnosis</p>		
4	<p>hasta 75 % de área con síntomas de antracnosis</p>		
5	<p>hasta 100 % de área con síntomas de antracnosis</p>		

Con la variable IE% se realizó un Anova factorial para aislados *Glomerella* /*Colletotrichum* por el genotipo de soja. Los datos fueron usados transformados con $\sqrt{x+1}$ y sin transformar según correspondió (Incremona et al., 2009a).

I 2.2.2 Aplicación del 3° Postulado de Koch

Para la aplicación del 3° postulado de Koch se utilizó el genotipo susceptible de soja, DM 4870. Se utilizaron macetas con un volumen de 4 L conteniendo una mezcla de partes iguales de tierra y arena, donde se sembraron entre 5 a 6 semillas. Posteriormente, se inocularon un total de 4 plantas por maceta con los aislados descritos en la Tabla 1 - 6. El diseño utilizado fueron 4 repeticiones por cada **i**nteracción **p**lanta-**p**atógeno fúngico (IPP); con un total de 16 plantas por interacción. Las inoculaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, las mismas se efectuaron en el tallo simulando la penetración natural que usualmente es por heridas en la zona de inserción de los pecíolos foliares. Para ello, se generó una única herida con aguja delgada (tipo tuberculina) o con tip de micropipeta (0,1 a 10 μ l) en la axila de la hoja unifoliada, depositándose en la misma una gota de 5 μ l de una suspensión de micelio y conidios (1.10⁵⁻⁶ conidios por μ l) ajustado en hematocitómetro. Las inoculaciones se efectuaron en el estadio fenológico V₃ (Fig. I 2 - 4 a, b). Este método de inoculación difiere a lo presentado por Chongo et al. (1999) donde inóculo a las 4 semanas de edad con 5-6 mL de suspensión conidial usando un atomizador añadiendo Tween 20 (monolaurato de sorbitán de polioxietileno) como agente humectante (Chongo et al., 1999).

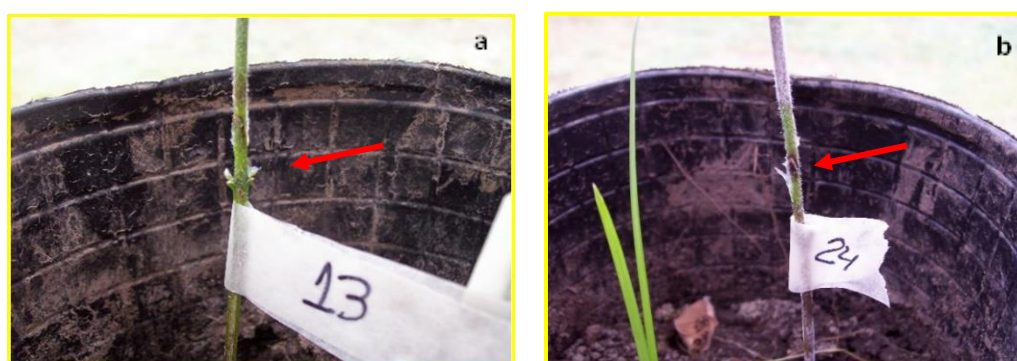


Fig I 2 - 4: a: planta de soja inoculada con el aislado AC13, se observa el comienzo de la expresión de la enfermedad; b: planta de soja inoculada con el aislado AC 24. La flecha roja indica punto de inoculación.

En el experimento se incluyeron plantas testigo no inoculadas, a las mismas se les realizaron las heridas en la porción del tallo con agujas estériles sin inóculo. La totalidad de las

plantas fueron mantenidas en ambiente con alta humedad relativa durante las 24 hs posteriores a la inoculación.

Las reacciones fueron evaluadas semanalmente en base a la expresión de síntomas, hasta obtener un valor final de progreso de la enfermedad a los 30 días posteriores a la inoculación (dpi) (Incremona et al., 2009).

Los datos fueron analizados por análisis de la variancia (ANOVA) factorial basado en: 4 bloques por 10 aislados de G/C por 4 individuos o plantas y la variable porcentaje (%) de severidad de los síntomas de antracnosis evaluado para cada entrenudo del tallo (SE %).

Al finalizar el período de evaluación de 30 dpi y a fin de cumplimentar el 4° PK, se cosecharon entre 4 y 6 porciones de tallos inoculados tanto sintomáticos como asintomáticos por cada IPP, se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de Na 1 %, se enjuagaron con agua estéril y orearon sobre papel absorbente. Luego fueron sembradas en APGA hasta desarrollar colonias de G/C, confirmando el agente causal y las pruebas de patogenicidad.

I 2.2.3 Siembra, inoculación y cuantificación en el 1° año de experimentación

En este 1° año, la caracterización de la avirulencia / virulencia de las cepas en estudio y la metodología utilizada en la inoculación y evaluación permitió diferenciar las reacciones de resistencia / susceptibilidad de los genotipos utilizados.

a) Material biológico vegetal

Los genotipos de soja usados fueron el cultivar (cv) Corsoy 79 citado como susceptible (S) a *C. truncatum* (Khan & Sinclair, 1992), el 155 (PI 95860) reconocido como de buen comportamiento o resistente (R) a antracnosis (Devine, TE y BH Breithaupt, 1981) y un cultivar comercial DM 4870 utilizado en estudios previos de ajuste metodológico. Se sembraron 3 semillas por macetas de 15 cm de diámetro (1 litro) conteniendo una mezcla con una proporción de 2:1 partes de tierra y arena (Incremona et al., 2013). El experimento se realizó en el sector de Fitopatología de la Facultad de Cs Agrarias, ubicado en el Campo Experimental “J. F. Villarino” (Zavalla) (Fig I 2 – 5 a,b).



Fig I 2 - 5: **a:** invernadero de vidrio donde se realizó la siembra e inoculaciones de los genotipos de soja con los distintos aislados; **b:** plantas de soja inoculadas en macetas.

b) Material biológico fúngico

Como material biológico fúngico en este 1° año de experimentación se seleccionaron y utilizaron los aislados AC1, AC6, AC13, AC16, AC24 y AC32 de G/C (Tabla I 2 – 2) a partir de la última colección fúngica (Tabla 1 – 7); quedando conformado un grupo de 6 aislados, validados morfológica y molecularmente, de diferente procedencia bio-ecológica y virulencia. Los aislados se multiplicaron en placas con APGA y se conservaron en tubos cubiertos con vaselina estéril (Pioli et al.; 2003) (Tabla I 2– 2; Fig. I 2 - 6).

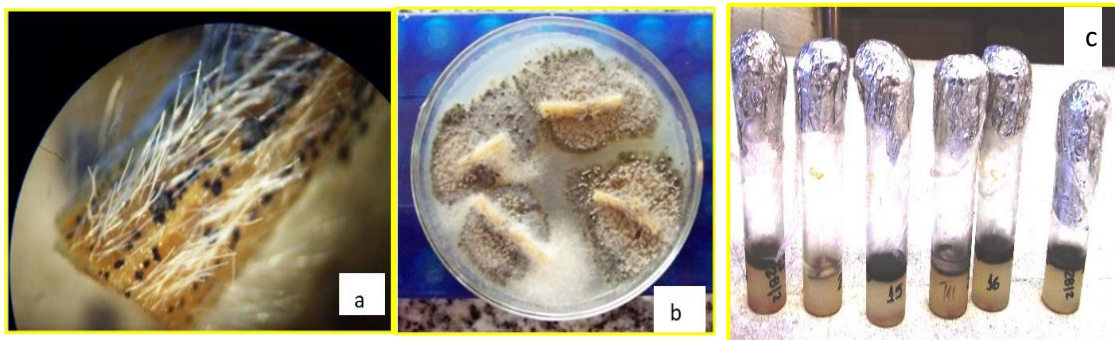


Fig I 2 – 6: **a:** Tallos de soja obtenidos de las distintas regiones sojeras y maiceras con síntomas de atizonamiento y acérvulas (signo); **b:** aislados que se multiplicaron en APGA; **c:** cultivos puros de aislados de *Colletotrichum* spp.

Tabla I 2 - 2: Aislados de *Glomerella /Colletotrichum* inoculados en soja con el detalle de hospedante y procedencia agroecológica.

Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp (AC)	Procedencia Agroecológica	Hospedante aislado	~ Identificación por marcadores morfológicos
AC 1	Pergamino (Bs As)	Maíz	<i>C. graminicola</i>
AC 6	Bombal (Sta. Fe)	Maíz	<i>C. graminicola</i>
AC 13	Elortondo (Sta. Fe)	Maíz	<i>C. graminicola</i>
AC 16	Banderoló (Bs As)	Soja	<i>C. truncatum</i>
AC 24	Helvecia (Sta. Fe)	Mandarina	<i>C. gloeosporioides</i>
AC 32	Firmat (Sta. Fe)	Soja	<i>C. gloeosporioides</i>

c) Inoculación: ubicación y forma

Las inoculaciones se realizaron de manera similar a las realizadas en el ajuste metodológico, (I 2.2.1) (Incremona et al., 2013). Luego de las inoculaciones, el experimento se continuó en el invernadero, en condiciones controladas de temperatura, entre 24 – 29 °C (Incremona et al., 2009).

d) Evaluación

La reacción de la enfermedad fue evaluada y cuantificada semanalmente en base a la expresión de los síntomas de antracnosis observados en los entrenudos del tallo de soja, al finalizar el ciclo del cultivo. Los parámetros utilizados fueron: IE % y SE%. Las reacciones fueron evaluadas semanalmente, donde se estimaron 4 entrenudos de cada tallo principal de planta y los valores de SE % se asignaron de acuerdo al área infectada de cada entrenudo, utilizándose la *Propuesta de Escala de severidad con 5 grados* (Tabla I 2 -1).

I 2.2.3.1 Aplicación de 4° Postulado de Koch

Al finalizar el período de evaluación de 30 dpi y a fin de cumplimentar el 4° postulado de Koch, se cosecharon entre 4 y 6 porciones de tallos inoculados tanto sintomáticos como asintomáticos por IPP, se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de Na 1 % v/v, se enjuagaron con agua estéril y se dejaron secar sobre papel absorbente. Luego fueron sembrados en APGA hasta desarrollar colonias de G/C y confirmar el agente causal mediante las pruebas de patogenicidad (Agris, 2005).

I 2.2.4 Siembra, inoculación y cuantificación en el 2° año de experimentación

Durante el 2° año de experimentación, se repitió en invernadero la siembra de los genotipos estudiados: cv Corsoy 79; DM4870 y cv 155, y se inocularon con las cepas de *Colletotrichum* spp utilizadas en el 1° año de experimentación (Tabla I 2-2), la metodología de inoculación fue la misma que se utilizó en el anterior ciclo de inoculaciones (1° año). Se definieron los aislados en cuanto a su virulencia, su validación morfológica y reacción de los genotipos en evaluación. En las evaluaciones de los tallos de soja se utilizaron los parámetros IE % y SE %.

I 2. 3 RESULTADOS

I 2.3.1 Ajustes metodológicos. Aplicación del 3° Postulados de Koch con los aislados obtenidos en el capítulo 1

Durante el ajuste metodológico, las inoculaciones realizadas con los aislados de *Glomerella /Colletotrichum* (G/C) (Tabla 1 – 6 del Capítulo 1 (1.3.4) a un genotipo de soja en invernadero, se logró establecer infecciones efectivas en el cultivar de soja DM 4870 seleccionado para este estudio.

Las cepas de G/C estudiadas, fueron significativamente diferentes en su virulencia ($F=5,29$; $p < 0,0001$). Los valores promedios de la SE% de cada uno de los aislados evaluados de antracnosis fueron analizados por el Test de comparación de medias LSD (Tabla I 2 - 3 y Fig. I 2– 7).

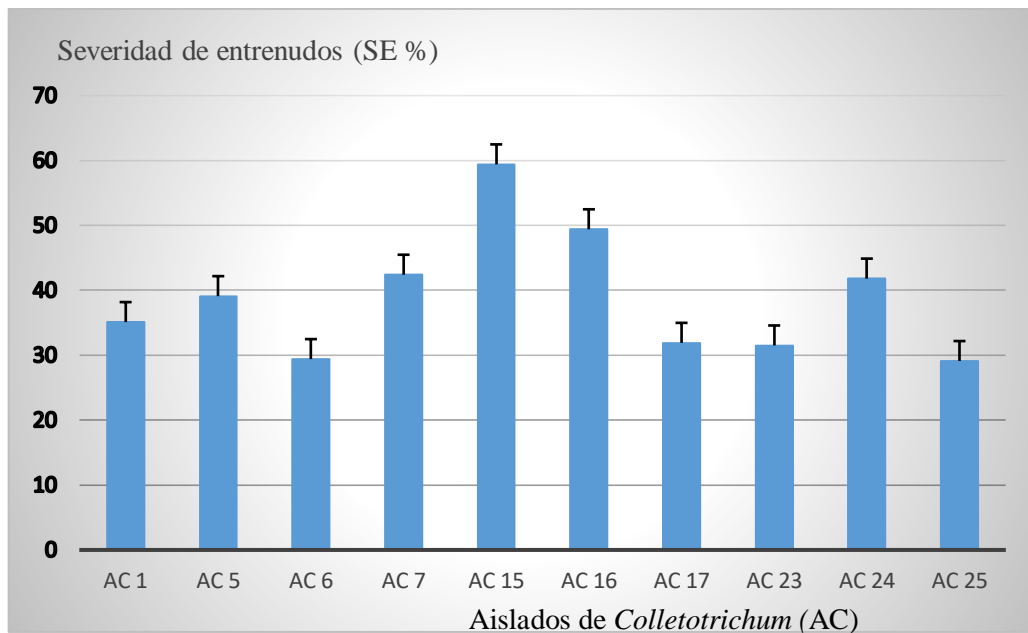
En base a los niveles de SE % de la antracnosis se pueden considerar 3 subgrupos de aislados de diferente virulencia. El grupo más virulento (49 - 59 SE%) está formado por los aislados AC15 y AC16 (*C. truncatum*) obtenidos del mismo hospedante soja pero de diferente localidad agroecológica (Córdoba y Buenos Aires). Otro subgrupo de virulencia intermedia (39 - 42,5 SE%) en soja, que está formado por AC7, AC5 (*C. truncatum*) y AC24 (*C. gloeosporioides*) los cuales proceden de 3 hospedantes diferentes (alfalfa, soja y mandarino, respectivamente) y de localidades de 2 provincias (Santa Fe y Córdoba). El tercer subgrupo de menor virulencia (29 - 35 SE%) está formado por AC1 y AC6 (*C. graminicola*), AC23 (*C. gloeosporioides*); AC17 hospedante maíz, procedente de Entre Ríos no se encontraba en la colección original y fue incorporado en esta evaluación y AC25 (*C. truncatum*) obtenidos de un hospedante cereal y leguminosa (maíz y soja), estas cepas son de diversas áreas agro ecológicas de 3 provincias (Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos) (Tabla I 2 - 3, Fig I 2 – 7).

Tabla I 2 - 3: Severidad promedio (SE %) de la antracnosis de soja producidos por cepas de diferentes especies de *Colletotrichum* spp. obtenidas de distintos hospedantes y localidades, inoculadas en soja cv DM4870.

Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp (AC)	Severidad de Entrenudos (SE %)	Hospedante y Localidad	~ Identificación por marcadores morfológicos
AC25	29,1 a	Soja, Esperanza (Sta. Fe)	~ <i>C. truncatum</i>
AC6	29,4 a	Maíz, Bombal (Sta. Fe)	~ <i>C. graminicola</i>
AC23	31,5 ab	Soja, ER	<i>C. gloeosporioides</i>
AC17	31,9 ab	Maíz, ER	~ <i>C. graminicola</i>
AC1	35,1 ab	Maíz, Pergamino (Bs As)	~ <i>C. graminicola</i>
AC5	39,1 abc	Soja, Bombal (Sta. Fe)	~ <i>C. truncatum</i>
AC24	41,8 bc	Mandarina, Helvecia (Sta. Fe)	~ <i>C. gloeosporioides</i>
AC7	42,4 bc	Alfalfa, ER	~ <i>C. truncatum</i>
AC16	49,4 cd	Soja, Chilibroste (Cba)	~ <i>C. truncatum</i>
AC15	59,4 d	Soja, Banderoló (Bs As)	~ <i>C. truncatum</i>

~ indica que la identidad de los aislados validados morfológicamente en este trabajo (Capítulo 1, Tabla 1 -8).
Referencias: Bs As. Buenos Aires ; Sta. Fe: Santa Fe; Cba: Córdoba; ER: Entre Ríos.

Figura I 2 - 7: Valor promedio de Severidad de entrenudos (SE %) de antracnosis en las cepas de G/C, utilizadas en el ajuste metodológico, referenciados en la Tabla I 2 - 3.



En la verificación y confirmación del 4° postulado de Koch, de las secciones de tejido inoculados se logró reaislar 8 de los 10 aislados de G/C, tanto de tejidos sintomáticos como asintomáticos siendo estas últimas, infecciones latentes (Klingelfuss, 2001) (Tabla I 2 - 4, Fig I 2 - 8).

Tabla I 2 - 4: Cumplimiento del 4° postulado de Koch mediante el reaislado de *Colletotrichum* spp a partir de tallos de soja inoculados e incubados en APGA.

Aislado de <i>Colletotrichum</i> spp (AC)	% de tallos positivos para el 4° Postulado de Koch
AC 5	40
AC 6	50
AC 7	100
AC 15	70
AC 16	60
AC 23	10
AC 24	100
AC 25	80



Fig I 2 - 8: **a:** plantas de soja para inocular en la cámara de luz; **b:** tallos de soja con síntomas de antracnosis, presencia de acérvulas; **c:** tallos de soja con atizomamiento; **d:** placas de APGA con tallos de soja con síntomas (izquierda) y asintomáticos (derecha).

I 2.3.2 Resultados del 1° año de experimentación

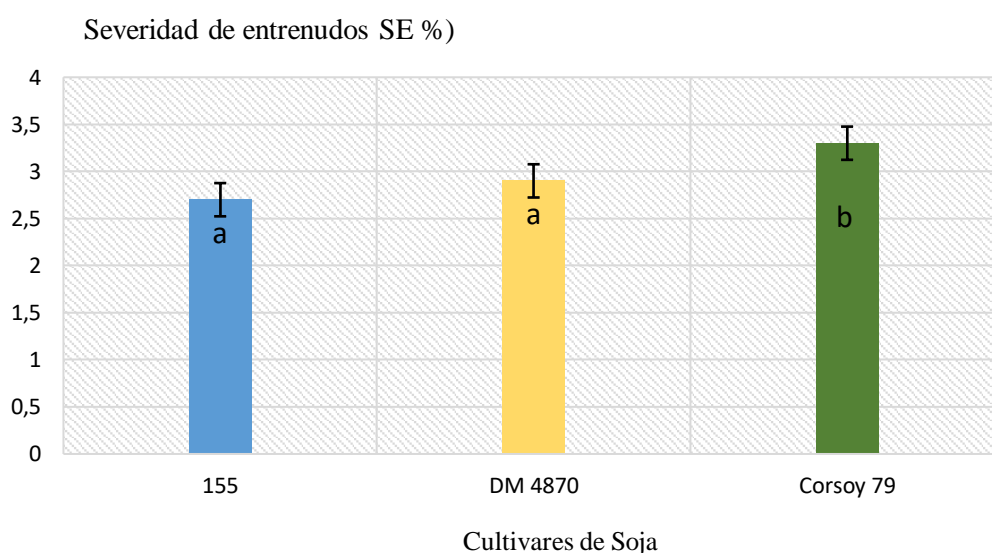
El análisis de la varianza que se observa en el Cuadro I 2 -1, se evaluó la severidad analizada en los 6 entrenudos que fueron inoculados con las 6 cepas de G/C en los 3 cultivares de soja donde se obtuvo diferencias significativas en todas las interacciones (Cuadro I 2-1).

Cuadro I 2 -1: Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I).

FV	SC	gL	CM	F	P - valor
Genotipo	93,57	2	46,79	8,60	0,0002
Aislados	200,98	5	40,20	7,39	<0,0001
Entrenudos	1608,62	5	321,72	59,14	<0,0001
Genotipo x Aislado	161,92	10	16,19	2,98	0,0010
Genotipo x Entrenudo	82,43	10	8,24	1,52	0,1281
Aislado x Entrenudo	219,93	15	14,66	2,70	0,0005
Error	7175,63	1319	5,44		

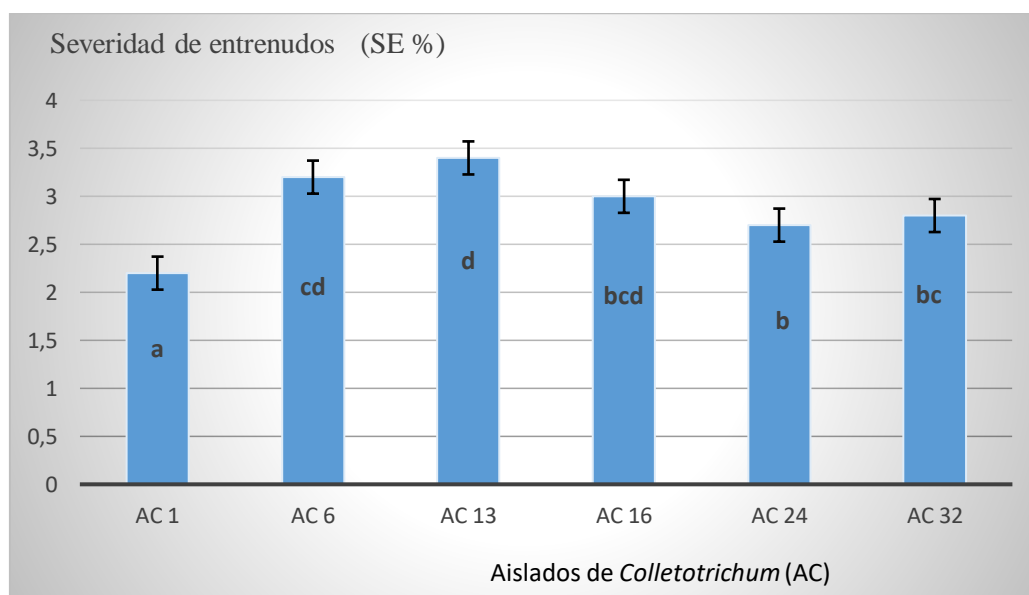
El análisis de comparación de medias se realizó por la Prueba LSD Fischer (Infostat, 2018), indicando que los cultivares Resistente y Susceptible alcanzaron mínimo y máximo valor de Severidad, respectivamente, en este análisis se evaluaron los 3 genotipos utilizados (I 2.2.3a) a través de su comportamiento en la interacción hospedante - patógeno. El cv Corsoy 79 (3,2 SE %) se comportó como susceptible, el cv DM 4870 (2,8 SE %) actuó como un genotipo intermedio y el Cv 155 (2,6 SE %) se expresó como resistente (Fig. I 2 -9).

Figura I 2 - 9: Valor promedio de Severidad de entrenudos (SE%) expresado en porcentaje de los entrenudos infectados de los cultivares estudiados: cv Corsoy 79; cv DM 4870; cv 155.



Asimismo, las cepas de G/C AC6 (3,2) y AC13 (3,4), provenientes de hospedante maíz resultaron ser las más virulentas. Los aislados AC32 (2,8), AC16 (3) y AC24 (2,7) obtenidos de hospedante maíz, soja y mandarina respectivamente, mostraron un comportamiento intermedio pero con valores altos de severidad. Finalmente, el aislado AC1 (2,2) de hospedante maíz resultó ser avirulento (Fig I 2 - 10).

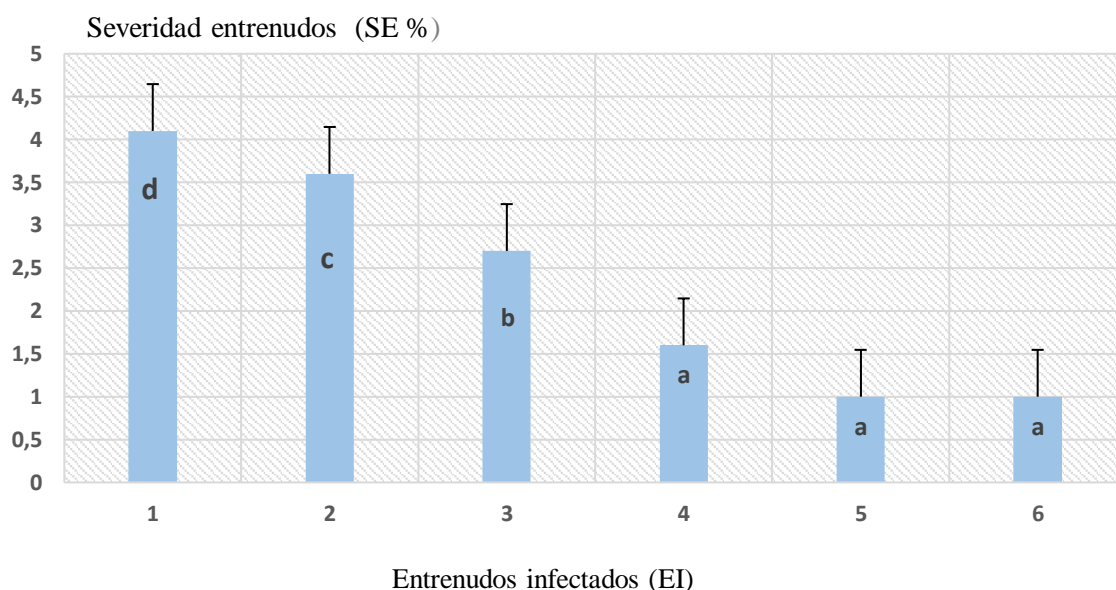
Figura I 2 - 10: Valor promedio de Severidad de entrenudos (SE %) de las cepas de *Glomerella/Colletotrichum* en los 3 cultivares cv Corsoy 79; cv DM4870 y cv155 en el 1° año de experimentación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

En cuanto a los entrenudos infectados a partir de la inoculación en la axila foliar de la hoja unifoliada, el 1° entrenudo (basal) fue el más afectado (4,1) continuando un sentido acrópeto hacia el 2° nudo (3,6) y siguiendo con entrenudos menos enfermos como el 3° y 4° entrenudo (2,7 y 1,6 respectivamente) y con valor muy bajo en el 5° y 6° entrenudo. Se observa un progreso de la enfermedad desde 1° entrenudo hacia los entrenudos superiores (Fig I 2 - 11).

Figura I 2 - 11: Valores promedios de Severidad de entrenudos (SE %) expresados en porcentaje de los entrenudos infectados con las 6 cepas de *Colletotrichum* spp (valor promedio de las cepas) en los 3 genotipos de soja.



Las interacciones entre los genotipos de soja implicados en este trabajo y su relación específica con los aislados de *Colletotrichum spp* han manifestado diferencias específicas entre ellos, donde el cv 155 con un comportamiento resistente en un 69 % de resistencia a las cepas AC13, AC16, AC32 y AC24, cuyos hospedante son maíz, soja y mandarina respectivamente y un comportamiento intermedio de las cepas AC1 y AC6. con respecto a los otros cultivares (F: 2,98, p: 0,0010)

El cv Corsoy con un desempeño susceptible se expresó coincidentemente con su comportamiento en todas las cepas de AC, excepto la AC24 con un comportamiento intermedio con respecto al Cv 155 y Cv DM4870. El Cv DM4870 comercial, expreso una respuesta resistente en los aislados AC1, AC6, AC13 y AC16, sin embargo, tuvo en los AC24 y AC32 un accionar susceptible (Cuadro I 2 -2).

Cuadro I 2 -2: Cuadro de interacciones específicas entre los genotipos de soja evaluados y los aislados de *Glomerella/Colletotrichum*.

Aislados (AC)	155	DM 4870	Corsoy 79
AC 1	2,4 bcd	1,3 a	2,9 cdef
AC 6	3,1 defg	2,8 cdef	3,5 fg
AC 13	3,2 efg	3,2 efg	3,9 g
AC 16	2,9 cdef	2,9 cdef	3,3 efg
AC 24	2,2 bc	3,1 def	2,7 cde
AC 32	2 ab	3,2 efg	3,1defg

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

I 2.3.2.1 Aplicación de 4° Postulado de Koch

Con el fin de cumplimentar el 4° postulado de Koch, luego de finalizado el período de pos inoculación, se procedió a la cosecha de los tallos inoculados sintomáticos y asintomáticos (Fig I 2-12 a), se los desinfectó y sembró en APGA hasta desarrollar colonias de G/C y confirmar el agente causal y las pruebas de patogenicidad (Fig I 2– 12 b y c).



Fig I 2 - 12: **a:** tallos se soja inoculados con el aislado AC16; **b:** siembra en APGA de los tallos de soja sintomáticos y asintomáticos pos inoculación; **c:** tallos de soja en APGA con signos y síntomas de *Colletotrichum* spp.

I 2.3.3 Resultados del 2° año de experimentación

El análisis de la varianza que se observa en el Cuadro I 2 - 3, se evaluó la severidad promedio (SE %) analizada en los 6 entrenudos que fueron inoculados con las 6 aislados de G/C en los 3 cultivares de soja donde se obtuvo diferencias significativas en todas las interacciones.

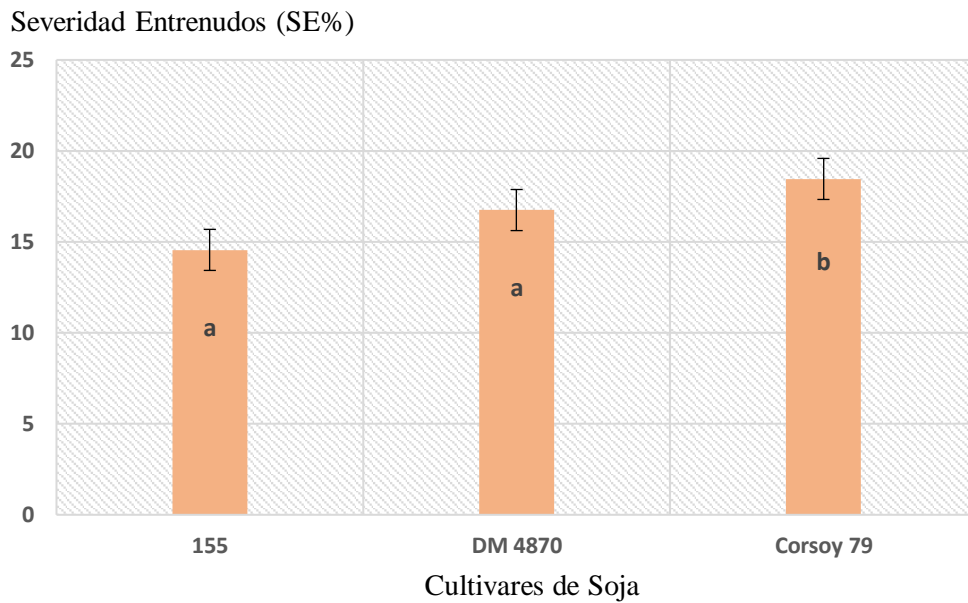
Cuadro I 2 -3: Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

FV	SC	gL	CM	F	P - valor
Genotipo	108,87	2	54,43	11,72	<0,0001
Aislados	349,88	5	69,98	15,06	<0,0001
Entrenudos	1852,12	5	370,42	79,74	<0,0001
Genotipo x Aislado	483,88	10	48,39	10,42	<0,0001
Genotipo x Entrenudo	141,85	10	14,19	3,05	0,0008
Aislado x Entrenudo	525,32	15	35,02	7,54	<0,0001
Error	6122,90	1318	4,65		

En este 2° año de evaluación se buscó reafirmar la virulencia de los distintos aislados y la reacción de los genotipos estudiados en cuanto a su carácter de resistencia y susceptibilidad.

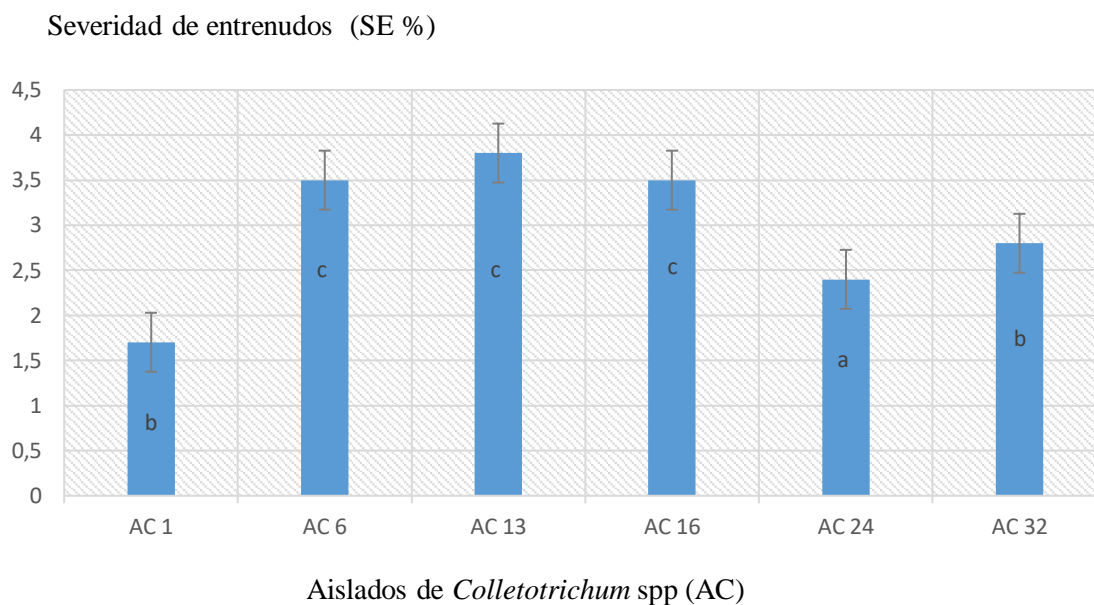
La metodología de evaluación de la interacción de los 3 genotipos de soja (resistente, comercial, susceptible) y los 6 aislados G/C seleccionados, se realizó en forma similar al 1° año de experimentación. En esta segunda evaluación de los cultivares de soja los mismos conservaron el mismo comportamiento con respecto al 1° año de experimentación, donde el Cv 155 de comportamiento resistente se comportó con 66 % de las cepas de G/C como resistente, los Cv DM4870 comercial su actuación fue entre intermedia y susceptible, el Cv Corsoy 79 tuvo un 33 % de resistencia (Fig I 2 - 13).

Figura I 2 – 13: Comparacion de los cultivares estudiados: Cv Corsoy 79; Cv DM4870; Cv 155, obtenido a traves de los valores promedios de Severidad expresados en porcentaje (SE %) de los entrenudos inoculados e infectados con *Glomerella /Colletotrichum*



En cuanto a la virulencia de las cepas de G/C inoculadas, los aislados AC13 (3,8 SE %), AC16 (3,5 SE %) y AC6 (3,5 SE %) provienen de hospedante cereal y leguminosa (maíz y soja) de las provincias de Santa Fe y Buenos Aires se expresaron con alta virulencia. Con una avirulencia el aislado AC24 (2,4 SE %) procedente de Helvecia – Santa Fe, cuyo hospedante fue mandarina. Finalmente, con un comportamiento intermedio se encontraron los aislados AC1 (2,9SE %) y AC32 (2,8 SE%) aislados de los hospedante maíz y soja, oriundos de Pergamino – Buenos Aires y Firmat – Santa Fe, respectivamente (Fig I 2 - 14).

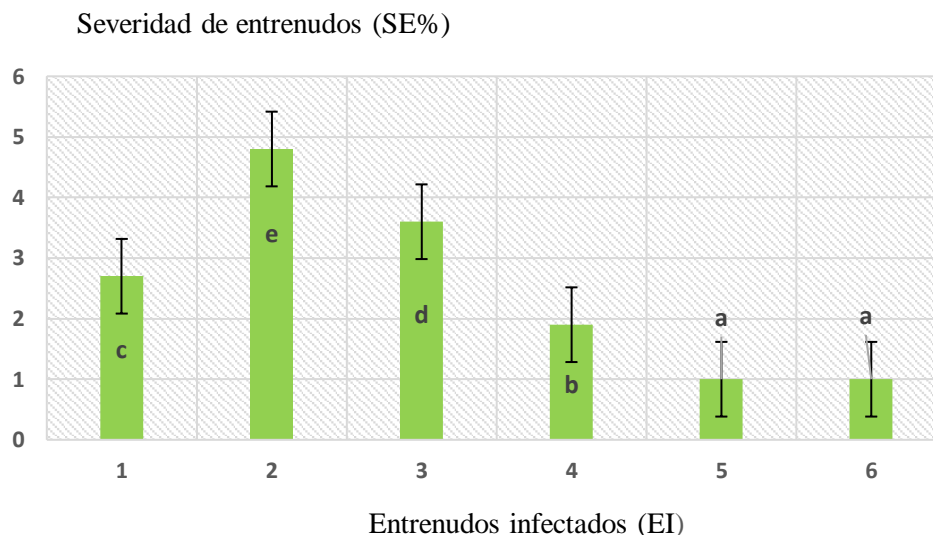
Figura I 2 - 14: Virulencia de las cepas de *Colletotrichum* spp de cada aislado: AC1, AC6, AC13, AC16, AC24 y AC32, referenciados en la Tabla 2, expresado por el valor promedio de Severidad de entrenudos (SE %) de antracnosis en los 3 cultivares (genotipos).



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Se evaluó la posición y ubicación en los entrenudos infectados con colonias de *Glomerella/Colletotrichum* en su correlación con el progreso de la enfermedad. Se mantuvo la misma relación que en el 1º año, en cuanto su sentido hacia el ápice el avance de la enfermedad, sin embargo, en este año el 2º entrenudo fue el más infectado siguiendo con el 3º entrenudo, descendiendo la presencia de antracnosis hacia el 4º entrenudo (Fig I 2 -15).

Figura I 2 – 15: Valores promedios de Severidad de entrenudos (SE%) expresados en porcentaje de los entrenudos infectados con las 6 cepas de *Colletotrichum* spp (valor promedio de las cepas) en los 3 genotipos evaluados.



En el cuadro I 2- 4 se observa la interacción específica entre los genotipos en estudio de soja y los aislados de G/C que fueron inoculados en estos cultivares, de esta interacción surgen los siguientes resultados, el cv Corsoy tuvo un comportamiento susceptible en 66% de las seis cepas evaluadas, mientras que el cv 155 actuó en un 33% de susceptibilidad en los 6 aislados estudiados, mientras que el cv comercial DM4870 tuvo un comportamiento intermedio entre moderadamente resistente a susceptible. Puede observarse que las cepas AC1, AC6, AC13 y AC16 tuvieron en este 2° año una virulencia mucho mayor en los cv Corsoy y cv DM4870, en el cv 155 las cepas con mayor porcentaje de severidad fueron AC6, AC32. En todos los genotipos el 2° y 3° entrenudo fueron los de mayor porcentaje de infección (F: 10,42; p: 0,0001).

Cuadro I 2 -4: Cuadro de interacciones específicas entre los genotipos de soja evaluados y las cepas de *Glomerella/Colletotrichum*.

Aislados (AC)	155	DM 4870	Corsoy 79
AC 1	1,9 ab	3,2 def	3,6 fg
AC 6	3,1 cdef	3 cdef	4,3 gh
AC 13	2,9 cde	3,4 ef	5 h
AC 16	2,7 cde	3,3 ef	4,5 h
AC 24	2,6 cde	2,6 bcd	1,7 a
AC 32	3,2 ef	2,8 cde	2,4 bc

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

I 2.3.3.1 Aplicación de 4° Postulado de Koch

Se efectuó el mismo procedimiento realizado en el 1 año de experimentación (I 2.- 3.2.1) para la concreción del 4° postulado de Koch en los materiales evaluados en este 2 año.

I 2.3.4 Resultados integrados de ambos ciclos experimentales

En esta etapa se evaluó el comportamiento de la enfermedad, integrando ambos ciclos agrícolas donde se evaluó las interacciones genotipo (cultivares de soja) – patógeno (aislados de *Colletotrichum* spp) expresándose las mismas por la Severidad de entrenudos (SE %) en porcentaje, evaluada en los entrenudos afectados por la enfermedad.

Los datos se analizaron mediante un ANOVA Factorial que permitió comparar 2 Ciclos de inoculación en los años agrícolas (1° y 2° año), 3 cultivares (155, DM 4870 y Corsoy 79) y 6 Aislados de *Colletotrichum* spp y 4 Entrenudos del tallo: Factorial (2x3x6x4) y sus interacciones. Complementariamente, se analizaron los años individualmente, mediante factoriales (3x6x4) para comparar comportamiento genotipos vs patógenos y sus interacciones.

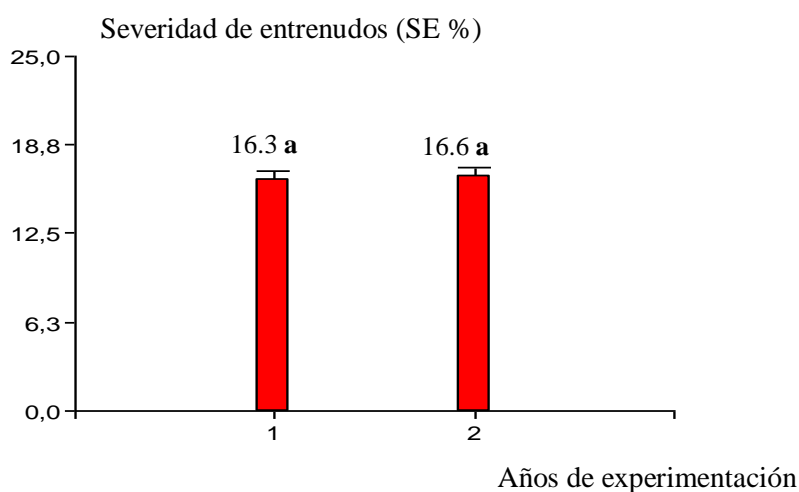
En la Fig I 2 -16 se muestra la comparación de ambos ciclos agrícolas, evaluada por los valores de Severidad% (SE%) promedio de antracnosis, expresados en porcentaje en valores promedio de los 3 genotipos evaluados. Los valores obtenidos surgen de la observación del grado de severidad de los entrenudos inoculados con las 6 cepas de *Colletotrichum* spp, los mismos fueron 16,3 y 16,6 SE %, para el 1° Año y 2° Año, respectivamente. No se observaron

diferencias entre los ciclos de inoculaciones evaluados ($F= 0.06$, $p < 0,8093$). Adicionalmente, se observaron diferencias significativas en las interacciones año x aislados fúngicos ($F= 3.91$; $p < 0,0016$) y cultivares x aislados ($F= 5,11$; $p < 0,0001$) (Cuadro I 2 – 5).

Cuadro I 2 -5: Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

FV	SC	gL	CM	F	P - valor
Modelo	2861,20	28	102,19	18,46	<0,0001
Año	48,49	1	48,49	0,06	0,8093
Cultivares	137,92	2	68,96	12,46	<0,0001
Aislados	346,48	5	69,30	12,52	<0,0001
Entrenudos	1930,13	3	643,38	116,22	<0,0001
Año x Cultivar	6,74	2	3,37	0,61	0,5443
Año x Aislados	108,29	5	21,66	3,91	0,0016
Cultivares x Aislado	283,15	10	28,31	5,11	<0,0001
Error	2861,20	28	102,19	18,46	<0,0001

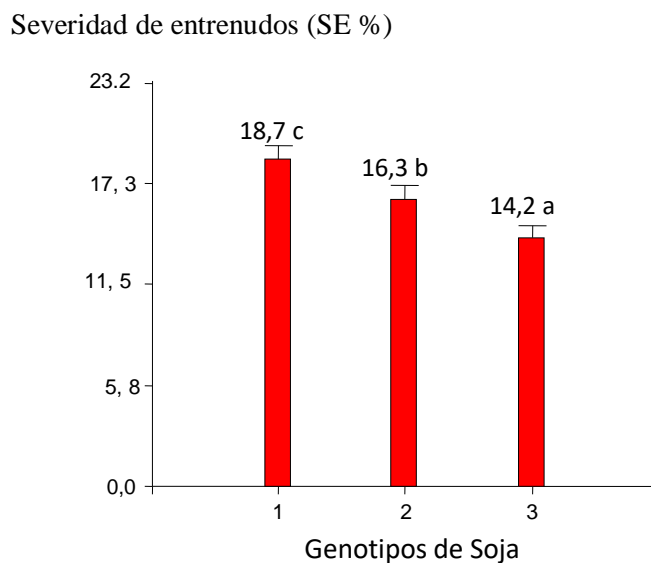
Figura I 2 -16: Severidad de entrenudos expresada en porcentaje (SE %) de antracnosis en los 3 genotipos de soja (valor promedio), inoculados con las 6 cepas de *Colletotrichum* spp en los dos ciclos evaluados.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes $p > 0,05$

En la Fig I 2 -17 se muestran los valores de SE% promedio de antracnosis registrados en los cultivares de soja utilizados, causados por 6 aislados de *Colletotrichum spp* en los dos ciclos de inoculaciones (1° y 2° año de experimentación). El cv155 resultó ser el más resistente con un valor de 14,2 SE %, el cv DM4870 con una reacción intermedia de 16,3 % SE y el cv Corsoy79 fue el más susceptible de los genotipos evaluados con valores de 18.7 SE %. Las diferencias entre los valores de SE % mostrados fueron significativas (F: 12.46; $p < 0,0001$).

Figura I 2 -17: Severidad expresada en porcentaje (SE%) de antracnosis en los entrenudos de los tres genotipos estudiados: 1: Cv Corsoy 79; 2: Cv DM 4870; 3: Cv 155.



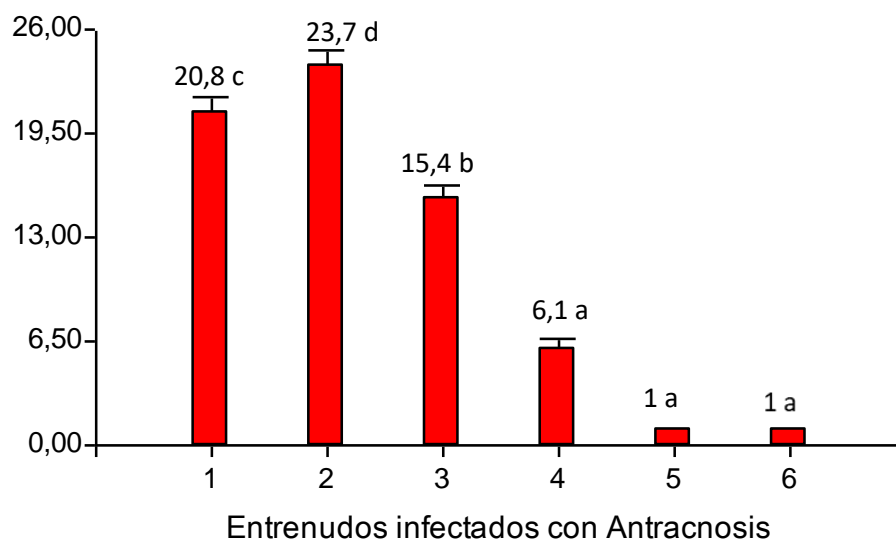
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La respuesta fenotípica resultante de la interacción de los 3 genotipos con las cepas de *Colletotrichum spp* expresada en SE % promedio, fue observada y sostenida en ambos ciclos de inoculaciones.

Complementariamente se analizó la distribución basípeta y acrópeto de la enfermedad en cuatro entrenudos del tallo, observándose diferencias significativas, ($p < 0,0001$) a partir del 2° entrenudo que se definió como punto de inoculación (PI). Las inoculaciones resultaron fenotípicamente más efectivas en el 2° y el 1° entrenudo, mostrando entre 23,7 y 20,8 SE % promedio, respectivamente. El progreso espacial acrópeto de antracnosis alcanzó niveles decrecientes que varían entre 15,4 y 6,1 SE%, para el 3° y 4° entrenudos, respectivamente. (Figura I2 -18), quedando los entrenudos superiores con valores de 1 SE % (F: 116,22, $p < 0,0001$).

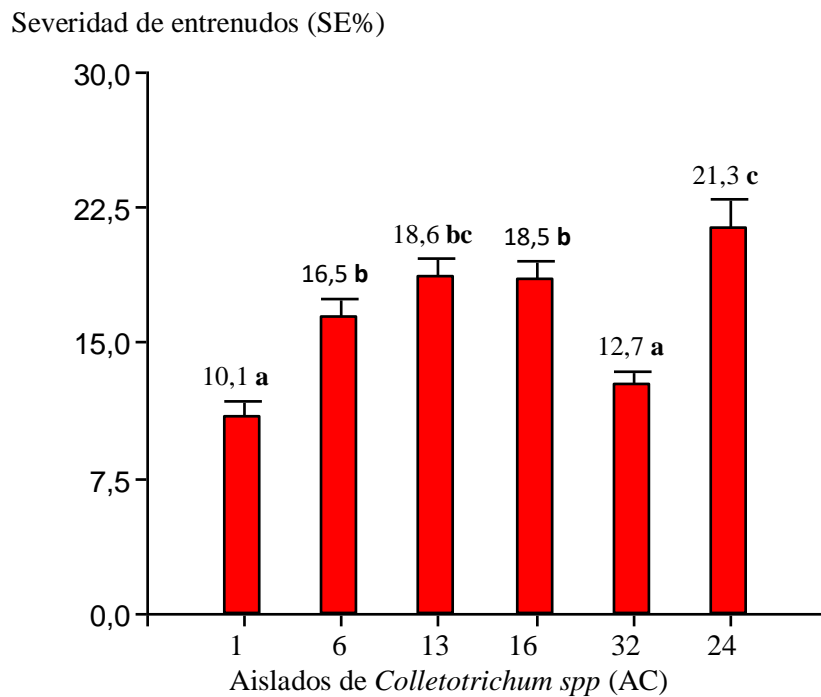
Figura I 2 – 18: Efecto de la antracnosis en los genotipos de soja, sobre los entrenudos infectados con diferentes aislados de *Colletotrichum* spp.

Severidad de entrenudos (SE %)



Los resultados observados en la virulencia de los 6 aislados de *Colletotrichum* spp inoculados en los 3 genotipos estudiados se comportaron diferencialmente. El AC1 (Hospedante: maíz, Localidad: Pergamino – Buenos Aires) y AC32 (Hospedante: maíz; Localidad Firmat - Santa. Fe) resultaron ser los aislados menos virulentos con niveles entre 10,1 y 12,7 SE% promedio respectivamente al interactuar con los cultivares evaluados. El aislado de virulencia intermedia fue el AC6 (Hospedante: maíz; Localidad: Bombal– Santa. Fe), con un valor de 16.5 SE%. Las cepas AC13 (Hospedante: maíz; Localidad: Elortondo – Santa. Fe) y AC16 (Hospedante: soja; Localidad: Banderl6 – Buenos Aires) ambas con valores de 18,6 SE% evidenciaron ser virulentas junto con el AC24 (Hospedante: mandarina; Localidad: Helvecia – Santa. Fe) aislado de una especie arb6rea y frutal, con valor con de 21,3 SE % result6 ser la m6s virulenta a partir de todas las interacciones evaluadas (Fig. I 2 - 19). (F: 12,52, p:<0,0001).

Figura I 2 - 19: Severidad de entrenudos (SE%) promedio expresada en porcentaje de antracnosis causa por la virulencia de las 6 cepas de *Glomerella/Colletotrichum*



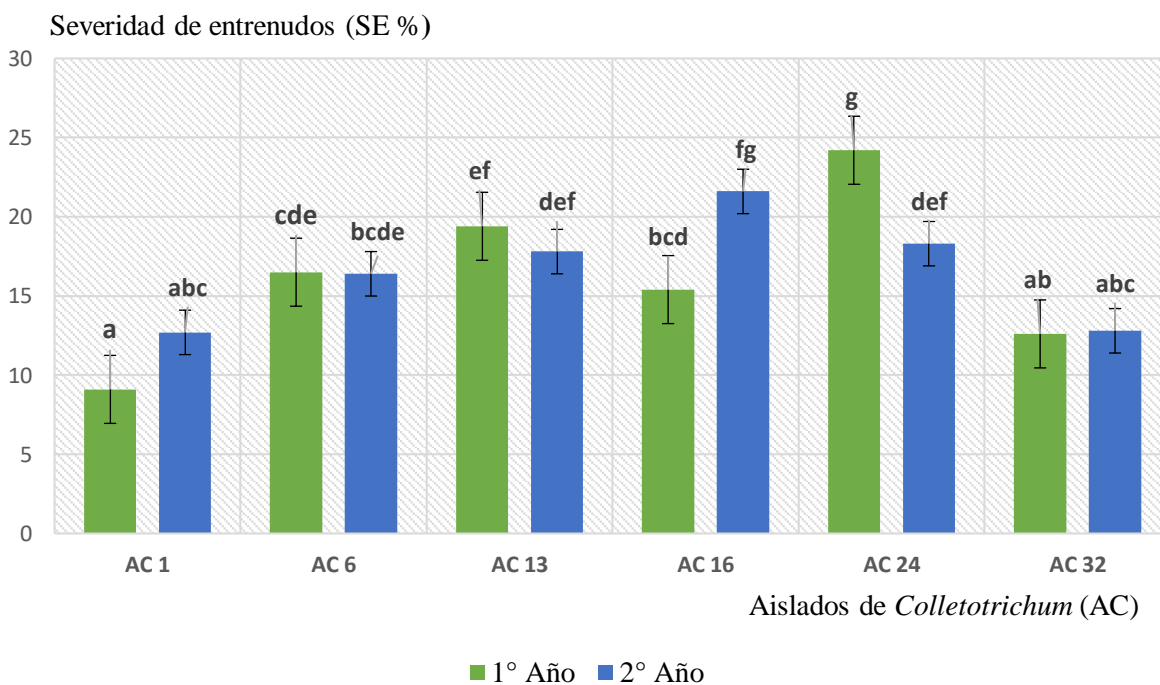
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Las interacciones registradas entre los aislados fúngicos por ambiente (años) resultaron diferenciales y/o específicas ($F: 3.91, p: 0,0016$) (Fig. I 2 -20). Las cepas AC1, AC32 mostraron los menores valores de SE % de enfermedad en los entrenudos del tallo, considerándose como avirulentos en ambos ciclos, aunque difieren su virulencia en ambos años, donde el AC1 se manifestó con un valor de 9,1 para el 1° año y 12,7 en el 2° año, mientras que el AC32 tuvo un menor valor de 12,6 SE% y 12,8 SE % en el 1° y 2° año respectivamente, observándose un incremento de la severidad en el 2° año del AC1, sin embargo en esta interacción fueron los menores valores obtenidos.

Las cepas AC6 y AC13 mantuvieron su nivel de virulencia en ambos años, aunque con niveles de 16,5 SE % para AC 6 en ambos años y de 19,4 SE %, en el 1° año y 17,8 en el 2° año para el AC13. Para el aislado AC16 se comportó de manera diferencial en ambos años, con una mayor virulencia en el 2° año con un valor de 21,6 SE % y de 15,4 en el 1° año, el AC24 también manifestó una virulencia disímil en ambos años con una severidad de 24,2 SE % y 18,3 SE % en el 1° y 2° año respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto el efecto del ambiente sobre el comportamiento fúngico. (Fig I 2 - 20). En el 1° año la interacción ambiente

por aislado muestra una virulencia mayor en las cepas AC6, AC13 y AC16 con valores entre 15,4 y 16,5 SE %; el AC24 (24,2 SE %) si bien puede considerarse dentro grupo, supero el valor de los aislados mencionados anteriormente, por lo que se considera con una virulencia mayor. Con un comportamiento bajo el AC1 y el AC32 en ambos años. En el 2° año los AC6, AC13 y AC24 tuvieron valores intermedios y con una mayor virulencia el aislado AC16 (Fig I2 - 20).

Figura I 2 - 20: Interacción aislado fúngico (6 aislados) *Colletotrichum* x ambiente (2 años), evaluado según la variable Severidad % promedio de antracnosis en los entrenudos sintomáticos del valor promedio de los 3 genotipos.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Esta interacción entre genotipo y ambiente expresó diferencias significativas (F: 0,61, p: 0,5443).

En el análisis del comportamiento de los diferentes genotipos de soja evaluados en la integración de ambos ciclos agrícolas (años), mostraron diferencias significativas. En el 1° año el cv Corsoy 79 que se manifestó como susceptible se comportó con altos valores de virulencia en ambos años. El cv DM 4870 es un cultivar comercial que tuvo un comportamiento diferencial y mayor en el 2° año, pero se mantuvo en un estado intermedio en ambos años, el cv 155 de

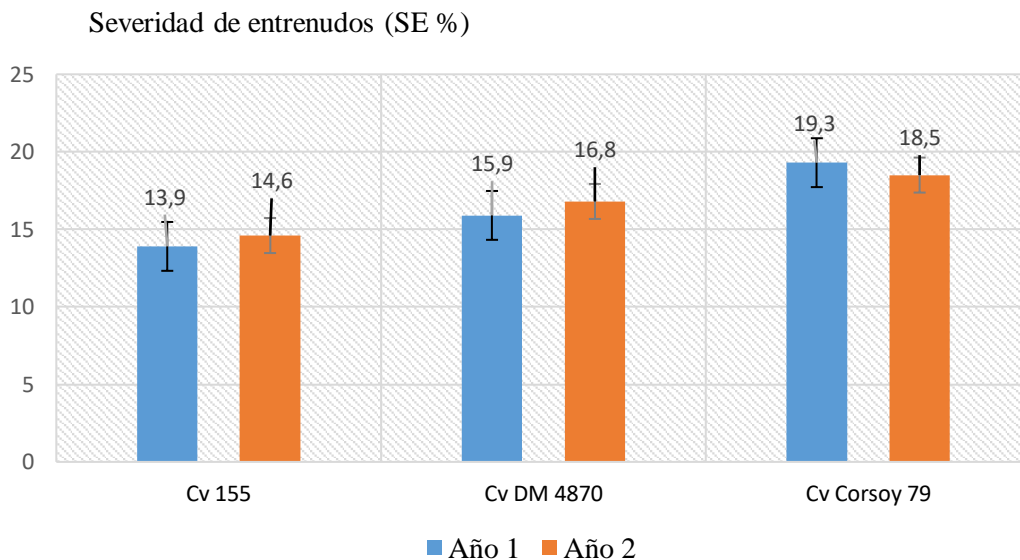
comportamiento resistente, también muestra una severidad mayor en el 2° año, pero continua su actuación como cultivar resistente frente al cv Corsoy79 (Cuadro I 2- 6; Fig. I 2 - 21).

Cuadro I 2 - 6: Cuadro de interacciones específicas entre los dos ciclos evaluados (años) y los genotipos de soja evaluados.

Años	Genotipos	medias	
1	Cv 155	13.9	a
2	Cv 155	14.6	a b
1	Cv DM	15.9	a b c
2	Cv DM	16.8	b c d
2	Cv Corsoy 79	18.5	c d
1	Cv Corsoy 79	19.3	d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Figura I 2- 21: Interacción cultivares x ambiente (2 Años), evaluado según la variable Severidad promedio de antracnosis en los entrenudos (SE %) sintomáticos de los 3 genotipos.



En las interacciones específicas entre los genotipos de soja (cv) evaluados y los 6 aislados de *Colletotrichum* spp (AC) fueron significativas ($F: 5,11$; $p: <0,0001$), en cuanto a esta interacción, se evaluó por separado cada cultivar donde:

cv Corsoy 79 considerado en su comportamiento como susceptible a la antracnosis causada por cuatro (83 %) de los seis aislados de *Colletotrichum* spp evaluados. Registró los mayores valores de SE % promedio en entrenudos: 18 a 24 %, y particularmente para cada interacción: AC6, AC13, AC16, AC24 y AC32. Sólo en la interacción de este cultivar con la cepa AC1 el cultivar se comportó como intermedio entre los Cv 155 y Cv DM 4870. (Fig I2 - 22, Cuadro I2 -7).

cv 155, señalado previamente un genotipo de buen comportamiento con un valor de 67 SE % frente a algunas cepas de *Colletotrichum* spp causales de antracnosis (Devine et al., 1981). Mostrando tres patrones de comportamiento diferenciales según las interacciones establecidas con los aislados AC. Se comportó como resistente frente a AC32, AC24 y AC16 y un comportamiento moderadamente resistente frente al AC6. Mientras que se manifestó fenotípicamente susceptible frente a la cepa AC1, mientras que el AC13 tuvo una actuación intermedia y similar en los 3 cultivares (Fig I2 - 22, Cuadro I2 - 7).

Por su parte, el **cv DM4870 comercial** resultó tener un comportamiento resistente al interactuar con AC1 que reflejó una actuación como avirulento en esta interacción, por el contrario, resultó altamente susceptible al interactuar con AC24 que se expresó como muy virulento en esta interacción. Se observa además otras interacciones donde DM4870 manifestó un comportamiento de susceptibilidad intermedia frente al resto de las cepas (Fig I2 - 22, Cuadro I2 -7).

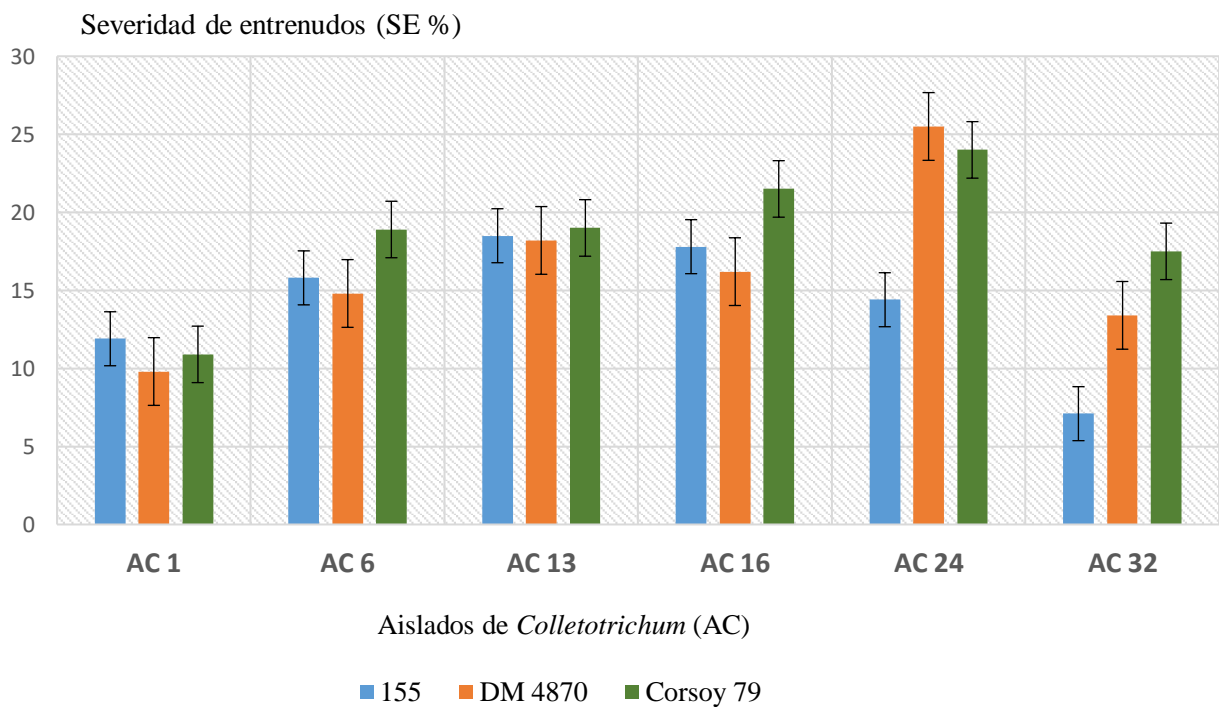
Cuadro I 2- 7: Cuadro de interacciones específicas entre los 3 genotipos de soja y las 6 cepas de *Glomerella /Colletotrichum* inoculadas.

Genotipo (cv)	Aislados (AC)	Medias	
155	AC 32	7,14	a
DM 4870	AC 1	9,84	a b
Corsoy 79	AC 1	10,97	a b c
155	AC 1	11,89	a b c d
DM 4870	AC 32	13,38	b c d e
155	AC 24	14,36	b c d e f
DM 4870	AC 6	14,76	c d e f

155	AC 6	15,78	d e f
DM 4870	AC 16	16,23	d e f
Corsoy 79	AC 32	17,52	e f g h i
155	AC 16	17,76	e f g
DM 4870	AC 13	18,24	f g
155	AC 13	18,53	f g
Corsoy 79	AC 6	18,87	f g
Corsoy 79	AC 13	19	f g
Corsoy 79	AC 16	21,54	g h
Corsoy 79	AC 24	23,88	h
DM 4870	AC 24	25,48	h

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura I 2 – 22: Valores promedios de Severidad expresada por el porcentaje (%) de antracnosis observadas en los entrenudos infectados de 3 genotipos de soja con las 6 cepas de *Glomerella /Colletotrichum*.



I 2.3.5 Primer reporte de distribución atípica de signos de *Glomerella* /*Colletotrichum*

El 10 % de los tallos inoculados presentaron acérvulas distribuidas en forma alineada y asociada a los tejidos de sostén, colénquima y esclerénquima (pared celular primaria engrosada y lignificada) (Fig. I 2 - 23 a-c). Las acérvulas fueron observadas e identificadas mediante la caracterización macro y micro-morfológica del patógeno en laboratorio. El resultado presentado aporta un dato de suma importancia en la evaluación de cultivares a campo, ya que esta distribución de las fructificaciones asexuales suele estar asociada a otra enfermedad, el Tizón de tallo y vaina causado por *Phomopsis phaseoli* var. *sojae* y *P. longicolla*, perteneciente al complejo de las enfermedades de final de ciclo reproductivo de soja.

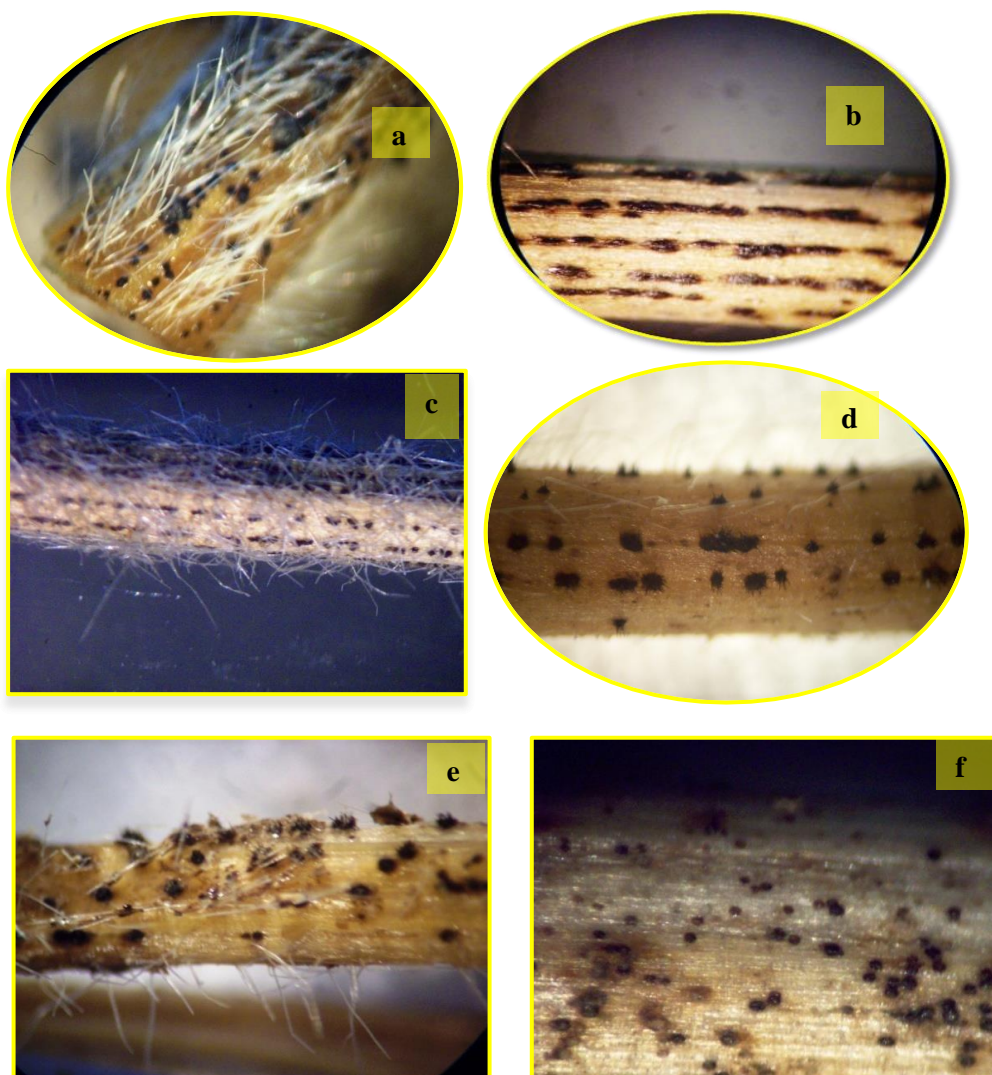


Fig I 2 - 23: a - c) Tallo de soja inoculado con presencia de acérvulas (signo de *Colletotrichum* spp) distribuidas en forma alineada; d) Acérvulas distribuidas al azar y en forma alineada; e y f: Tallo de soja inoculado con presencia de acérvulas distribuidas al azar.

I 2.4 DISCUSIÓN

Respecto a la ocurrencia de antracnosis en el cultivo de soja, varios autores (Ramos et al., 2013; Carmona et al., 2009; 2011) informaron sobre dos patógenos que están frecuentemente asociados a este cultivo, estos son: *Colletotrichum truncatum* (Schwein). Andrus & W.D Moore y *C. destructivum* O'Gara, [= *Glomerella glycines* Lehman & F.A. Wolf] causando importantes pérdidas para el país. En nuestros estudios experimentales, repetidos en dos ciclos, se aislaron los patógenos: *C. gloeosporioides*, *C. graminicola* y *C. truncatum* (grupos I y III) en el cultivo de soja corroborados morfológica y molecularmente, provenientes de hospedante maíz, mandarina y sojades diferentes regiones agroecológicas.

Los aislados provenientes de hospedante maíz y mandarina, *C. graminicola* y *C. gloeosporioides* respectivamente, fueron los patógenos que causaron mayor severidad de entrenudos afectados en los genotipos de soja evaluados

Estos resultados nos interpelan en el manejo cultural de este cultivo, principalmente en las rotaciones maíz – soja, donde la tasa de inóculo de *C. graminicola* sobre rastrojos de maíz esta latente y en crecimiento exponencial sobre el cultivo de soja, ampliando el espectro de especies de *Colletotrichum spp* que afectan al mismo. Se presenta como un primer reporte la infección de *C. graminicola* en genotipos de soja.

En este trabajo de tesis se comprobó molecular y morfológicamente la presencia de *C. gloeosporioides* en mandarina y en soja; Cabrera et al (2001) en el examen de muestras recolectadas a campo, observaron la presencia constante de *C. gloeosporioides*, pero las pruebas de patogenicidad fueron positivas solamente con la cepa de *C. truncatum truncata* en plantas de soja.

Chen (2006) comunicó que los aislados de *C. truncatum* eran más virulentos que los aislados de *C. gloeosporioides*, por confirmación fenotípica de la sintomatología típica y severidad de antracnosis. Sin embargo, en este trabajo de tesis se ha evidenciado la presencia de *C. gloeosporioides*, proveniente de los hospedantes: soja y mandarina, y *C. graminicola* del hospedante maíz, como las cepas más virulentas en la infección de los entrenudos en todos los genotipos, en ambos años agrícolas estudiados.

En cuanto a la sintomatología, se ha encontrado una alineación de las acérvulas en los tallos inoculados, aportando un dato de suma importancia en la evaluación de cultivares a

campo, donde esta distribución alineada suele estar asociada a otra enfermedad (Tizón de tallo y vaina por *Phomopsis phaseoli* var. *sojae* y *P. longicolla*), por lo tanto, es prioritario la evaluación a campo y su corroboración en laboratorio para certificar eficientemente la presencia de antracnosis.

Nuestros resultados coinciden con Khan y Sinclair (1992), con respecto a la etapa de latencia de *Colletotrichum* spp, informando que la antracnosis en soja es una enfermedad de toda la planta, donde la infección de raíz y parte aérea de la planta puede estar inicialmente latente y por lo tanto no ser advertida, en coincidencia con Sinclair (1991) ratificando estas infecciones latentes en otros hospedantes además de soja. Las plantas de soja son susceptibles a *Colletotrichum* spp en todas las etapas de desarrollo, pero los síntomas aparecen en las primeras etapas reproductivas (R₁ y R₂ escala fenológica según Fehr y Caviness) (Sinclair et al., 1991). En nuestro trabajo, la presencia de antracnosis se manifestó en etapas vegetativas, sintomática y asintóticamente, esta última etapa en forma latente, se expresó fenotípicamente al realizar los postulados de Koch, estando en coincidencia con los autores antes mencionado

Respecto de la respuesta de resistencia y/o susceptibilidad de los genotipos evaluados en los dos ciclos agrícolas, se mantiene el mismo comportamiento, calificando al cv 155 como resistente, el cv DM comercial como un genotipo intermedio y el cv Corsoy susceptible. Sin embargo, al estudiar en forma independiente cada ciclo, podemos observar diferencias. En el 1° año el cv 155 respondió en su carácter de resistente o moderadamente resistente a los aislados, mientras que en el 2° año su respuesta fue resistente a moderadamente resistente frente a 4 de los aislados estudiados, expresando un comportamiento susceptible con *C. gloeosporioides*. El ambiente considerado, uno de los factores que integran el triángulo de enfermedad, presentó condiciones de temperatura superiores a 30° C, baja humedad y precipitaciones, estas condiciones no son las preponderantes para la enfermedad, ya que el desarrollo de *Colletotrichum* spp es favorecido con temperaturas superiores a 25°C, altas precipitaciones y humedad (Hartman et al., 1999). Sin embargo, el porcentaje de severidad de entrenudos infectados fue mayor en este 2° año. Por esta razón consideramos que se ha ampliado el espectro de condiciones predominantes de la antracnosis. Otro aspecto a tener en cuenta en esta discusión, es la severidad de *C. graminicola* sobre genotipos de soja, denotando una agresividad mayor de los aislados provenientes de hospedante maíz.

En cuanto al cv Corsoy en el 2° año sólo afirmó su resistencia frente a los aislados de *C. gloeosporioides*, mientras que a *C. graminicola* tuvo una respuesta susceptible a moderadamente susceptible; por otro lado, el cv comercial DM 4870 tuvo un comportamiento intermedio en los dos ciclos agrícolas. Analizando los dos ciclos integrados, los genotipos respondieron satisfactoriamente en la evaluación de su comportamiento. En lo referido a los aislados de G/C los provenientes de maíz fueron los de mayor virulencia.

En coincidencia con Chongo et al., 2000, tanto la temperatura como el genotipo afectan significativamente la incidencia de la enfermedad; el tamaño de la lesión y la esporulación. La temperatura óptima para el desarrollo de la antracnosis en lenteja ocurre con temperaturas entre 20 - 24 ° C, independientemente del nivel de resistencia del hospedante, sin embargo, con temperaturas de 28 °C la frecuencia de las lesiones aumentó, pero con lesiones de menor tamaño. Por su parte, las temperaturas más bajas reducirían la cantidad de esporulación del patógeno, el tamaño de la lesión y la gravedad general de la enfermedad. En el presente trabajo las temperaturas medias fueron entre 25 -30 ° C en ambos años, si bien se compara lenteja y soja, ambas son leguminosas (familia fabaceae), en este caso la temperatura incidiría en la capacidad de esporulación y colonización el patógeno y en consecuencia en el tamaño de las lesiones y nivel de severidad.

En la colonización de los vástagos por *Colletotrichum* spp, Klingelfuss et al (2001) manifestaron una infección latente de antracnosis, donde los segmentos de la porción intermedia presentaron el menor nivel de colonización mientras que en la base y en la parte superior fueron superiores en la etapa R5 a R7 (inicio de formación de semillas hasta inicio de maduración, escala fenológica según Fehr y Caviness). Nuestros estudios nos muestran un sentido ascendente de la enfermedad manifestando los mayores valores entre el 1° y 3° entrenudo. Considerando que el rastrojo que queda sobre la superficie en los sistemas de siembra directa, estamos en presencia de 1° y 2° entrenudo, aumentando la fuente de inóculo predisponente para un cultivo de soja o maíz. En lotes de cultivos extensivos que provienen de frutales, un rastrojo no cereal como la mandarina, de acuerdo al presente estudio, actuaría como fuente de inóculo latente para una próxima siembra de soja sobre el mismo, ya que en base a nuestros resultados la infección a partir de este no cereal a la leguminosa, resultó positiva.

Al analizar el grupo de aislados de mayor virulencia: AC13, AC16 y AC24, se detecta que el ambiente del 1° año de experimentación fue más propicio para el AC13 y AC24 y el

ambiente del 2° año de experimentación fue más favorable para AC16 frente a los 3 genotipos de soja evaluados. Este último ambiente también favoreció al AC1, mientras que el comportamiento de AC6 y AC32 fue indiferente al ambiente en ambos años evaluados. No obstante, se evaluó una mayor virulencia de las cepas en el 2° año, donde se observó la influencia del ambiente sobre el cultivar y el patógeno. Esta respuesta puede deberse a que la antracnosis es una enfermedad de amplia distribución en regiones de clima cálido, de acuerdo con Hall et al., (1994) y Hartmann et al., (1999), en regiones tropicales a subtropicales, donde las infecciones suelen ocurrir con la presencia de lluvia, rocío o niebla, que proporcionan humedad por períodos de 12 horas o más, que estimulan la germinación de los conidios.

I 2.5 CONCLUSIONES

- ✚ El método de inoculación por inyección en la axila de la hoja unifoliada a partir del 1° entrenudo fue positivo para el cumplimiento del objetivo.
- ✚ Se confirmó el postulado de Koch 3 (inoculaciones e infecciones efectivas) y el postulado de Koch 4 (reaislamiento del patógeno causal) para antracnosis en soja.
- ✚ La escala de severidad aplicada para cuantificar la antracnosis a nivel de los entrenudos del tallo, permitió diferenciar el comportamiento de los genotipos de soja (resistente / susceptible) y fúngicos (avirulento / virulento).
- ✚ En los dos ciclos de evaluación se diferenciaron 3 tipos de genotipos de acuerdo a su respuesta frente al patógeno: resistente, intermedio y susceptible.
- ✚ La distribución de la enfermedad en los 6 entrenudos evaluados tuvo un avance acrópeto y basípeto a partir del 2° entrenudo, teniendo niveles decrecientes para el 3° y 4° entrenudos.
- ✚ El aislado AC 24 (*C. gloeosporioides*) obtenido de mandarina fue el más virulento en generar antracnosis en soja.
- ✚ El aislado AC13 (*C. graminicola*) obtenido de maíz, no generó comportamientos diferenciales (resistentes / susceptibles) en los genotipos de soja infectados, mientras que frente al AC1, también de maíz, el genotipo resistente de soja fue fenotípicamente susceptible.
- ✚ El 10 % de los tallos inoculados presentaron acérvulas distribuidas en forma alineada, sintomatología no reportada en antracnosis.

Capítulo 2

Caracterización de las interacciones entre cultivos y el complejo *Glomerella* / *Colletotrichum* y detección de fuentes de resistente a la enfermedad

Sección II: Maíz

Objetivo Específico:

Caracterizar el comportamiento (avirulencia/virulencia) de los diversos aislados del complejo fúngico y la reacción (resistencia/susceptibilidad) de los hospedantes en base a la observación fenotípica, e identificar fuentes de resistencia a la enfermedad en los cultivos evaluados.

II 2.1 INTRODUCCIÓN

El maíz, *Zea mays* L., es el segundo cultivo más importante de la Argentina luego de la soja, con una participación del 24% de la producción total de granos del país. Desde 1997 se verificó un gran crecimiento del área sembrada con soja, alcanzándose una relación de casi cuatro hectáreas de soja por una de maíz. Sin embargo, la imposibilidad de su reemplazo como materia prima en diversas industrias y la necesidad de una agricultura sustentable a través de su participación en la rotación de cultivos, sigue teniendo un aporte sustancial en el sistema agrícola en la actualidad. Asimismo, el aumento de los precios internacionales a partir de 2006, determinan significativamente que el área sembrada con maíz presente una tendencia creciente (Maizar, 2013).

La producción de maíz se concentra en las provincias argentinas de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, que en conjunto conforman la zona núcleo, la cual concentra un poco más del 70% de la superficie total sembrada con maíz (Maizar, 2013). El área sembrada en el ciclo 2017/18 fue de 7 Mha, con una producción de 51.5Mt (Informe Bolsa de Comercio, 2018). Para el ciclo 2019/2020 se confirmó las 6,9 Mha de siembra de maíz, se estaría frente a una base cosechable de 5,9 Mha. Esto permitiría proyectar un ciclo de maíz con un volumen cercano a los 47,5 Mt.

Los hongos son los patógenos que causan las pérdidas económicas más importantes a nivel mundial (Agrios, 2005). Se estima que aproximadamente el 40% de la producción agrícola se pierde cada año debido principalmente a las infecciones fúngicas (Oerke et al., 2006; Cuming

et al., 2009; Flood et al., 2010; Fisher et al., 2012) y las consecuencias del creciente cambio climático se espera que estas pérdidas se incrementen aún más (Gregory et al., 2009).

Las especies de *Colletotrichum* spp causan enfermedades por antracnosis en cereales y pastos en todo el mundo, al menos en 42 géneros de la familia *poaceae*. Aunque se conocen mejor como patógenos en cereales, cepas endofíticas de *Colletotrichum cereale* encontradas recientemente en la naturaleza, han sido reportadas en gramíneas de la subfamilia *poideae*, incluyendo el Trigo, el Pasto Orchard, el Wildry canadiense y el Pasto Bromo Liso (*Triticum aestivum*, *Dactylis glomerata*, *Elymus canadensis* y *Bromus inermis* respectivamente) (Crouch y Beirn, 2009c).

La antracnosis en maíz es una de las enfermedades más importantes en América del Norte y Sudamérica, las Antillas y Asia, afectando el follaje, el tallo y los granos (Kumar et al., 2006) En nuestro país, la antracnosis de la hoja y podredumbre de tallo son causadas por el hongo *Colletotrichum graminicola* (Teleomorfo *Glomerella graminicola*).

En Argentina fue descrita la enfermedad en 1957, adquiriendo importancia en el ciclo 1982/83, manifestando una mayor intensidad en la zona de Pergamino (Buenos Aires) en el periodo 1989/90. Este patógeno al colonizar al hospedante pudre los tallos, que se vuelven frágiles, y finalmente induce que las plantas se marchiten, se vuelquen al suelo y mueran. “*El impacto socio económico que tiene la enfermedad en los cultivos es altísimo, existen reportes que evidencian pérdidas del 90 por ciento en algunas regiones de Estados Unidos. Hubo casos en India donde esta enfermedad afectó la totalidad del cultivo de sorgo, fundamental para la alimentación humana en esa región, y también se registraron pérdidas de hasta el 100 por ciento de la cosecha de soja en dicho país*” (Vargas, 2016).

Es una enfermedad económicamente importante a nivel mundial, que estimula nuevas líneas de investigación sobre la genética de *Colletotrichum*, la patología y las interacciones hospedante - patógeno. Nicholson (1992), Bergstrom y Nicholson (1999), Vaillancourt et al.(2000) y Crouch y Beirn (2009c) proporcionaron revisiones exhaustivas de *C. graminicola* como patógeno del maíz.

Se consideraba que *C. graminicola* era sólo un patógeno del maíz en América del Norte. Esta percepción cambió después de varias epidemias severas de antracnosis de la hoja que ocurrieron durante 1970 en el norte-central y el este de los Estados Unidos, para luego extenderse por toda América. Boning y Wallner (1936) describieron por primera vez la

marchitez y la podredumbre del pie en el maíz, el hongo fue aislado en cultivo puro y lo identificaron como *C. graminicola*.

El hongo *C. graminicola*, cuyo hospedante es maíz, tiene un amplio rango de hospedantes entre especies cultivadas y especies silvestres de cereales y pastos. *Colletotrichum spp* puede causar enfermedades destructivas de avena, trigo, centeno y, en menor medida, de maíz y cebada (Rekha, 2006). Afecta todas las partes de la planta y se puede encontrar en cualquier momento durante la estación de crecimiento, observándose con mayor frecuencia en hojas y en la podredumbre del tallo (caña) a la madurez o cerca de antesis (Bergstrom and Nicholson, 1999). También suele observarse sobre plántulas y plantas adultas a senescentes.

Vaillancourt et al. (1991) expresa que *C. graminicola* puede cultivarse fácilmente bajo una variedad de condiciones y es muy adecuado para estudios fisiológicos y bioquímicos en el laboratorio y en condiciones de invernadero.

Al revisar todos los hongos *Coelomycetes*, Chowdhury et al. (1936) estudió la morfología del patógeno e informó que las setas eran de color marrón oscuro a negro, de color claro en las puntas, no ramificadas, 2-5 septadas, más anchas en la base y disminuyendo gradualmente hacia el ápice, midiendo hasta 170 μm de longitud y 4-6 μm de ancho. Los conidióforos estaban llenos, hialinos y medían 2 – 7 x 1-2 μm . Los conidios fueron falcados con uno o dos glóbulos centrales de aceite y miden 17 – 32 x 4-6 μm de diámetro. Los detalles morfológicos reportados por Tiffany y Gilman (1954), no difirieron apreciablemente y midieron conidios entre 18-31 x 3,5 - 4 μm . Por otra parte, Sutton (1966) informó que los conidios de *C. graminicola* medían entre 21-32 x 3-7 μm (longitud y ancho). Las setas eran negras, midiendo 175 μm de longitud y 4-6 μm de ancho en su base; las setas imparten color negro a las acérvulas, luego en 1980 observó que las colonias de *C. graminicola* se difundían con márgenes irregulares, el micelio aéreo era esponjoso y gris. Las masas conidiales era de color naranja salmón, las setas fueron abundantes, los conidios falcados, fusiformes con una medición de 23,5 – 29,0 x 3,5 – 5,0 μm esto denotaría la especie *graminicola* auténtica, del género *Colletotrichum spp*.

Sukno et al (2008) identificaron a *C. graminicola* como patógeno de maíz estableciendo una visión general de la biología, el ciclo de vida y el proceso de infección del mismo, utilizando el sistema de cultivo de maíz (Fig II 2 - 1).

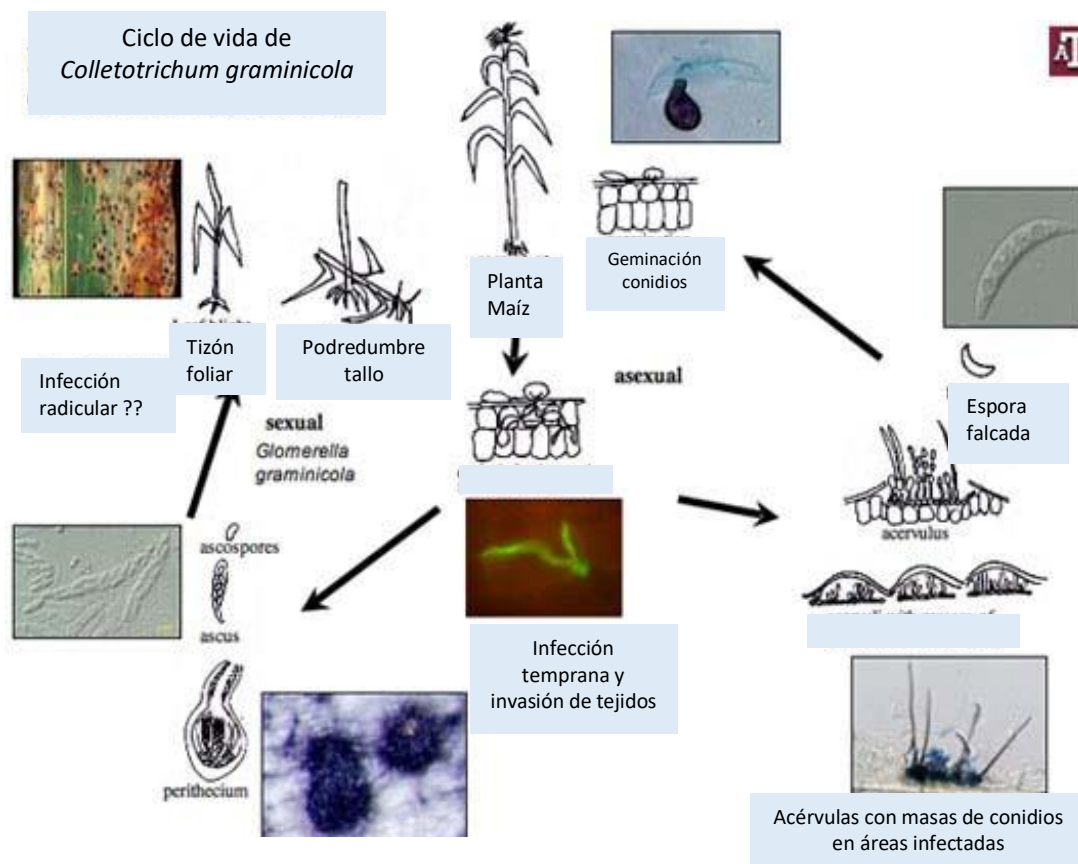


Fig II 2 -1: Ciclo de vida de *Colletotrichum graminicola* (imagen tomada de Sukno, 2008).

Una vez germinadas las conidias, la penetración de *C. graminicola* se produce por el ingreso a través de los estomas o por la epidermis donde se adhieren, desarrollándose un tubo germinativo, formándose luego un apresorio que permite atravesar la cutícula del hospedante. Inicialmente se produce una breve fase de biotrófica, y luego una etapa necrotrófica a partir de la formación de hifas secundarias (Sanz Martin et al., 2016).

La germinación de los conidios y la formación del apresorio se producen por debajo de los 35 °C. Los conidios son de corta duración y sensibles a la desecación, la exposición al aire seco por más de 5 horas puede reducir la germinación de los mismos al 98%. Las infecciones ocurren si la lluvia, el rocío o la niebla proporcionan humedad libre por períodos de 12 horas o más para la dispersión de esporas. La información sobre las condiciones ambientales que promueven el desarrollo de la enfermedad es poco precisa, la producción de esporas se ve favorecida por humedades relativas altas y temperaturas que oscilan entre 21 y 27 °C.

Los tipos de reacción exhibidos por seis líneas de sorgo a aislados de *C. graminicola* fueron similares tanto en campo como en invernadero, la gravedad de la enfermedad fue más intensa a campo (Rekha, 2013).

El análisis RAPDs ha demostrado ser una técnica útil para la detección del polimorfismo entre razas de hongos patógenos de plantas (Ouellet y Seifert, 1993; Manulis et al., 1994). Guthrie et al., (1992) utilizaron esta técnica para diferenciar aislados de *C. graminicola* del sorgo. Se encontró una mayor diversidad genética utilizando análisis de RAPDs que análisis de virulencia en los diferenciales del hospedante (Casela et al., 1993).

C. graminicola es un patógeno que muestra variabilidad patogénica en el desarrollo e induce una resistencia efectiva en el hospedante, siendo el factor de resistencia un medio confiable y económico para el manejo de enfermedades. Los distintos enfoques planteados para minimizar el efecto de la antracnosis han tenido diferentes éxitos, dependiendo de los sistemas patogénicos. El mejoramiento para resistencia sigue siendo el método más práctico y factible para controlar las enfermedades de las plantas, sin embargo, es difícil de acompañar en el desarrollo de patógenos más virulentos (Rekha, 2013).

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar el comportamiento (avirulencia/virulencia) de los diversos aislados del complejo fúngico y la reacción (resistencia/susceptibilidad) de los genotipos de maíz evaluados (hospedante) e identificar fuentes de resistencia a la enfermedad.

II 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

II 2.2.1 Ajustes Metodológicos. Aplicación del 3º Postulado de Koch con los aislados identificados en Capítulo 1.

Para el cumplimiento de los postulados de Koch (PK), el PK 2 (aislamiento e identificación) fue realizado en el Capítulo 1 y los postulados 3 y 4 (inoculación y pruebas patogénicas) de la interacción planta, patógeno y ambiente (IPPA) se realizó en el Capítulo 2, sección soja y maíz, que establecen una relación de causalidad entre un patógeno y la enfermedad que podía causar. Se llevaron a cabo experimentos preliminares en condiciones de invernadero y/o cámara de crecimiento (Fig II 2 - 2 a y b), a fin de realizar ajustes metodológicos en cuanto a condiciones ambientales conducentes a la expresión de la enfermedad, formas de inoculación y escalas de evaluación. Durante el desarrollo de los mismos se comenzó a caracterizar el comportamiento de genotipos vegetales según la sintomatología externa o expresión fenotípica de su reacción de resistencia/susceptibilidad y la expresión de avirulencia/virulencia de los aislados fúngicos.



Fig II 2 -2: **a:** invernáculo donde se realizaron las inoculaciones; **b:** planta de maíz preparada para ser inoculada en invernadero.

2.2.1.1 Material biológico fúngico y vegetal

Tal lo señalado en el Capítulo 1 se recolectaron cañas de maíz con síntomas del complejo *Glomerella/Collectotrichum* (G/C) de diferentes localidades (Tabla II 2 - 1) y se seleccionó un grupo de aislados con características bio-ecológicas diferentes e identidad validada morfológica y molecularmente (Cap 1). Los mismos fueron multiplicados en APGA, en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Cs. Agrarias, UNR (Fig. II 2 - 3), a fin de

inocularlos y poder evaluar sus cualidades de avirulencia/virulencia al interactuar con el grupo de genotipos (líneas e híbridos) de maíz difundidos en la zona núcleo como otro de los cultivos hospedantes en estudio. Se solicitó a empresas semilleras los genotipos vegetales con antecedentes de reacción diferencial y si fuese accesible, genotipos portadores de genes de resistencia identificados (Cap 1).

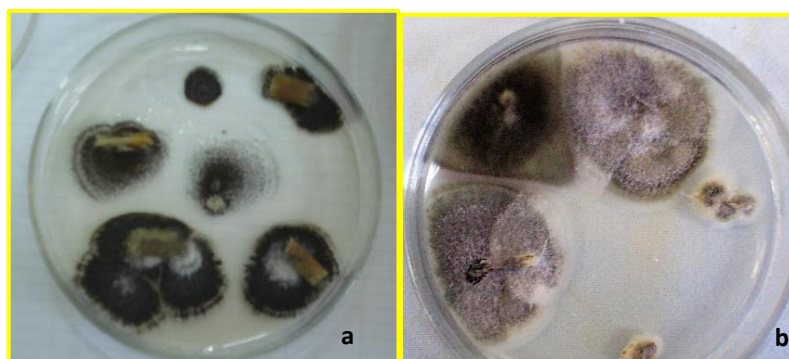


Fig II 2 - 3: a-b: Colonias de diferentes aislados de *Colletotrichum* seleccionados para ser multiplicados en APGA y posteriormente inoculados en condiciones de invernadero.

Tabla II 2 - 1: Detalle de codificación, localidades agro ecológicas de procedencia y hospedante de aislados de *Colletotrichum* spp (AC) utilizados en el ajuste metodológico.

Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp (AC)	Procedencia	Hospedante de origen
AC1	Pergamino (Buenos Aires)	Maíz
AC6	Bombal (Santa Fe)	Maíz
AC17	Entre Rios	Maíz

Los materiales genéticos de maíz utilizados fueron: H1979 *Syngenta* y *Syngenta* 747, que fueron inoculados con los aislados de *Colletotrichum* spp (AC) seleccionados: AC1, AC6 y AC17 con características bio-ecológicas diferentes (Tabla II 2 - 2).

Tabla II 2 - 2: Característica de los híbridos comerciales de maíz inoculados con diferentes aislados de *Glomerella-Colletotrichum* en condiciones de invernadero durante el ajuste metodológico.

Híbrido	Resistencia / Susceptibilidad
<i>Syngenta</i> 747	Moderadamente susceptible o susceptible
<i>Syngenta</i> H 1979	Moderadamente resistente

Para los experimentos de ajuste metodológico en invernadero, de cada uno de los genotipos de maíz utilizados, se sembraron 3 semillas en macetas de 25 cm de diámetro conteniendo una mezcla de suelo y arena en una proporción 2:1. Se realizó un raleo y se conservaron dos plantas por maceta para luego ser inoculadas (Fig II 2 - 4).

El diseño de experimento utilizado para las inoculaciones fueron 3 bloques, cada bloque consta de 3 macetas por genotipo (2 o 3 semillas por maceta), 6 a 9 plantas por interacción planta – patógeno (IPP), con un mínimo de 5 plántulas por bloque, dentro de cada bloque se sumo además una maceta testigo con 2 semillas por maceta.

La inoculación se realizó entre las vainas y láminas de plántulas de maíz con 3 a 5 hojas, donde se ubicó una porción de micelio entre las vainas y láminas foliares acartuchadas. (Fig II 2 -4).



Figura II 2 -4: planta de maíz para inocular (las flechas indican el lugar de la inoculación).





La totalidad de las plantas (inoculadas + testigos) fueron mantenidas en un ambiente con alta humedad relativa en los días posteriores a la inoculación, a fin de asegurar la infección y el progreso de la enfermedad.


II 2.2.1.2 Propuesta de Escala de Severidad

Se presentó una propuesta de una escala de severidad y la evaluación del punto de inoculación más efectivo para las nuevas inoculaciones y evaluaciones. Las reacciones fueron evaluadas cada 10 días posterior a la inoculación (dpi) y hasta finalizar el ciclo de cultivo, en esta instancia se evaluaron los siguientes parámetros (Incremona et al., 2011).

- a) **Incidencia en entrenudos (IE%)**: número de entrenudos necrosados / el número total de entrenudos evaluados x 100)
- b) **Severidad % o área sintomática en cada entrenudo (SE%)**: Escala de 5 grados (sano; hasta 25; 50; 75 y 100% de área con síntomas de antracnosis):se confeccionó la escala tomando como base la escala de Nash & Jansen (1973), la cual fue modificada para la evaluación de *Colletotrichum* spp en cañas de maíz. La misma está basada en el porcentaje (%) de tejido afectado (severidad para cada entrenudo) y define 5 grados: 1 entrenudo sano con atizonamiento (oscurecimiento) circunscripto al punto de inoculación (0%); 2 hasta un 25 % de área con síntomas de oscurecimiento; 3 hasta un 50 % de área con síntomas de antracnosis; 4 hasta un 75 % de área con síntomas de antracnosis; 5 hasta un 100% de área con síntomas de antracnosis (Tabla II 2 - 3).

Tabla II 2 - 3: Escala con 5 grados de severidad propuesta para cuantificar antracnosis en maíz

VALOR	SIGNIFICADO	IMAGEN
1	sano con atizonamiento circunscripto al punto de inoculación	
2	hasta un 25 % de área con síntomas de antracnosis	
3	hasta un 50 % de área con síntomas de antracnosis	
4	hasta un 75 % de área con síntomas de antracnosis	

5	hasta un 100 % de área con síntomas de antracnosis	
---	--	--

II 2.2.1.3 Aplicación del 4° Postulado de Koch - reaislado e identificación a partir del material inoculado

Al finalizar el período de evaluación de 30 dpi y a fin de cumplimentar el 4° PK, se cortaron trozos delgados de las cañas inoculadas sintomáticas por aislado G/C, se desinfectaron superficialmente con solución de hipoclorito de sodio al 1 %, se enjuagaron 3 veces con agua estéril y se desecaron sobre papel absorbente. Luego fueron sembrados en APGA hasta desarrollar colonias de G/C y confirmar el agente causal y las pruebas de patogenicidad.

II 2.2.2 Siembra e inoculación en condiciones seminaturales de invernadero. 1° Año de Experimentación

II 2.2.2.1 Selección de los híbridos del cultivo hospedante maíz y de los aislados de *Glomerella /Colletotrichum*

El ensayo se realizó en condiciones seminaturales de invernadero, ésto es, el reemplazo de la cobertura plástica superior por una malla antigranizo de protección permitiendo que las plantas estén expuestas a las condiciones naturales de humedad y precipitaciones similares a las condiciones de cultivo. El mismo se ubicó en el área comprendida en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNRosario, de la localidad de Zavalla, departamento Rosario, provincia de Santa Fe, a los 33°01' de Lat. Sur y 60°53' de Long. Oeste. Durante este **1° año** se procedió a la siembra e inoculación de los híbridos de maíz cuyas características genéticas son descriptas en la Tabla II 2 - 4 (Fig.II 2 - 5 a –b).

Los híbridos seleccionados para este 1° año de experimentación fueron lo mismos utilizados en el proceso de ajuste metodológico (Tabla II 2 - 2) y se sumaron dos híbridos: AX

878 MG^R y AX 886 MG Nidera^{MR} con distinta característica de resistencia y susceptibilidad para ser evaluados (Tabla II 2 - 4).

Tabla II 2 - 4: Comportamiento de los híbridos comerciales de maíz inoculados con diferentes aislados de *Glomerella-Colletotrichum* bajo condiciones de campo durante el ajuste metodológico. Las celdas coloreadas hacen referencia a los híbridos nuevos incorporados.

Híbrido	Resistencia / Susceptibilidad
Syngenta 747	Moderadamente susceptible / susceptible
Syngenta 1979	Moderadamente resistente
AX 886 MG Nidera	Moderadamente resistente o resistente
AX 878 MG Nidera	Resistente



Fig II 2 - 5: a: estado adulto de los híbridos de maíz inoculados bajo la cubierta plástica; b: punto de inoculación del aislado AC 1

La colección fúngica utilizada en este 1° año de experimentación, estuvo conformada por aislados obtenidos de hospedantes oleaginosos y cereales, como soja y maíz, procedentes de diversas localidades y ecosistemas citados en el Cap. 1 y reaislados del ensayo de ajuste metodológico (PK4) (Tabla II 2- 5). Respecto al hospedante maíz, los aislados se obtuvieron a partir de porciones de tallos (caña) con síntomas de antracnosis, la misma está indicada por un atizonamiento oscuro y por la presencia de cuerpos fructíferos, denominados acérvulas, signo del patógeno (Fig II 2 -6 a). En cuanto al hospedante soja, la misma presenta una sintomatología

con puntuaciones al azar (acérvulas) que se extienden en todo el tallo (Fig II 2 -6b). A esta colección fúngica, seleccionada a partir del proceso de ajuste metodológico, se incorporó un aislado procedente de un hospedante cítrico, *Citrus reticulata* (mandarina), la sintomatología observada en este hospedante fueron lesiones necróticas de color oscuro con puntuaciones negras (acérvulas) como signo del patógeno (Fig II 2 -6c).

Los tejidos infectados se desinfectaron superficialmente, se sembraron e incubaron en placas al 0,2 % de APGA.



Fig II 2 -6: a: cañas de maíz con síntomas de atizonamiento; b: tallos de soja con síntomas de puntuaciones al azar; c: tallos de mandarina con síntomas de antracnosis.

Tabla II 2 -5: Detalle de codificación, hospedantes, localidades agro ecológicas de procedencia de los aislados de *Glomerella* / *Colletotrichum*

Aislados	Localidad	Cultivo
AC 1	Pergamino (Buenos Aires)	Maíz
AC 5	Bombal (Santa Fe)	Soja
AC 6	Bombal (Santa Fe)	Maíz
AC 11	Elortondo (Santa Fe)	Maíz
AC 13	Elortondo (Santa Fe)	Maíz
AC 15	Chilibroste (Córdoba)	Soja
AC 16	Banderlao (Buenos Aires)	Soja

AC 25	Esperanza (Santa Fe)	Soja
AC 26	Zavalla (Santa Fe)	Maíz
AC 32	Firmat (Santa Fe)	Soja

Luego se conformó un grupo de 6 AC seleccionados por su virulencia, tomando aislados de la colección fúngica original (Tabla II 2 - 5) sumado el aislado del no cereal (cítrico), quedando una nueva lista de aislados de *Colletotrichum* spp que fueron utilizados en las inoculaciones en ambos ciclos de experimentación (Tabla II 2 - 6).

Tabla II 2 - 6: Detalle de codificación, hospedantes, localidades agro ecológicas de procedencia de aislados inoculados de G-C en el 1º año de experimentación.

Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp (AC)	~ Identificación por marcadores morfológicos	Localidad	Cultivo
AC1	<i>C. graminicola</i>	Pergamino (Bs As)	Maíz
AC6	<i>C. graminicola</i>	Bombal (Sta. Fe)	Maíz
AC13	<i>C. graminicola</i>	Elortondo (Sta. Fe)	Maíz
AC16	<i>C. truncatum</i>	Bandalao (Bs As)	Soja
AC24	<i>C. gloeosporioides</i>	Helvecia (Sta. Fe)	Mandarina
AC32	<i>C. gloeosporioides</i>	Firmat (Sta. Fe)	Soja

II 2.2.2.2 Metodología aplicada para evaluar interacción planta – patógeno -ambiente

Se utilizaron cuatro híbridos de maíz comerciales seleccionados: Syngenta 747, AX 878, AX 886 MG Nidera; Syngenta 1979 elegidos en base a su susceptibilidad y resistencia (Tabla II 2 - 4), las semillas estaban tratadas con fungicidas comerciales. El diseño de experimento utilizado fue en bloques con 3 repeticiones. Las siembras se realizaron en parcelas de seis surcos separados a 0,70 m, 5 semillas por metro lineal. Se colocaron 10 semillas por repetición,

haciendo un total de 30 semillas por repetición / aislado /híbrido. (Total: 90 plantas/ aislado /híbrido) (Fig 2 II - 7 a).

Las inoculaciones se realizaron con jeringa en el 2° nudo desde la base, inyectando 20µl. de una suspensión de micelio y conidios (1×10^5 µl.) ajustado en hematocitómetro, en el estadio reproductivo de panoja y espigas emergidas (Vt y R₁ de la escala de Ritchie y Hanway, 1982) (Fig. II 2 - 7 b).

La evaluación de las cañas se realizó al finalizar el ciclo del cultivo a través de los parámetros IE % y SE % (Fig. II 2 - 7 c -d).

En el cumplimiento del 4° PK, se re aislaron cada uno de los aislados de G/C utilizados a partir de las porciones infectadas y sintomáticas y se procedió a su posterior identificación para la confirmación del patógeno en estudio (Fig.II 2 -7 e -f).



Fig 2 II -7: a: cañas de maíz inoculadas en el invernadero; b: caña de maíz inoculada y con síntomas de atizomamiento; c- e: cañas de maíz recolectadas con síntomas de antrachnisis ; f: cañas de maíz inoculada con el aislado AC16.

II 2.2.3 Siembra e inoculación en condiciones de campo. 2° año de experimentación

II 2.2.3.1 Colección fúngica a inocular y hospedantes seleccionados

La siembra e inoculación de los híbridos de maíz en el ensayo del 2° año de experimentación se realizó en el Campo Experimental “J. F. Villarino” (Zavalla). En este 2° año, por un proceso de selección y evaluación, se incorporaron 2 híbridos comerciales: DM 2741 y Pioneer (Py) 2310, evaluados como resistente y susceptible respectivamente (Gatica et al., 2012).

Se descartó el material AX 886 MG Nidera evaluado como moderadamente resistente o resistente y se optó por otros dos materiales considerados resistente y susceptible por tener un comportamiento diferencial más evidente. Por lo que en el segundo año de experimentación fueron utilizados los híbridos cuyas características se describen en la Tabla II 2 -7.

Tabla II 2 -7: Característica de los híbridos comerciales de maíz inoculados con los aislados de la Tabla II 2 - 6 en condiciones de campo en el 2° año de experimentación. Las celdas coloreadas hacen referencia a los híbridos nuevos incorporados.

Híbrido	Resistencia / Susceptibilidad
Syngenta (Sy) 747	Moderadamente susceptible o susceptible
Syngenta 1979	Moderadamente resistente
AX 878 MG Nidera	Resistente
DM 2741	Resistente
Pioneer (Py) 2310	Susceptible

Colección fúngica

En cuanto a la colección de cultivos fúngicos del complejo *Glomerella/Colletotrichum*, se seleccionaron los siguientes aislados: AC1, AC6, AC13; AC16, AC 24 y AC32 con características bio-ecológicas y hospedantes diferentes (Tabla II 2 - 6). Esta colección de aislados también fue usada en el 1° año de experimentación. La selección se realizó en base a los ambientes, hospedantes diferentes y su virulencia y de esta manera expresan el tetraedro de la enfermedad considerando los factores principales de la interacción hospedante – patógeno – ambiente.

II 2.2.3.2 Inoculación a campo

El diseño del experimento utilizado fue en bloques con 3 repeticiones, con parcelas de 5 surcos de 30 m de largo separados a 0,70 m entre surcos, 5 semillas por metro lineal (Fig II 2 -

8 a-b). Se colocaron 10 semillas por repetición, haciendo un total de 30 semillas /repetición / aislado /híbrido. (Total: 90 plantas/ aislado /híbrido = 2700 plantas).

De manera similar a lo señalado para el 1º año, las inoculaciones se realizaron con jeringa en el 2º nudo desde la base, inyectando 20µl. de una suspensión de micelio y conidios ($1 \times 10^{5-6}$ µl) ajustado en hematocitómetro, en el estadio reproductivo de panoja y espigas emergidas (Vt y R₅ de la escala de Ritchie y Hanway, 1982) (Fig II 2 - 8c).



Fig 2 II-8: a y b: siembra de los híbridos de maíz; c: inoculación por inyección y d: recolección de las cañas inoculadas.

2.2.1.3 Evaluación y cuantificación

La evaluación se realizó al final del ciclo del cultivo. Se recolectaron las cañas inoculadas (Fig II 2 -8 d), las mismas fueron evaluadas por visualización de la sintomatología característica de *C. graminicola*, la cual se expresa en el tallo por un atizonamiento oscuro abarcando los entrenudos. (Fig 2 II -9).

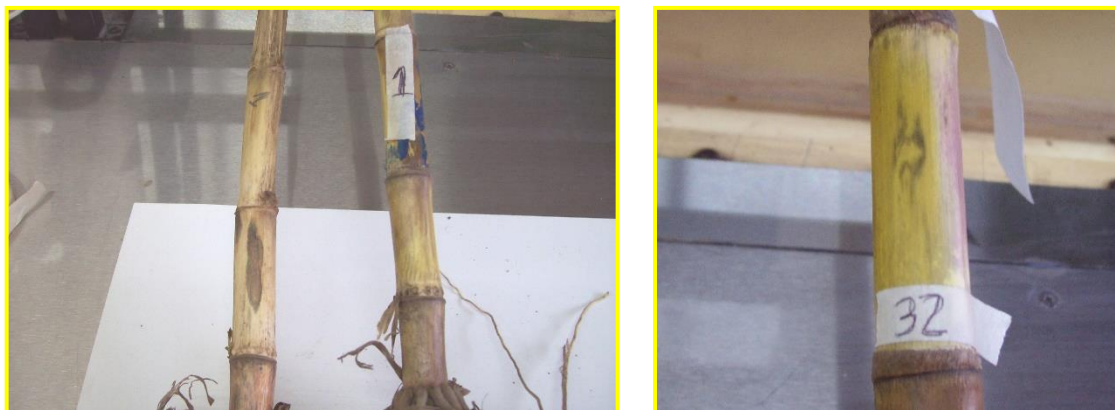


Fig 2 II -9: sintomatología característica de antracnosis en cañas inoculadas con los aislados AC1 y AC32 respectivamente

La evaluación de las cañas se realizó a través de los parámetros de IE% y SE% incluidos en la Escala de 5 grados de Nash & Jansen (1973) modificada (escala propuesta), utilizada en el 1° año de experimentación. (Tabla II 2 - 3).

II 2.3 RESULTADOS

Avances en el período de ajuste metodológico

Durante esta etapa se seleccionaron los aislados en base a los resultados obtenidos durante la etapa preliminar de evaluación de los aislados G/C, detallada previamente en el capítulo 2 sección soja (I 2).

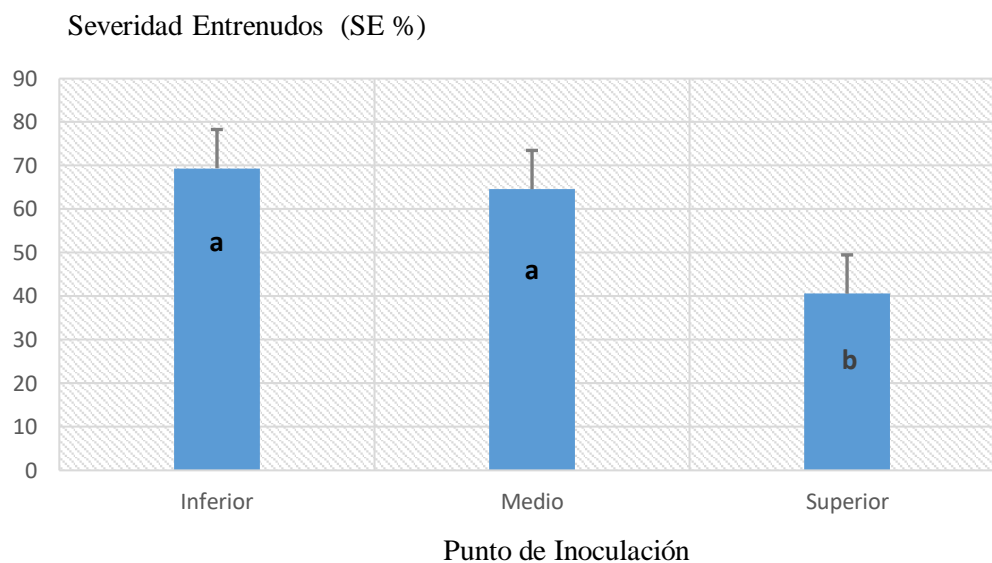
II 2.3.1 Efectividad de punto de inoculación para ambos años de experimentación

El grado de severidad expresado en los entrenudos del tallo de maíz fue evaluado mediante la escala propuesta anteriormente (Tabla II 2 - 3), la cual facilitó la cuantificación ya que no se contaba con una escala específica para el complejo G/C, permitiendo evaluar la efectividad de la ubicación (entrenudo) del punto de inoculación. Los resultados mostraron que hubo diferencias significativas entre los valores de severidad de los entrenudos, según se ubicaran en el entorno del punto de inoculación realizado en el tercio inferior, medio o superior ($F= 10,02$; $p < 0,01$) (Incremona, et al., 2011).

Los sitios de inoculación ubicados en el tercio inferior y medio resultaron ser los más efectivos en generar la infección de los tallos de maíz con *Colletotrichum* spp, mostrando niveles promedio de 69,4% y 64,6% de severidad de antracnosis respectivamente. El punto de inoculación ubicado en el tercio superior resultó ser el menos efectivo con 40,6% de severidad de antracnosis (Fig. II 2 - 10).

Se realizó el 4° PK, a partir de porciones de cañas con síntomas de antracnosis, realizando el reaislamiento e identificando cepas de *Colletotrichum*, confirmando la presencia del patógeno causante de la enfermedad.

Figura II 2 -10: Evaluación de la efectividad de los sitios de inoculación en base a valores promedio de Severidad de entrenudos (%) para antracnosis en maíz.



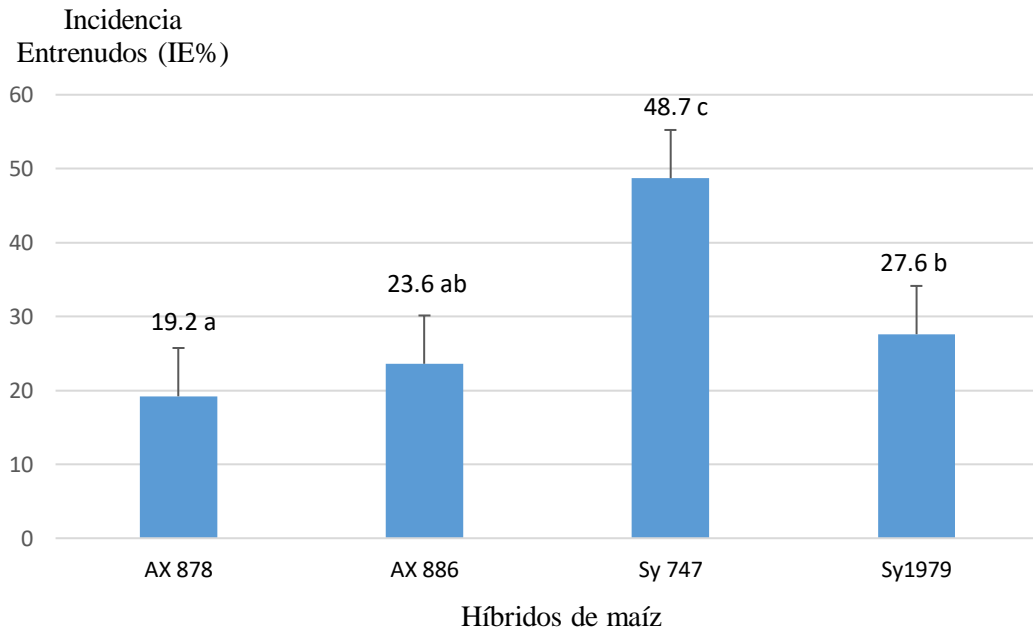
Letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0,05$

II 2.3.2 Resultados del 1° año de experimentación

En el 1° año de experimentación hubo diferencias significativas entre los 4 híbridos seleccionados con respecto a los parámetros IE% ($F=19,89$; $p < 0,0001$) y SE% ($F=9,23$; $p < 0,0001$). En la Tabla II 2 - 4 se expresó el comportamiento de estos materiales de acuerdo a la escala de resistencia y susceptibilidad, la cual fue evaluada a través de los parámetros de Incidencia y Severidad de los entrenudos.

En la Figura II 2 -11 se evaluó la *Incidencia de Entrenudos* en los 4 híbridos utilizados en este 1° año de experimentación. El híbrido Sy 747 fue el que mostró la mayor susceptibilidad, registrando valores promedio de 48,7 % de IE% y el híbrido AX 878 obtuvo 19,24% de IE%, mientras que los híbridos Sy 1979 y AX 886 MG Nidera presentaron valores intermedios con valores de 27,6 % y 23,6 % de IE% respectivamente (Figura II 2 -11).

Figura II 2 -11: Rangos de Incidencia de Entrenudos expresados en porcentaje (IE%) en los 4 híbridos de maíz evaluados en el 1° año de experimentación.

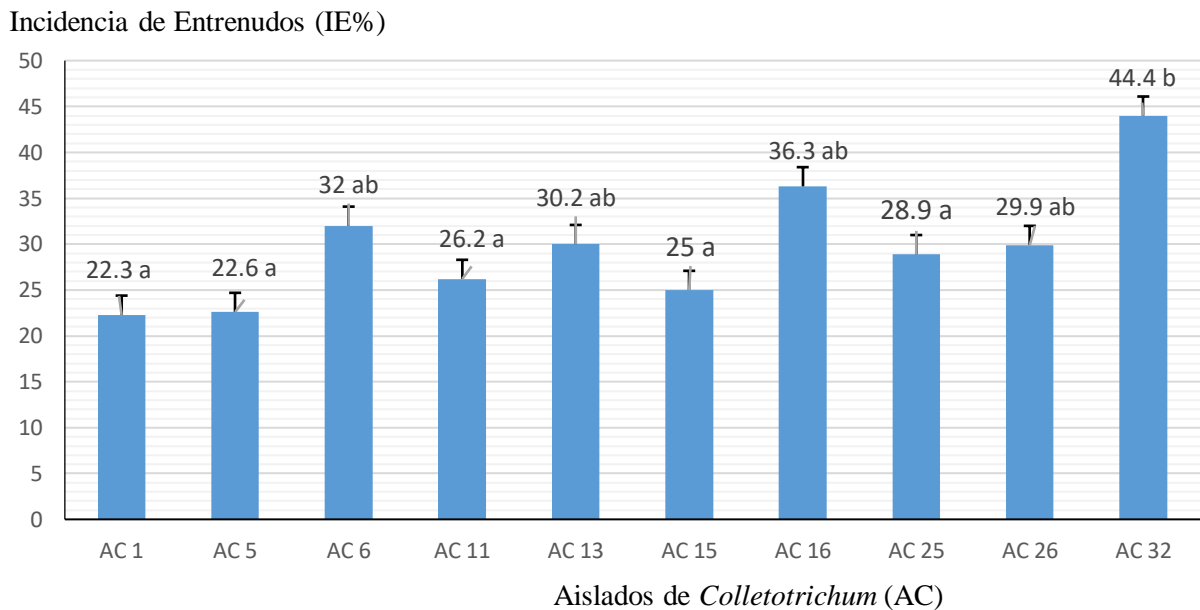


Letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Entre los aislados inoculados de *Glomerella/Colletotrichum* (G/C) en etapa, hubo diferencias ($F=2,10$; $p < 0,0454$) respecto a IE promedio, AC32 y AC16 fueron las cepas más virulentas causando 44,4 y 36,3 IE%, provenientes de hospedante soja. Los aislados AC6, AC13, AC25 y AC26 presentaron un comportamiento intermedio, cuyo origen son maíz y soja. Las cepas AC1, AC5, AC11 y AC15 manifestaron valores menores de IE % (Fig. II 2 -12).

Este estudio permitió identificar los aislados G/C con distinto grado de virulencia, obtenidos de hospedantes cereales / no cereales y leguminosas confirmando las fuentes de resistencia a la antracnosis de maíz causada por el complejo G/C.

Figura II 2 -12: Rangos de Incidencia de Entrenudos expresados en porcentaje (IE%) infectados con los 10 aislados de *Colletotrichum*.

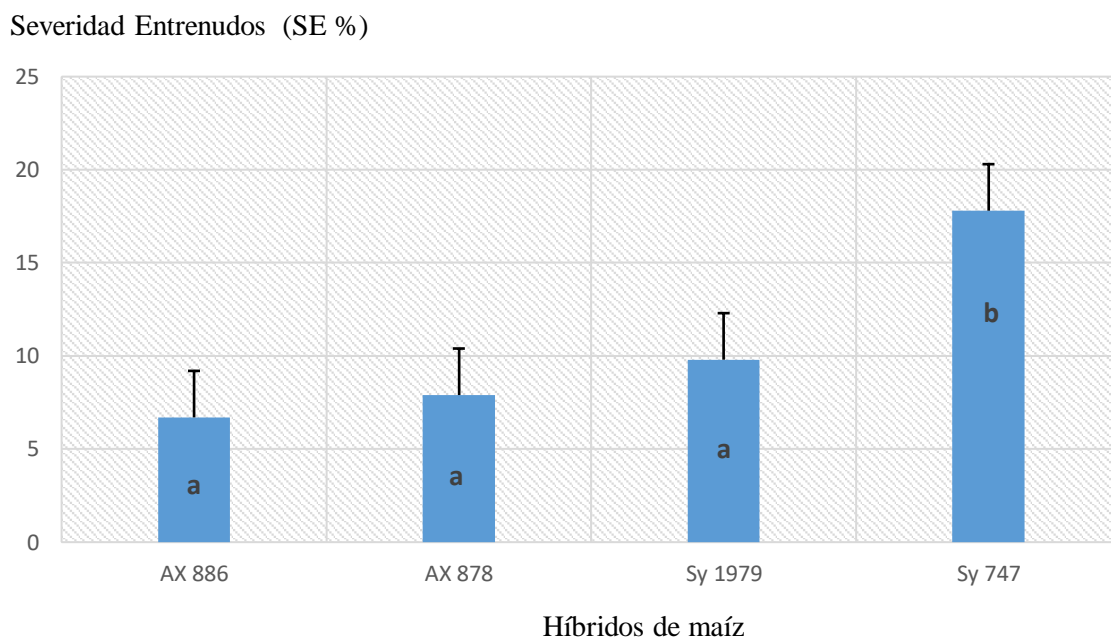


Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$.

En cuanto a los híbridos seleccionados en este 1° año, hubo diferencias significativas entre los 4 híbridos con respecto al parámetro de severidad de entrenudos (SE%) (Tabla II 2 – 4) ($F=9,23$; $p < 0,0001$), el análisis estadístico utilizado fue un Anova tipo III.

El híbrido más susceptible, Sy 747, registró valores promedio de 17,9 de SE% expresando un comportamiento susceptible, por otro lado, los híbridos AX 878 y AX 886 MG Nidera mostraron valores intermedios 7,9y 6,7 SE% respectivamente que podrían indicar un desempeño moderadamente resistente o resistente; mientras que el híbrido Sy 1979 mostró valores de 9,8 SE % expresando un comportamiento moderadamente susceptible (Fig II 2 - 13).

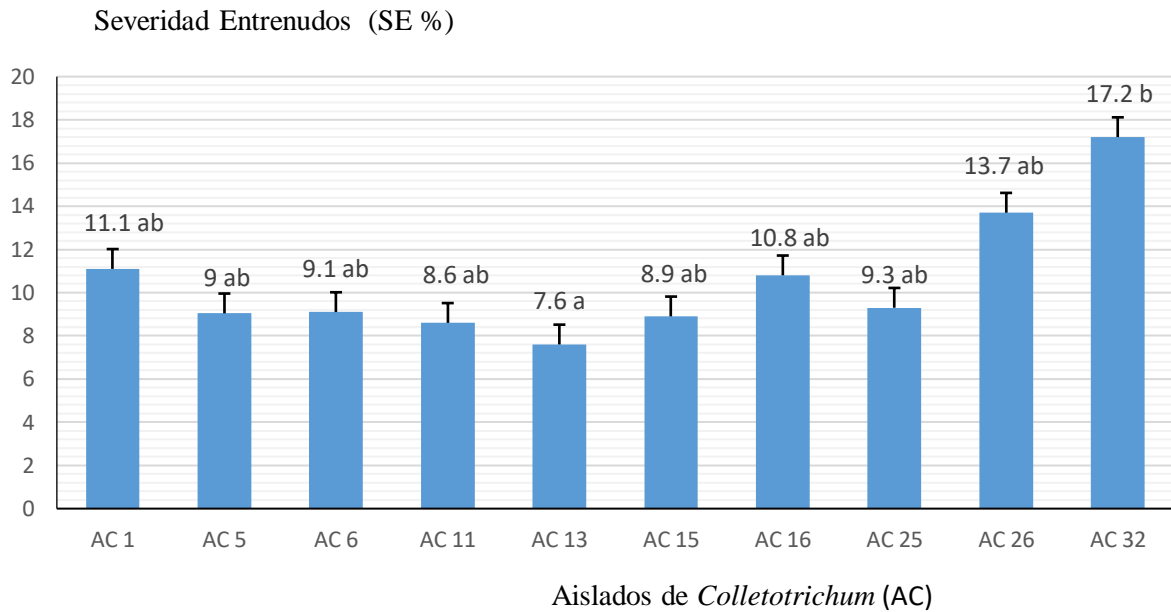
Figura II 2 -13: Rangos de *Severidad* expresados en porcentaje (SE %) de antracnosis en maíz, en los híbridos que fueron estudiados en el 1° año de experimentación.



Letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

En la Figura II 2 - 14 se muestra las diferencias significativas en el valor de Severidad promedio evaluado en los aislados referenciados en la Tabla II 2 - 5, donde los AC13 cuyo hospedante es maíz mostro un valor bajo de SE % en su infección en los híbridos evaluados, y el de mayor expresión fue el AC32, hospedante soja, con un valor de superior de 17,2 SE %, el resto de los aislados provenientes de ambos cultivos, expresaron valores intermedios entre 8,5 a 14 SE % (F: 1.,22, p 0,300), se evidencia la misma predisposición a producir infección, tanto desde aislados obtenidos de hospedante maíz como de soja.; sin embargo, *C. gloeosporioides* fue el de mayor severidad en estos híbridos.

Figura II 2 - 14: Rangos de *Severidad* promedio expresados en porcentaje (SE%) infectados con los 10 aislados de *Colletotrichum*.



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

II 2.3.2.1 Aplicación del 4° Postulado de Koch - reaislado e identificación a partir del material inoculado

Con el fin de cumplimentar el 4° postulado de Koch, se procedió a la cosecha de las cañas inoculadas sintomáticos y asintomáticos (Fig II 2 - 15a), luego de finalizado su período de pos inoculación, se cortaron porciones de la misma, se desinfectaron y sembraron en APGA hasta desarrollar colonias de G/C y confirmar el agente causal y las pruebas de patogenicidad (Fig II 2- 15 b y c).

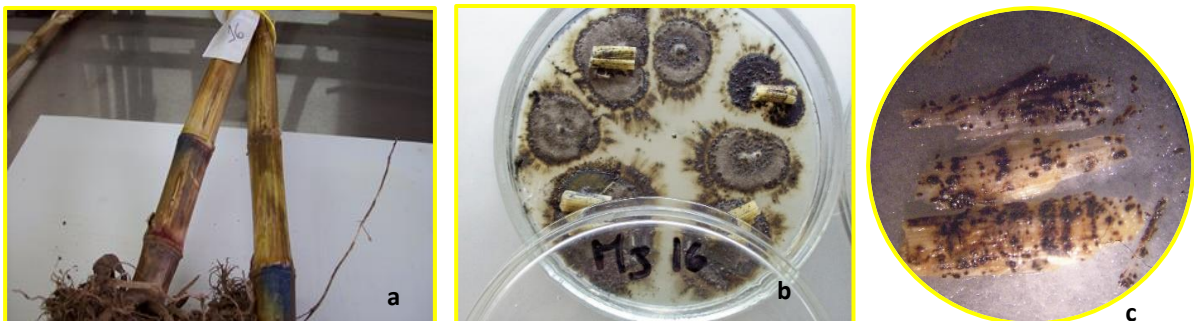


Fig 2 II -15: **a:** cañas de maíz inoculadas con el aislado AC16, con síntomas de atonamiento por *Colletotrichum* spp; **b:** Colonias de *Colletotrichum* spp obtenidas a partir de cañas sintomáticas inoculadas; **c:** trozos de tallos de maíz mostrando micelio y acérvulas (signo de la enfermedad).

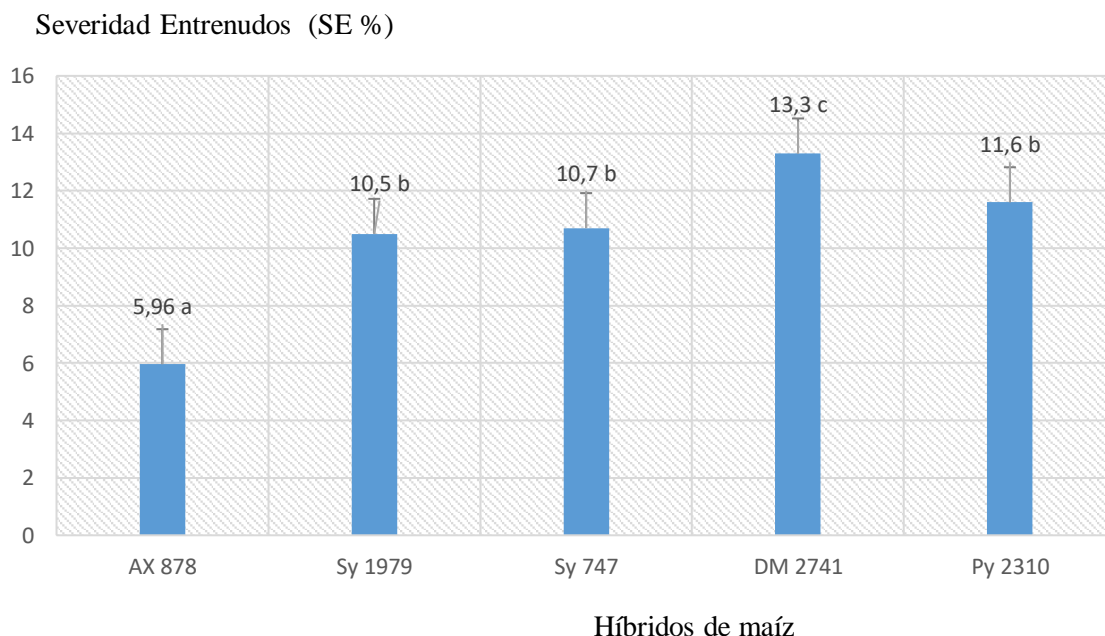
II 2.3.3 Resultados del 2° año de experimentación

En este 2° año de experimentación, se renovaron los materiales genéticos, descartando al híbrido AX 886 y se incorporaron dos nuevos materiales comerciales: DM 2741 y Pioneer (Py) 2310 para evaluar su respuesta frente a las cepas citadas en el 1° año de experimentación.

El análisis de la varianza realizado en este 2° año, reveló diferencias significativas en los 5 híbridos evaluados ($F: 31, 47, p < 0.0001$), y en los 6 aislados inoculados en las cañas de maíz ($F: 8.45; p < 0.0001$), así también las interacciones fueron significativas entre los híbridos y aislados G/C ($F: 8,47; p < 0.0001$).

En cuanto a los híbridos estudiados en este 2° año, el material AX 878 presentó respuesta resistente frente a los otros materiales, mientras que los híbridos Sy 747, Sy 1979 y Py 2310, tuvieron un comportamiento similar expresando un carácter de moderadamente susceptible a susceptible y el genotipo DM 2741 tuvo una actuación como un material susceptible. (Fig II 2 - 16).

Figura 2 II -16: Evaluación de la Severidad de Entrenudos expresada en porcentaje (SE%) de los híbridos estudiados en el 2° año de experimentación.

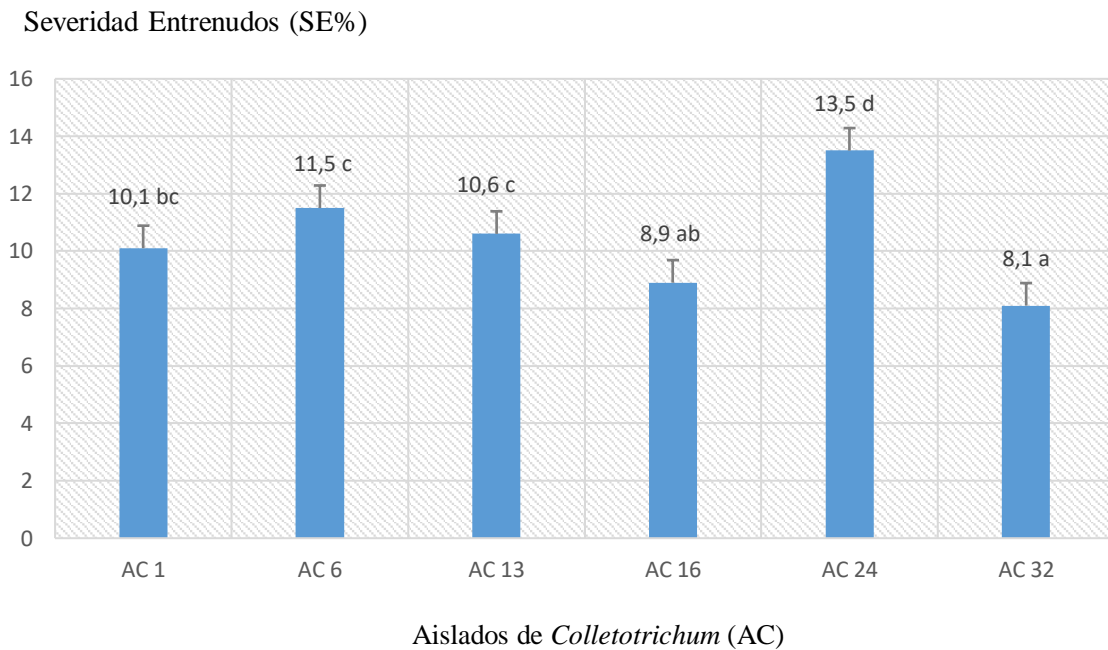


Letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

De acuerdo al Test de Fisher se observaron diferencias significativas en el grado de virulencia de los distintos aislados, medidos por el porcentaje de severidad (SE%). El AC32 y el AC16 aislados a partir del hospedate soja, obtuvieron bajos valores de severidad, un segundo

grupo fueron los AC13, AC6 provenientes de hospedante maíz y el AC24, aislado de un frutal como la mandarina, tuvieron altos valores de severidad, destacandose el AC24 con un mayor valor, por último el AC1, presenta valores intermedios de severidad (Fig II 2 - 17).

Figura II 2 -17: Evaluación de la Severidad de Entrenudos expresada en porcentaje (SE%) de los aislados inoculados en las cañas de maíz de los híbridos en estudio.



Letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

II 2.3.3.1 Aplicación del 4° Postulado de Koch - re-aislado e identificación a partir del material inoculado en el 2° año de experimentación.

Con el fin de cumplimentar el 4° PK, se procedió a realizar el mismo procedimiento de reaislamiento e identificación del agente causal efectuado en el 1° año de experimentación (II 2.3.2.1).

II 2.3.4 Resultados comparativos de ciclos experimentales individuales y analizados integralmente

En esta comparación se analizó el comportamiento de los 3 híbridos que fueron utilizados en ambos ciclos agrícolas, para observar su comportamiento según la fuente de resistencia o susceptibilidad establecida por el semillero, se evaluó la SE% causada por los 6 aislados inoculados en las cañas de maíz, en 5 entrenudos, tomados desde el entrenudo basal hacia un sentido acrópeto expresado por la IE%. Los híbridos estudiados fueron: Sy 747, Sy

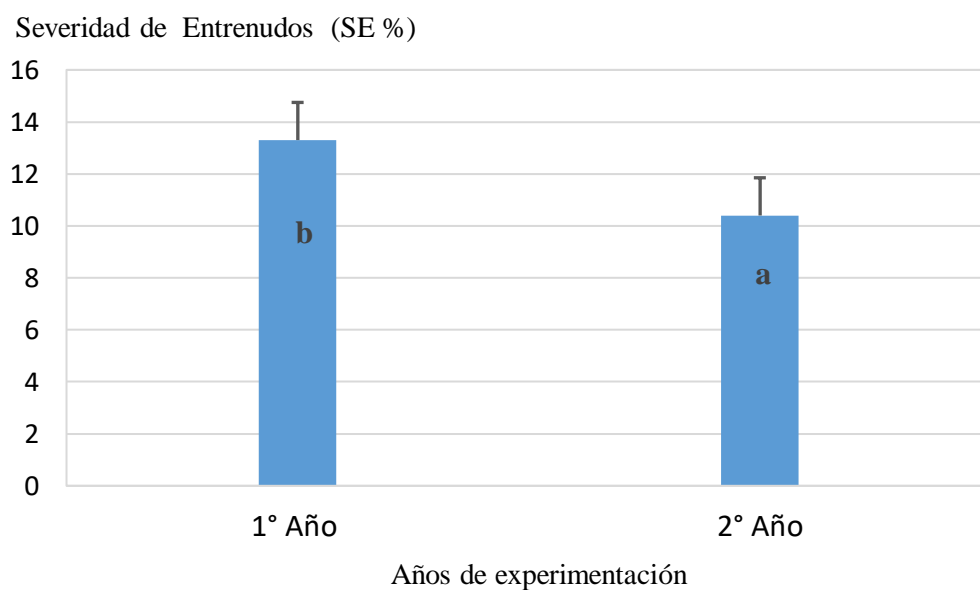
1979 y AX 878. Observamos en el Cuadro II2 -1, el análisis de la varianza donde las variables y sus interacciones son significativas (Infostat, 2018).

Cuadro II 2 -1: Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5466,13	51	107,18	25,62	<0,0001
Años (Fig. 2 M -18)	78,19	1	78,19	18,69	<0,0001
Híbridos (Fig. 2M -19)	1020,19	2	510,10	121,91	<0,0001
Aislados (Fig.2M -21)	120,27	5	24,05	5,75	<0,0001
Entrenudos	811,57	5	162,31	38,79	<0,0001
Años x Híbridos	209,00	2	104,50	24,98	<0,0001
Años x Aislados	800,95	5	160,19	38,29	<0,0001
Híbridos x Aislados	293,29	10	29,33	7,01	<0,0001
Error	22376,3	9 5348	4,18		

En Figura II 2 -18 se muestra el SE% en comparación de los dos años agrícolas en evaluación observándose diferencias significativas entre ellos (F: 18,69; p <0.0001). En el 1° año se registró una mayor presencia de la enfermedad en los híbridos evaluados, con un valor de 13,3 SE %. En cuanto a las condiciones predisponentes de la enfermedad, se evidencia la presencia de precipitaciones elevadas luego de las inoculaciones en el 1° año de experimentación, durante el período de enero a mayo, tiempo de mayor incidencia de la enfermedad. Respecto del 2° año, las condiciones ambientales se encuadraron dentro de los parámetros sugeridos para el desarrollo de esta enfermedad (Anexo 1) obteniendo un valor menor de entrenudos infectados de 10,4 SE% (Fig II2 -18).

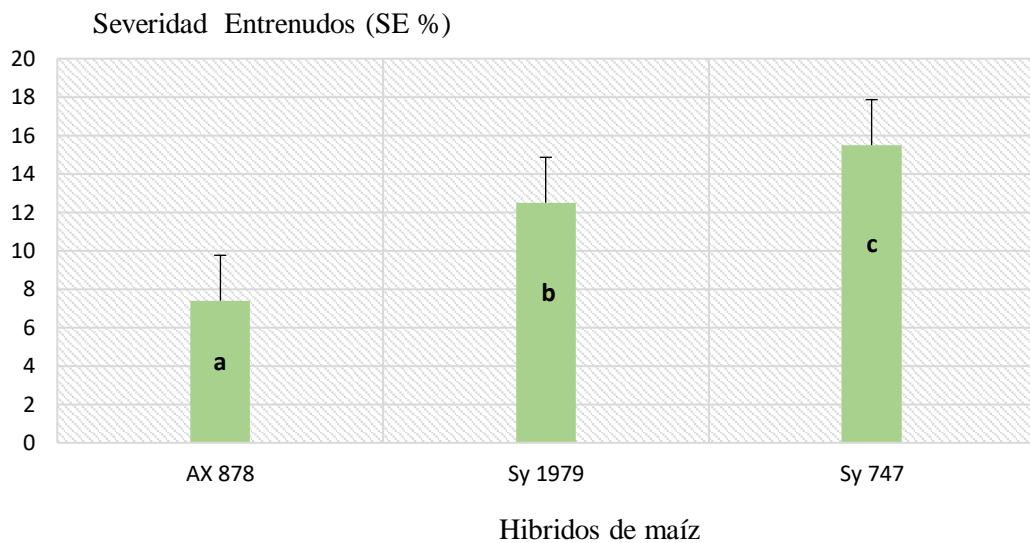
Figura II 2 -18: Comparación de SE% promedio expresado en porcentaje de los dos años de experimentación. En el análisis se utilizaron los 3 híbridos estudiados en ambos años agrícolas.



Letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

En la Figura II 2 – 19 se observa la diferencia significativa de los 3 híbridos utilizados en ambos años de experimentación ($F: 121,91; p < 0,0001$). En la tabla II 2– 4 y 7 se indicó el comportamiento de los híbridos estudiados, donde el híbrido Sy 747 caracterizado previamente como susceptible (S) se expresó con tal comportamiento con un valor de 15,5 SE %. Por su parte, el híbrido AX 878 fue señalado como resistente (R) con un valor de 7,4 SE %, mientras que el híbrido Sy 1979 como moderadamente resistente (MR) con un valor intermedio de 12,5 SE%. (Fig II 2 - 19).

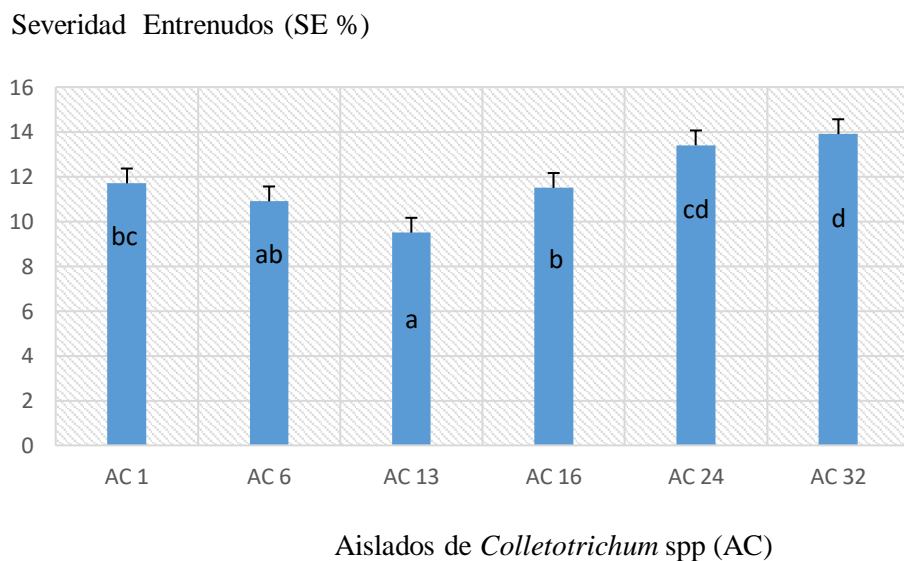
Figura II 2 – 19: Valores de Severidad de Entrenudos (SE %) expresado en porcentaje de los 3 híbridos evaluados en los dos ciclos agrícolas.



Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$.

Los aislados de G/C si bien tuvieron diferencias significativas ($F: 5,75, p < 0.0001$) el 66 % de los aislados tuvieron una virulencia similar con valores entre 11 a 12 SE%, el AC32, proveniente de hospedante Soja, junto al AC24, hospedante mandarina, obtuvieron el mayor valor de virulencia en una expresión de 13 a 14 SE%. en los 5 entrenudos evaluados. (Fig. II 2 - 20). El aislado AC13 (9,5), de hospedante maíz se comportó con una menor virulencia en la evaluación de todos los aislados. (Fig II 2 -20).

Figura II 2 -20: Evaluación de los porcentajes de Severidad Entrenudos, (SE%) en los diferentes aislados inoculados.

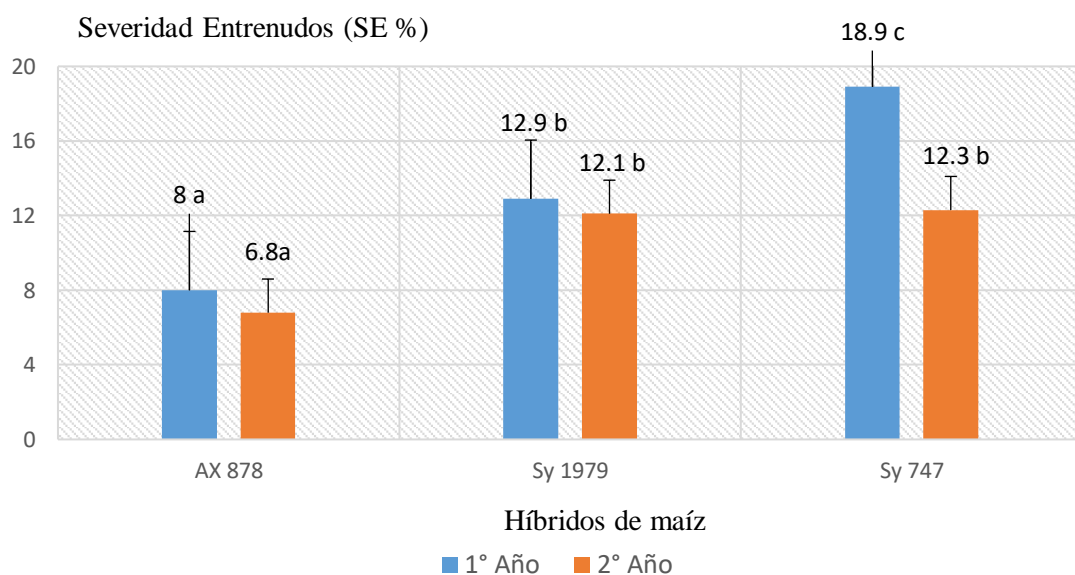


Letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

II 2.3.4.1 Análisis de las interacciones años por genotipos de maíz

En la interacción de los años agrícolas en que se realizó la experimentación y los 3 híbridos en estudio, se registraron diferencias significativas. (F. 24,98; $p < 0.0001$). Se confrontaron los años con los híbridos duplicados en ambos ciclos, manifestando el híbrido AX 878 como un material resistente en ambos años, el material Sy 1979 tuvo similar comportamiento intermedio, en ambos años, expresándose como material moderadamente resistente, y el híbrido Sy 747, si bien fue diferente en ambos años donde el 1° año fue el de mayor virulencia, siguió manteniendo altos valores de severidad pronunciándose como un material de S a MS (Fig II 2 - 21).

Figura II 2 - 21: Rangos de Severidad promedio expresados en porcentaje (SE%) de la interacción entre los años agrícolas y genotipos de maíz.

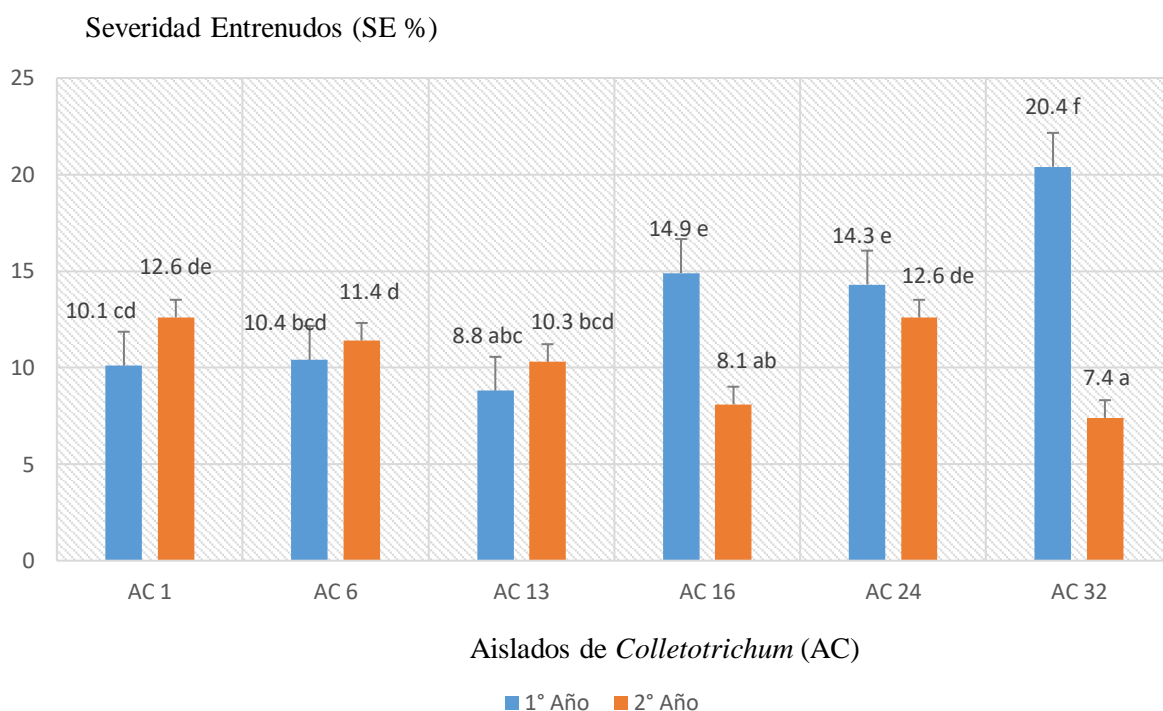


Letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0,05$

En la Figura II 2 – 22 se observa la interacción significativa (F: 38,29; $p < 0,0001$) entre los aislados de *Colletotrichum spp* (AC) comparados en ambos años agrícolas. Los aislados se comportaron de manera diferente en cada año, solamente AC6 proveniente de hospedante maíz y AC24, hospedante mandarina, tuvieron el mismo comportamiento, donde AC24 tuvo la mayor virulencia en ambos años y AC6 tuvo un comportamiento intermedio en estos años agrícolas. En el 1° año de evaluación las cepas AC16 y AC32, provenientes de hospedante soja y mandarina respectivamente, expresaron los mayores valores de virulencia. Sin embargo, en el 2° año agrícola estas cepas se comportaron como avirulentas, AC1 con un valor mayor de

virulencia en el 2° año y su comportamiento fue intermedio en el 1° año, AC13 también se mostró diferencialmente en ambos años, en el 1° año se comportó avirulento y una forma intermedia en el 2° año. Los resultados expresan la virulencia de los aislados de *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* en su mayor expresión.

Figura II 2 -22: Interacción de los aislados de *Colletotrichum* spp (AC) en ambos años agrícolas, expresados en rangos de Severidad entrenudos promedio en porcentaje (SE%)



Medias con una letra común no son significativamente diferentes $p > 0,05$

Se comparó la interacción entre los 6 aislados seleccionados e inoculados en las cañas de maíz, con los 3 genotipos utilizados en ambos años agrícolas (F: 7,01, $p < 0,0001$), observándose en el Cuadro II 2- 2 y en la Fig II 2 - 23 las interacciones significativas entre estos dos parámetros. Los híbridos confirmaron su comportamiento de resistencia y susceptibilidad en su interacción con los distintos aislados.

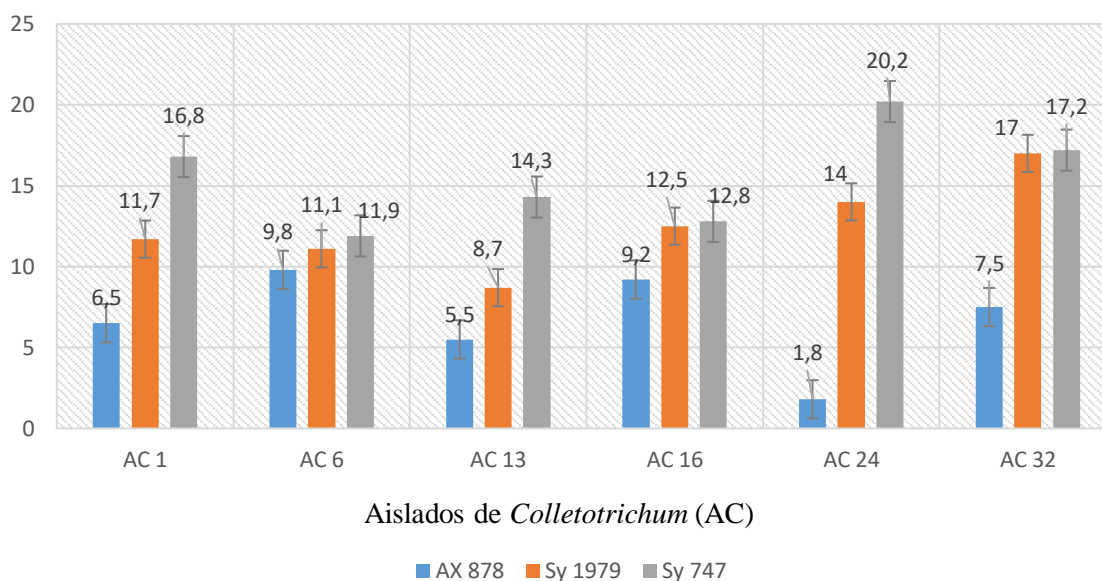
Cuadro II 2 -2: Interacción entre los aislados de *Colletotrichum spp* inoculados en las cañas de maíz y los 3 genotipos de maíz evaluados en los dos años agrícolas según su intensidad.

Híbridos	Aislados de <i>Colletotrichum spp</i> (AC)					
	AC 1	AC 6	AC 13	AC 16	AC 24	AC 32
AX 878	6,5 abc	9,8 defg	5,5 a	9,2 cdef	1,8 ab	7,5 abcd
Sy 1979	11,7 efghi	11,1 efgh	8,7 bcde	12,5 ghi	14 hij	17 jk
Sy 747	16,8 jk	11,9 fghi	14,3 ijk	12,8 ghi	20,2 l	17,2 kl

Las celdas coloreadas indican su comportamiento resistente hasta susceptible.

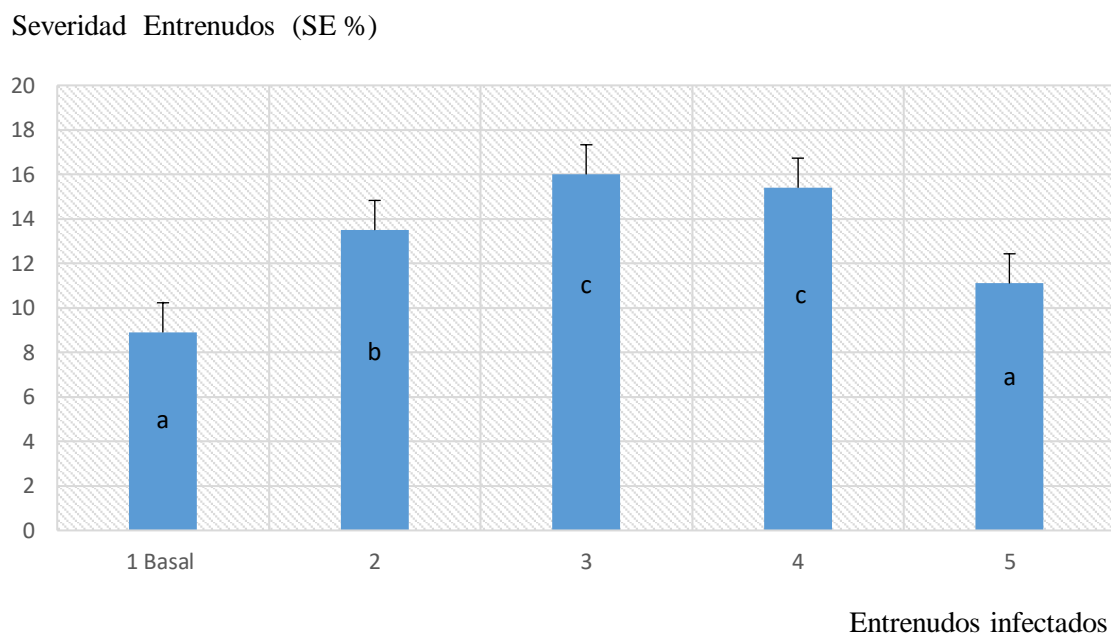
Figura II 2– 23: Interacción entre los aislados de *Colletotrichum* inoculados en las cañas de maíz y los 3 genotipos de maíz evaluados en los dos años agrícolas

Severidad de Entrenudos (SE %)



En Figura II 2 - 24 se registró el porcentaje de la Severidad de entrenudos (SE%) infectados con *Collectotrichum spp* en los 5 primeros entrenudos evaluados en los híbridos en estudio, evidenciando diferencias significativas (F. 38,79; $p < 0,0001$). Se observó que el 1° fue el entrenudo menos infectado, siguiendo el 5° entrenudo en una posición intermedia. Los más infectados fueron el 2°, el 3° y el 4°, evidenciando el movimiento de la enfermedad en sentido acrópeto, concentrándose en los entrenudos medios de la caña.

Figura II 2-24: Evaluación de la severidad de los entrenudos infectado con *Colletotrichum* (SE %) al ser inoculados.



Letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

II 2.4 DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis amplía el rango de hospedantes y de especies de *Colletotrichum* spp que afectan al maíz, encontrando como hospedantes a la soja y a un cultivo no tradicional en el ambiente agrícola, como la mandarina. En cuanto a las especies de *Colletotrichum* spp, la presencia de *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* se manifestaron en maíz con alta virulencia. Desde el punto de vista epidemiológico, es importante señalar que entre los aislados de G/C más virulentos se destacó el obtenido de mandarina. Si bien en nuestros sistemas agrícolas no es común, en situaciones particulares se roturan lotes con frutales para continuar con cultivos extensivos; en estos casos el residuo vegetal de mandarina infectado actuaría como fuente de inóculo latente de antracnosis en un cereal como maíz.

En cuanto a los aislados de *Colletotrichum* spp que produjeron infecciones en los híbridos de maíz, los de mayor virulencia fueron AC16 y AC32 provenientes de soja, AC24 de mandarina y luego los de maíz. En nuestro sistema agrícola, la siembra directa, es una práctica que permite la mejora de los suelos. Sin embargo, este patógeno, presente en rastrojos como inóculo primario, nos interpela respecto al manejo de la enfermedad, especialmente en el sistema de rotaciones maíz – soja.

En el momento presente, no se cuenta en nuestro país con una escala de evaluación de pérdidas que determine la severidad de las cañas de maíz con presencia de atizonamiento causada por antracnosis. Por tal motivo se ha confeccionado una propuesta de escala de severidad. La misma ha sido utilizada en este trabajo para evaluar los materiales en estudio. La escala se presenta como original ya que durante este trabajo no se utilizó la propuesta por Hines et al., (2001). Esta última utiliza para su estimación la decoloración de los tejidos internos de la caña pero nuestra valoración se realizó en la cara externa de la misma, donde el evaluador efectúa su primera visualización. La presentación de una escala modificada para nuestros materiales servirá para futuras evaluaciones a campo.

Se logró determinar el punto de inoculación más efectivo, considerado como la entrada de los conidios en la caña, simulando una herida y su dispersión en la misma. Se estableció un sentido ascendente desde la base hacia el ápice, donde el tercer y el cuarto entrenudo fueron los que presentaron mayor incidencia. La enfermedad se extiende hacia arriba llegando a infectar hasta el quinto entrenudo, mostrando una alta dispersión de los conidios por acción del agua y viento.

En antracnosis la producción de esporas se ve favorecida por humedades relativas altas y temperaturas que oscilan entre 21 y 27 °C, sin embargo, en los ciclos estudiados en este trabajo la mayor severidad se presentó en el 1° año de experimentación, donde la temperatura osciló entre 27 y 35° C durante el ciclo del cultivo, con humedades medias y bajas precipitaciones. Esto evidencia la plasticidad de la enfermedad en cuanto a condiciones agroclimáticas predisponentes.

Según Rekha (2013) *C. graminicola* es un patógeno muy variable, donde la variabilidad patogénica plantea dificultades en el desarrollo y en la expresión de la resistencia efectiva del hospedante, expresión que compartimos ampliamente, identificando fuentes de resistencia y susceptibilidad a antracnosis ante el complejo G/C. Los híbridos estudiados expresaron diversas respuestas en su comportamiento frente al patógeno y la enfermedad, diferenciando genotipos resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles, y manteniendo la respuesta en ambos años agrícolas. Como resultado se caracterizó a los híbridos AX 878, Sy 1979 y Sy 747 como resistente, moderadamente resistente y susceptible, respectivamente.

II 2.5 CONCLUSIONES

- ✚ La escala de severidad propuesta para evaluar el resultado de las inoculaciones en base a la expresión fenotípica a nivel del tallo - caña de maíz resultó efectiva para diferenciar genotipos de maíz resistentes / susceptibles y aislados de G/C avirulentos / virulentos.
- ✚ La mayor severidad de antracnosis fue observada en los entrenudos medios (3° y 4°), continuando en sentido acrópeto del tallo-caña.
- ✚ Los aislados de *Colletotrichum* spp de mayor virulencia fueron AC16 y AC32 provenientes de soja y el AC24 proveniente de mandarina, en ambos años agrícolas, demostrando el riesgo epidemiológico de la enfermedad en diferentes secuencias de cultivos.
- ✚ Los dos aislados de soja AC16 (*C. truncatum*) y AC32 (*C. gloeosporioides*) fueron los más virulentos en maíz.
- ✚ Los aislados G/C con distinto grado de virulencia obtenidos de distintos hospedantes (cereal, frutal y leguminosa), permitieron identificar una potencial fuente de resistencia a la antracnosis de maíz causada por el complejo G/C.
- ✚ Se caracterizó diferencialmente a los híbridos AX 878, Sy 1979 y Sy 747 como resistente, moderadamente resistente y susceptible, respectivamente. Resultando el genotipo AX 878 una fuente potencial de resistencia a Antracnosis
- ✚ El progreso de la enfermedad de *Colletotrichum* spp, se produjo con temperaturas entre 25 y 35 °C y humedades relativas bajas, en contraposición con lo registrado hasta el momento, observando una mayor plasticidad de estas cepas de G/C frente a las condiciones agroclimáticas predisponentes a esta enfermedad.

Capítulo 3

Efecto de la secuencia de cultivos (rotación) sobre las interacciones de soja y aislados del complejo *Glomerella/Colletotrichum* bajo condiciones seminaturales. Estudio epidemiológico

Objetivo específico:

Evaluar el complejo *Glomerella/ Colletotrichum* y sus interacciones bajo condiciones seminaturales en una rotación soja – maíz (ambos hospedantes de Antracnosis).

3.1 INTRODUCCIÓN

La antracnosis es una enfermedad asociada a los estadios reproductivos del cultivo de soja y junto a otras patologías, es conocida como enfermedades de fin de ciclo (EFC). El complejo fúngico *Glomerella / Colletotrichum* (G/C) constituido especies pertenecientes a la división Ascomycota (fase sexual, perfecta o teleomorfo) y a la división Deuteromycota (fase asexual, imperfecta o anamorfo), que causa antracnosis en numerosas especies vegetales (Manandhar& Hartman, 1999). La antracnosis puede manifestarse tanto en precosecha como en poscosecha, en virtud de la capacidad de infección latente que posee el hongo (Londoño et al., 2007).

Es conocido que el rastrojo de soja, a través de su rápida mineralización, tiene un papel predominante al modificar la dinámica del nitrógeno (N) del suelo y su disponibilidad para el cultivo subsiguiente; por lo tanto, el conocimiento de los cambios causados por soja como antecesor es esencial para la caracterización de la rotación maíz –soja (González et al., 2015). En materia de cultivos antecesores para maíces de siembra tardía se suelen utilizar lotes con barbechos largos provenientes del ciclo anterior, lo que permite una adecuada recarga en el perfil. Para los maíces de segunda el principal antecesor es el trigo, dónde la dinámica del N será afectada no sólo por el efecto del cultivo antecesor, sino también por la mineralización del N de la materia orgánica, ya que el cultivo de maíz se implantará en una época de elevada disponibilidad de agua y mayores temperaturas (Ferragutti et al., 2014).

Los residuos de cosecha de los cultivos dejados sobre la superficie del suelo normalmente persisten por más tiempo que los incorporados, lo que genera una disponibilidad

diferencial de nutrientes, en especial la de N, aunque funciona como fuente de inóculo para algunas enfermedades causadas por hongos hemibiótrofos. Por lo tanto, la velocidad de descomposición de los rastrojos sobre el suelo condiciona la secuencia de cultivos y la disponibilidad de nutrientes para éstos. El proceso de descomposición de los residuos de cosecha depende de factores del ambiente edáfico como temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes; factores inherentes al rastrojo como su concentración de N o relación carbono / nitrógeno (C/N), contenido de lignina y carbohidratos solubles, y factores de manejo como la cantidad de rastrojo, el tamaño de residuo y el lugar de descomposición (sobre o dentro del suelo). En los rastrojos que se descomponen sobre el suelo, la calidad de los mismos, definida por su concentración de N y lignina o relación C/N, es determinante de su tasa de descomposición. La descomposición de rastrojos con más de 1,2 % de N es producida fundamentalmente por bacterias, adquiriendo mayor relevancia la descomposición por hongos cuando los rastrojos tienen menos de 0,8% de N y alta proporción de lignina en sus tejidos (Betancur et al., 2002).

Las rotaciones de cultivos de maíz, soja y trigo / soja posibilitan una producción sustentable con balance de carbono positivo y junto a una fertilización correcta posibilitan un buen balance de nutrientes con buenos resultados económicos.

Se ha demostrado que *C. graminicola*, causante de antracnosis en maíz, causa más destrucción cuando el inóculo primario proviene de residuos saprotróficos en la superficie del suelo. En ausencia de material vegetal en descomposición, la lisis de esporas de *C. graminicola* y micelio ocurre rápidamente debido a la competencia de otros habitantes fúngico del suelo. La supervivencia en el suelo depende en gran medida de las condiciones ambientales, la temperatura y otra microflora del suelo. Cuando hay gran cantidad de desechos, el patógeno puede invernar efectivamente durante períodos prolongados y proporcionar una fuente de inóculo primario para la siguiente temporada (Crouch y Beirn; 2009).

En cuanto al proceso de la penetración del hongo en la planta hospedante, se produce un breve período de biotrofia, durante el cual el hongo crece entre las paredes de las células vegetales y las membranas plasmáticas sin entrar en la célula o inducir respuestas específicas de defensa del hospedante. La fase biotrófica es breve. Aproximadamente 24 hs después de la penetración de *C. sublineola*, causante de antracnosis en sorgo y menos de 12 hs después de la penetración de *C. graminicola*, las células de la planta hospedante originalmente invadidas por

el hongo comienzan a degradarse y las hifas comienzan a expandirse y entran en las células cercanas. La fase de infección necrotrófica ocurre cuando las hifas secundarias comienzan a ramificarse a través del tejido del hospedante. Las hifas secundarias son distintivamente más delgadas que las hifas primarias y la etapa necrotrófica comienza 48 - 72 hs después de la penetración de *C. graminicola* (Mims y Vaillancourt, 2002) (Fig.3 - 1).

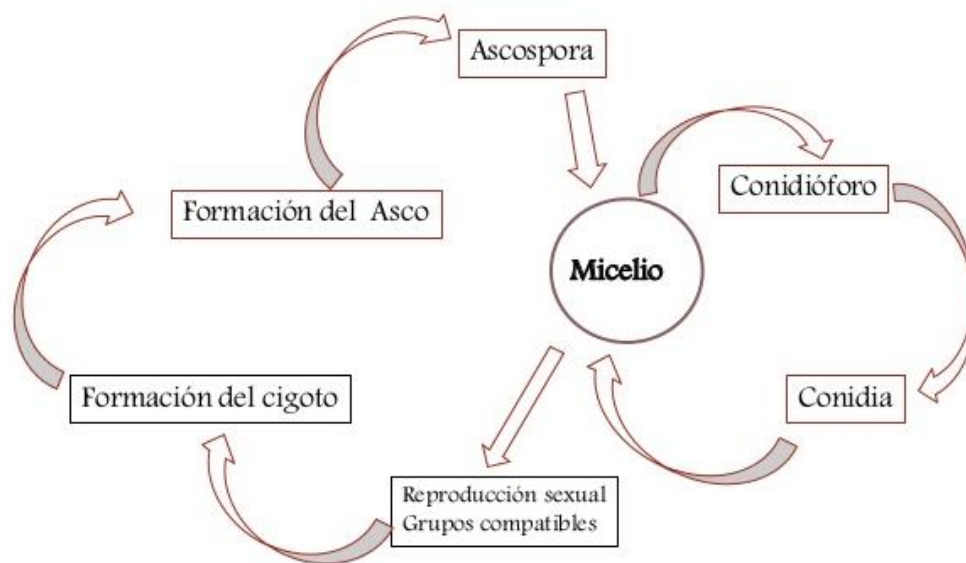


Fig 3 - 1 Ciclo biológico de *Colletotrichum / Glomerella*

Las infecciones originadas por ascosporas son ocasionales o esporádicas, pues suelen ser poco eficientes energéticamente. La maduración del apresorio se produce por inclusión de capas de melanina y síntesis de componentes osmóticos activos (Agrios, 2005 a, b) ocasionando un poro de penetración, del cual emerge un punto delgado de crecimiento para penetrar la cutícula del hospedante y como resultado un punto de luz interior puede ser identificado en el apresorio. A partir de ese momento el hongo puede adoptar dos tipos de estrategias de infección:

a) Hemibiotrofia intracelular

Este tipo de colonización del patógeno comprende dos fases de nutrición, la primera llamada *biótrofa* que es de corta duración y está presente durante los estadios tempranos de la colonización fúngica, se asocia con hifas primarias intracelulares gruesas o vesículas multilobuladas que colonizan células epidermales y mesófilas adyacentes. Esta etapa se caracteriza por ser asintomática pospenetrativa, en ella el patógeno restringe la expresión

enzimática asociada a degradación de la pared vegetal, limitándose a obtener alimento mientras las células del hospedante penetradas permanecen viables. La segunda conocida como *necrótrofa* ocurre en las etapas tardías de la infección, se caracteriza por ser destructiva y se asocia con hifas secundarias angostas, las cuales se ramifican a través del tejido hospedante inter e intracelularmente, mientras secretan enzimas para degradar la pared celular vegetal causando la muerte de las células hospedantes que posteriormente son usadas como alimento (Fig 3 - 2a). Finaliza con la aparición de síntomas de la enfermedad y producción de conidios por parte del patógeno (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

b) Necrotrofia intramural subcuticular

En esta etapa, una vez que el patógeno penetra la cutícula, se restringe su entrada inmediata al lumen celular, iniciando una extensión, mediante hifas subcuticulares e intramurales debajo de la cutícula y entre la pared periclinal y anticlinal de las células epidérmicas. Se desconoce si las células del hospedante permanecen vivas, pero los síntomas aparecen 24 hs después de la penetración. Después de un breve período asintomático, el hongo comienza a expandirse rápidamente a través del tejido del hospedante intra e intercelularmente, destruyendo las células vegetales y degradando las paredes celulares (Fig 3 - 2b).

En cualquiera de las dos estrategias expuestas, el micelio forma acérvulas debajo de la cutícula dispuestas en forma concéntrica o dispersa en las lesiones y al romperse son liberados conidios para iniciar las infecciones una vez más. El hongo también puede albergarse en residuos en descomposición; tallos, hojas y frutos enfermos; semillas de plantas anuales; hospedantes alternativos (como endófito) y como parásito vegetal a nivel subepidérmico en forma de acérvulas, en donde puede sobrevivir en climas secos. En climas cálidos húmedos los conidios pueden retomar su ciclo de vida y ser diseminados a través de la lluvia, viento e insectos (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

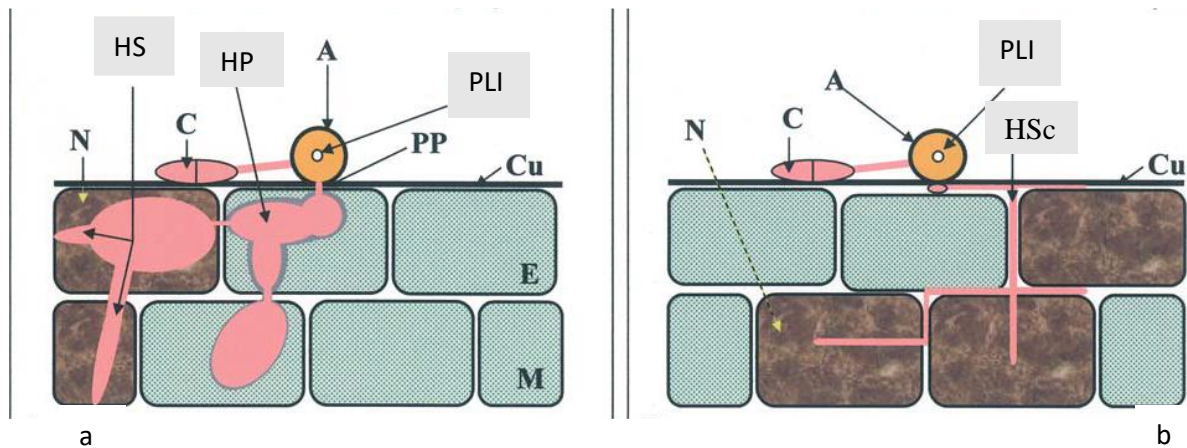


Fig 3 - 2. Estrategias de infección adoptadas por las especies de *Colletotrichum* spp. Apresorio (A) Conidia, (C). Germinación y forma del apresorio: el apresorio produce un poro de penetración y punto de apoyo (PP) el cual penetra la cutícula (Cu) del hospedante como resultado se observa un punto de luz interna (PLI) que puede ser visto en el apresorio. **a:** Hemibiotrófos intracelular: el apresorio realiza un poro de penetración en las células de la epidermis y produce una vesícula de infección y una hifa alargada, llamada hifa primaria (HP) la cual puede colonizar la epidermis adyacente (E) y células del mesófilo (M) durante las etapas tempranas en este tipo de colonización, la interacción entre el hospedante y el patógeno es biotrófica (células vivas representadas en color verde) y las células muertas o necróticas (N) (son representadas en color café). La interacción está caracterizada por medio de la formación de finas hifas secundarias (HS) las hifas secundarias crecen intra e intercelularmente mientras secretan enzimas que degradan la pared celular y matan las células del hospedante. **b:** Necrotrófica intramural subcuticular: la colonización inicial se produce a través de hifas subcuticulares (HSc), e hifas intramurales, la fase biotrófica es muy corta o no ocurre. El hongo rápidamente se disemina a través del tejido y crece tanto inter como intracelularmente (Adaptado de Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

Adicionalmente, las malas prácticas de manejo en cuanto al tratamiento de restos de material vegetal, herramientas o semillas contaminada, contribuyen significativamente a la dispersión del patógeno (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

La capacidad de la antracnosis en causar infecciones latentes o quiescentes la sitúan entre las más importantes enfermedades de postcosecha, con numerosos grupos de cultivo afectados (Levin et al., 2007).

El objetivo de este capítulo fue evaluar al complejo *Glomerella* / *Colletotrichum* y sus interacciones bajo condiciones seminaturales en una rotación soja – maíz.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Experimentación seminatural en condiciones parciales de invernadero.

Para el cumplimiento del objetivo planteado en este capítulo se realizó un experimento de siembra de variedades de soja sobre rastrojo de maíz como cobertura en suelo y en condiciones parcialmente controladas de invernadero ubicado en la Facultad de Cs Agrarias de Universidad Nacional de Rosario, en el que se reemplazó la cobertura plástica superior por una malla antigranizo para que las plantas estuviesen expuestas a las condiciones de humedad y precipitaciones similares a las condiciones naturales (Fig. 3 - 3a).

El diseño utilizado en este experimento, fue de 3 bloques al azar con 3 repeticiones. Se sembraron los mismos 3 cultivares de soja, seleccionados por su comportamiento diferencial frente a G/C, y evaluados en el capítulo I 2 (I 2.2.3): cv Corsoy 79 (S), cv DM4870 (MR) y el cv 155 (R). Se simuló un sistema de cultivo en siembra directa sobre residuos de cosecha de maíz infectados con aislados conocidos causales de antracnosis. Los trozos de cañas de maíz que provenían de tallos inoculados e infectados de manera independiente con cada uno de 5 aislados de *Colletotrichum* spp (Capítulo II 2 Tabla 3 - 1;) se distribuyeron entre los surcos y sobre la línea de siembra de cada cultivar de soja. Este residuo fue utilizado como fuente de inóculo primario de G/C (Fig. 3 -.3).

Cuadro 3 - 1 Procedencia y hospedante de los aislados de *Glomerella* /*Colletotrichum* asociados al rastrojo de maíz infectado en ciclo anterior y que fue utilizado como fuente de inóculo seminatural en soja en condiciones de invernadero.

Aislados de <i>Colletotrichum</i> (AC)	Identificación por marcadores morfológicos	Procedencia	Hospedante
AC 1	<i>C. graminicola</i>	Pergamino (Bs As)	Maíz
AC 6	<i>C. graminicola</i>	Bombal(Sta. Fe)	Maíz
AC 13	<i>C. graminicola</i>	Elortondo(Sta. Fe)	Maíz
AC 16	<i>C. truncatum</i>	Banderalao (Bs As)	Soja
AC 32	<i>C. gloeosporioides</i>	Firmat(Sta. Fe)	Soja

El diseño de muestreo fueron bloques con 3 repeticiones, donde en cada bloque (surco) se sembraron 10 semillas por aislado, haciendo un total de 30 plantas por genotipo por aislado (Fig 3 - 3b - c) (Total: 450 plantas), los rastrojos se ubicaron en la línea de siembra de las variedades simulando un sistema de siembra directa (Fig 3 - 3d).

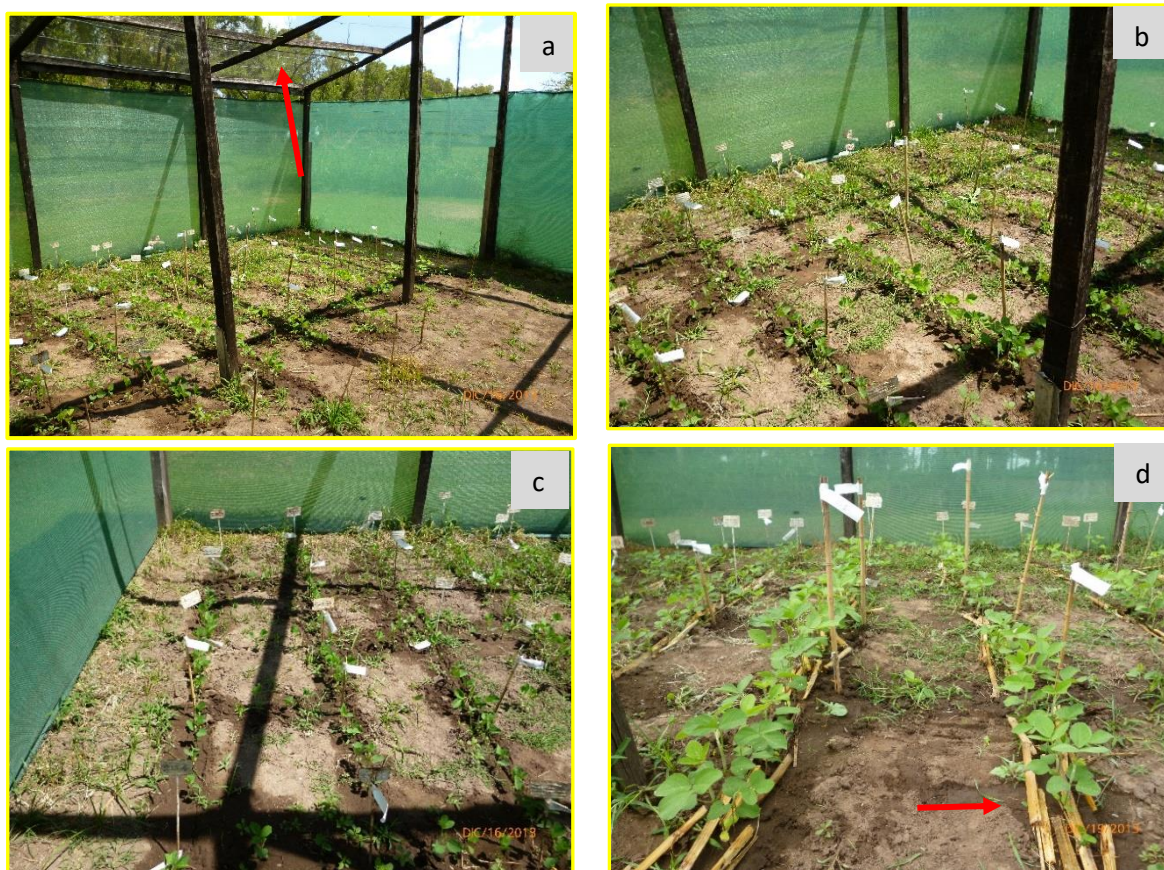


Fig 3 – 3: **a:** invernadero con cobertura plástica superior con una malla antigranizo (flecha roja); **b y c:** siembra de los surcos con las variedades de soja; los carteles blancos que se observan indican cada aislado de *Colletotrichum* (AC); **d:** variedades de soja con los rastrojos de maíz (flecha roja).

3.2.2 Evaluación y cuantificación de la enfermedad.

La reacción de la enfermedad fue evaluada y cuantificada semanalmente en base a la expresión fenotípica de los síntomas de antracnosis observados en los entrenudos del tallo de soja (Fig. 3 - 4 a y b). En cada uno de los momentos de evaluación se registró el valor de Severidad de entrenudos promedio (SE %) con la *Escala de Severidad modificada, con 5 grados*, propuesta en el Capítulo I 2, basada en el porcentaje (%) de área con atizonamiento (síntomas) y/o acérvulas (signos) de la antracnosis observados sobre los entrenudos individuales, descrita en el Capítulo I 2 (I 2.2.1e).

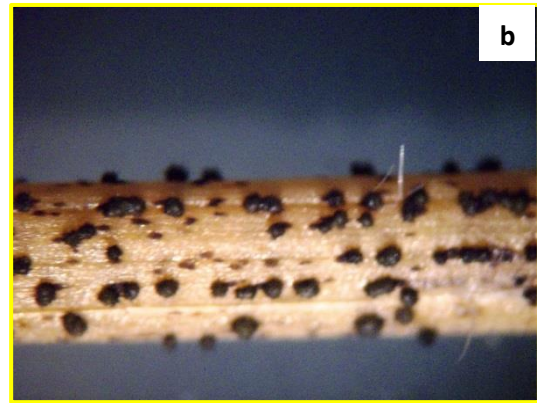
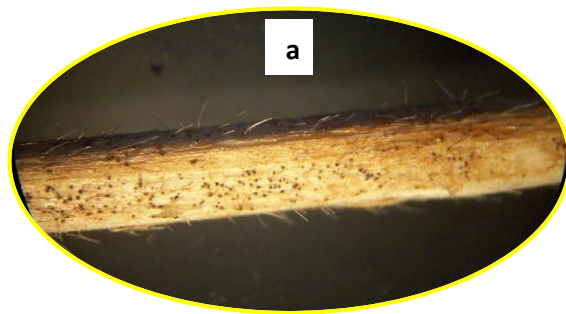


Fig 3- 4: **a:** tallos de soja con síntomas de atizonamiento con presencia de acérvulas (signos) distribuidas al azar; **b:** tallos de soja con presencia de acérvulas distribuidas al azar y en forma lineada.

El experimento se condujo de manera similar durante dos ciclos agrícolas (años), los datos fueron analizados por un análisis de la variancia (Anova) factorial basado en: 3 bloques por 5 aislados de *Glomerella* /*Colletotrichum* por 3 genotipos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Resultados de los dos ciclos agrícolas

Las evaluaciones estuvieron basadas en el registro de SE% observado en los entrenudos de los tallos de soja infectados naturalmente a partir de ascosporas y conidios diseminados desde de las fructificaciones de *Glomerella /Colletotrichum* (G/C) generadas sobre las cañas (rastros) de maíz infectados con cepas de *Colletotrichum* del ciclo de cultivo anterior. Es oportuno considerar, además que los aislados provienen de hospedantes maíz y soja.

Hubo diferencias significativas entre los años (F:37,6 < 0.0001), cultivares (F:75,5 < 0.0001) y aislados (F:12,1 < 0.0001) con sus respectivas interacciones que también fueron significativas, en todas sus combinaciones (Tabla 3 -1).

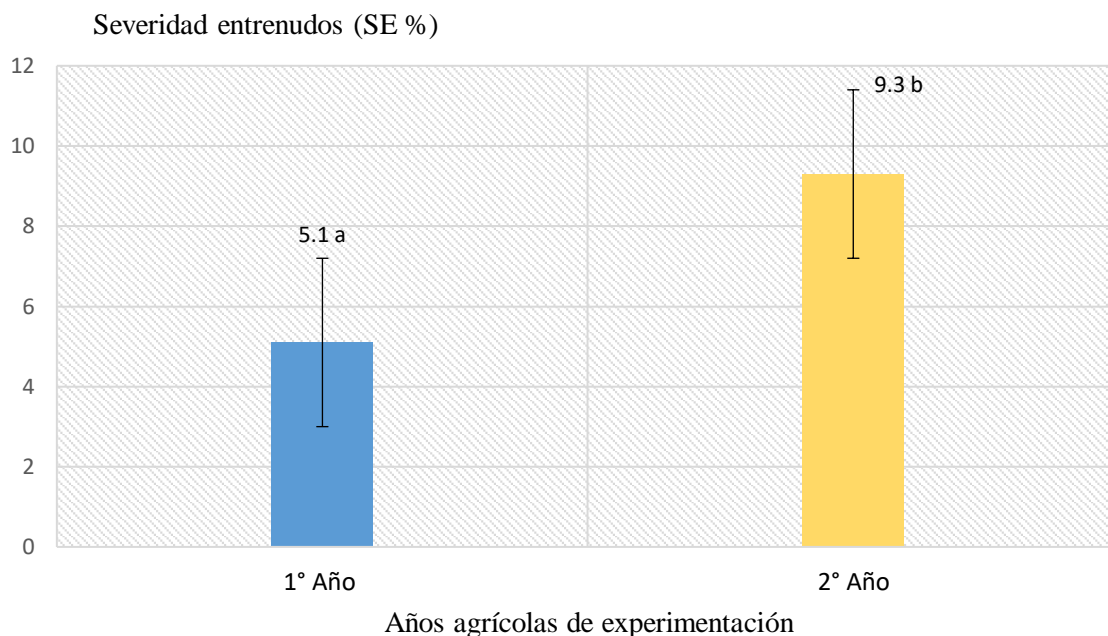
Tabla 3 -1: Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I) de las interacciones entre años, cultivares y aislados.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2548,22	44	57,91	17,84	<0,0001
Años	122,76	1	122,76	37,82	<0,0001
Cultivares	493,25	2	246,63	75,98	<0,0001
Aislados	158,28	4	39,57	12,19	<0,0001
Entrenudos	883,57	6	147,26	45,36	<0,0001
Años x Cultivar	97,21	2	48,60	14,97	<0,0001
Año x Aislados	89,35	4	22,34	6,88	<0,0001
Cultivar x Aislados	179,39	8	22,42	6,91	<0,0001
Error	10371,45	3195	3,25		

Los valores medios de severidad (SE %) de antracnosis analizados por el Test de comparación de medias LSD mostraron diferencias entre años, entre cultivares de soja y entre aislados de G/C que infectaron el rastrojo de maíz.

En la Fig 3 - 5, se observan diferencias significativas en la presencia de la enfermedad en los dos ciclos agrícolas, la mayor severidad se presentó en el 2° año agrícola con un valor de 9,3 SE%, en contraposición con el 1° año con 5,1 SE%. (F: 37,82; p<0,0001).

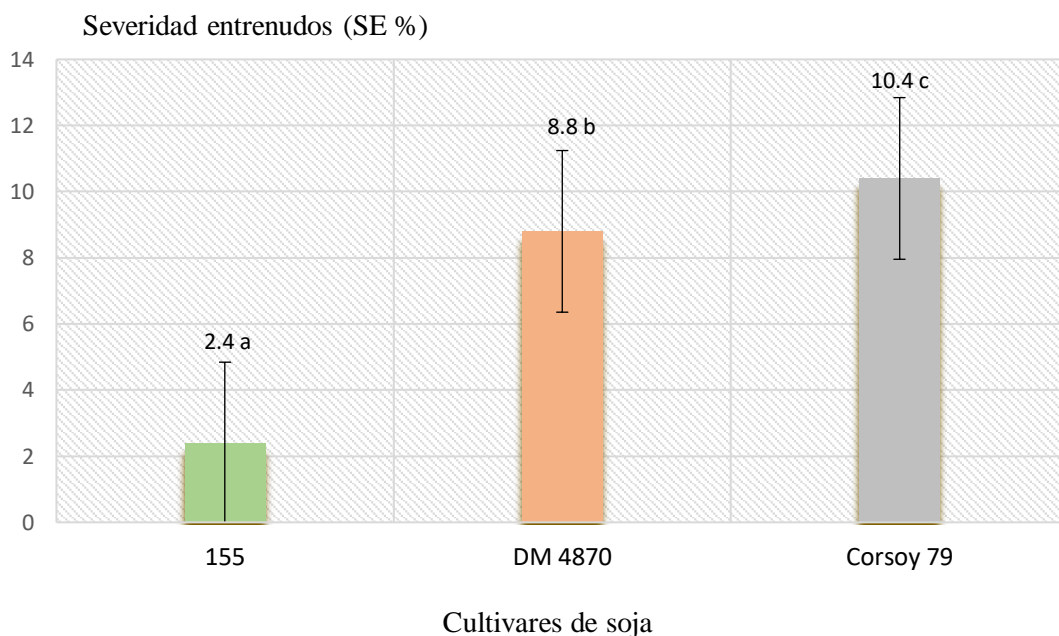
Figura 3 - 5: Comparación de los 2 ciclos agrícolas, expresados por los valores promedios de Severidad en porcentaje (SE %) de los tallos de soja de 3 genotipos: cv Corsoy 79; cv DM4870 y cv 155, infectados con rastros de maíz inoculados con 5 cepas *Colletotrichum* spp.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En cuanto a los cultivares analizados tuvieron un comportamiento diferencial en su respuesta a la infección por los 5 aislados inoculados naturalmente. El cv Corsoy 79 tuvo un comportamiento acorde a un genotipo susceptible con valores de SE% de 10,4, mientras que el cv 155 respondió frente a todas las cepas como resistente presentando valores de 2,4 SE%. Por su parte, el cv DM4870 comercial se evaluó como moderadamente susceptible con valores de 8,8 SE %., este cultivar se mantuvo en forma intermedia con respecto a los otros cultivares (F: 75,98; $p < 0,0001$) (Fig 3 -6).

Figura 3 -6: Comparación de los cultivares estudiados expresados por los valores promedio de la Severidad en porcentaje de 3 cultivares de soja en su respuesta a la infección por 5 aislados de *Colletotrichum* spp en los rastrojos de maíz.

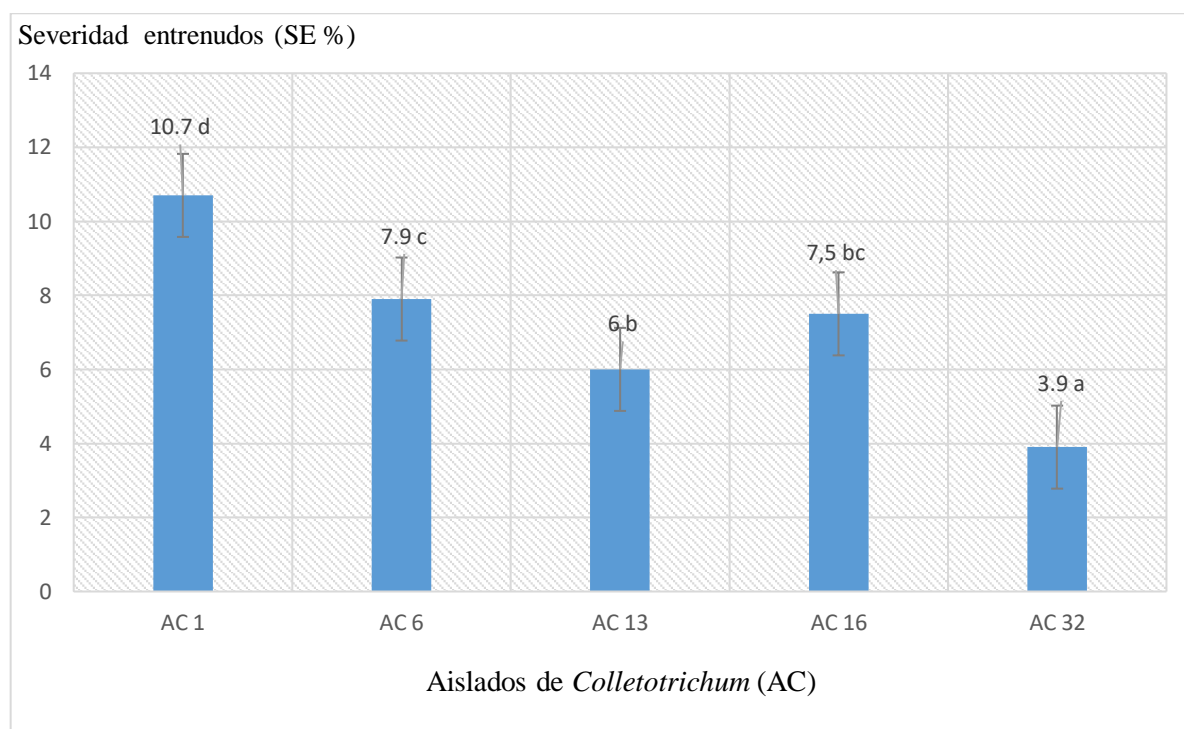


Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Respecto al germoplasma fúngico se observaron diferencias significativas entre los distintos aislados de *Colletotrichum* spp, provenientes de los hospedantes soja y maíz, que fueron inoculados en las cañas de maíz y actuaron como rastrojo de cobertura (F: 12,19; $p < 0.0001$).

En la Fig 3 - 7 se observa que el rastrojo infectado con los aislados AC1, AC6 provenientes de maíz y AC16 cuyo hospedante es soja, actuaron como fuente de inóculo más virulenta, donde *C. graminicola* y *C. truncatum*, mostraron su capacidad infectiva natural, el AC13, hospedante maíz tuvo una actuación intermedia. El menos virulento resultó el AC 32, cuya especie es *C. gloeosporioides* (Tabla 3 – 1).

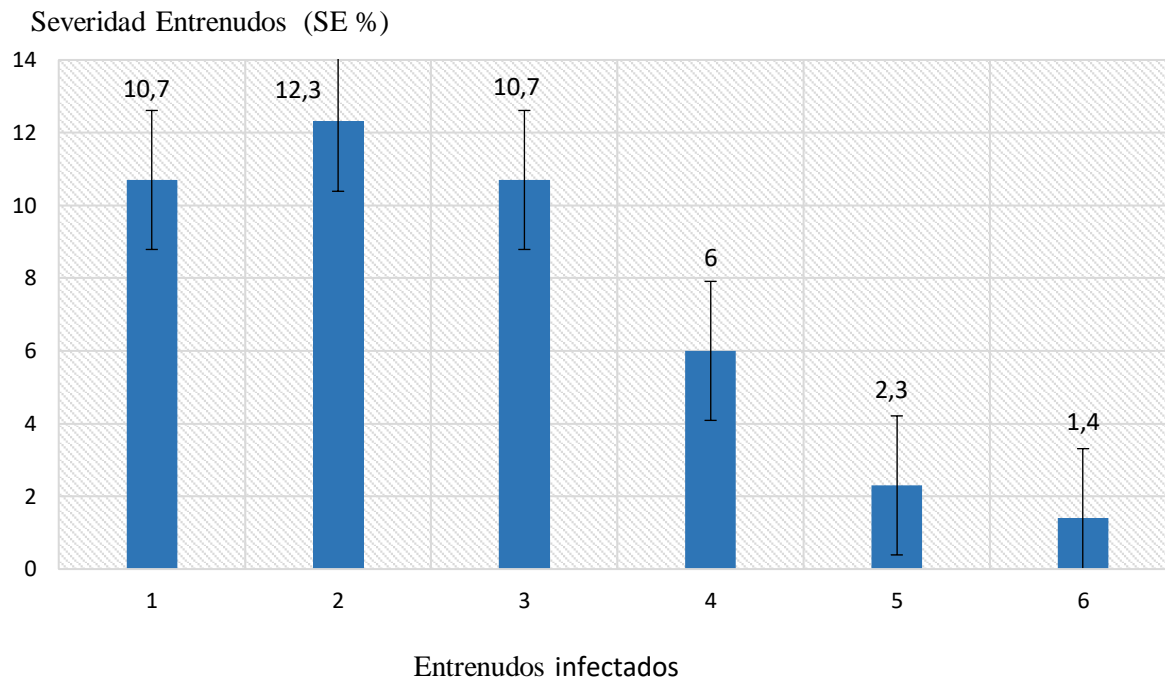
Figura 3 - 7: Comparación de los aislados estudiados, expresados por los valores promedio de la Severidad de entrenudos (SE %) indicados en porcentaje.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En cuanto a la severidad evaluada en los tres entrenudos infectados con *Colletotrichum*, si bien no hubo diferencias significativas entre los entrenudos, se pudo observar que el 2°entrenudo fue el más afectado con valores de SE % mayor, siguiendo el 1° y 3° entrenudo con valores similares, mientras que la infección disminuye hacia los entrenudos superiores a partir el 4° hasta el 6° entrenudo evaluado. Se observa una mayor presencia de la enfermedad en los primeros 3 entrenudos de los genotipos evaluados (Fig 3 - 8) (F: 45,36, $p < 0,0001$).

Figura 3 - 8: Valores promedio de Severidad expresado en porcentaje de los entrenudos infectados (SE %) en cultivares de soja en su respuesta a la infección por los aislados de *Colletotrichum* spp.

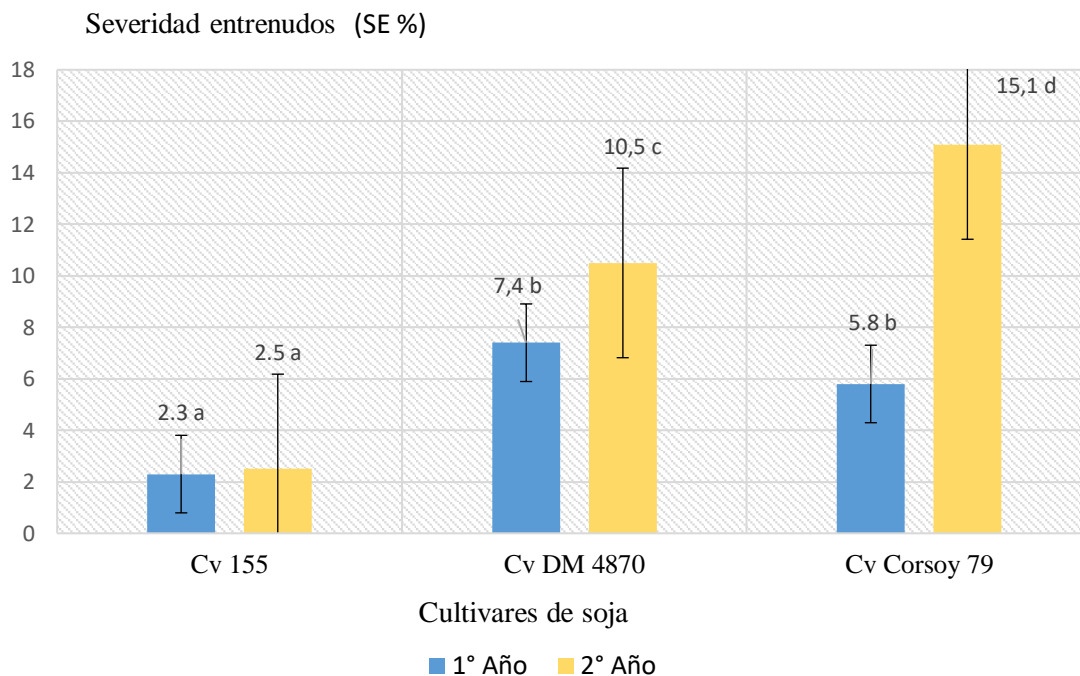


Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Al analizar la interacción de los años agrícolas evaluados y los genotipos (cultivares) de soja se observaron diferencias significativas ($F: 14,97, p < 0,0001$) en la SE %.

En base a las reacciones de resistencia / susceptibilidad de los genotipos de soja evaluados en condiciones de invernadero (Capítulo I 2, Fig I 1 – 21) la respuesta en condiciones seminaturales fue la siguiente: el cv 155 considerado en su respuesta como resistente (R) mantuvo esa misma condición en ambos años, el cv comercial DM 4870 calificado como un material moderadamente susceptible (MS), conservó esta respuesta intermedia con respecto a los otros cultivares en ambos años, el c Corsoy 79 tuvo un comportamiento moderadamente susceptible (MS) en el 1° año de experimentación, mientras que en el 2° año su respuesta fue como susceptible (S) (Fig 3 - 9). El ambiente del 2° año promovió una interacción compatible y más favorable a la antracnosis sobre los cvs Corsoy 79 y DM 4870.

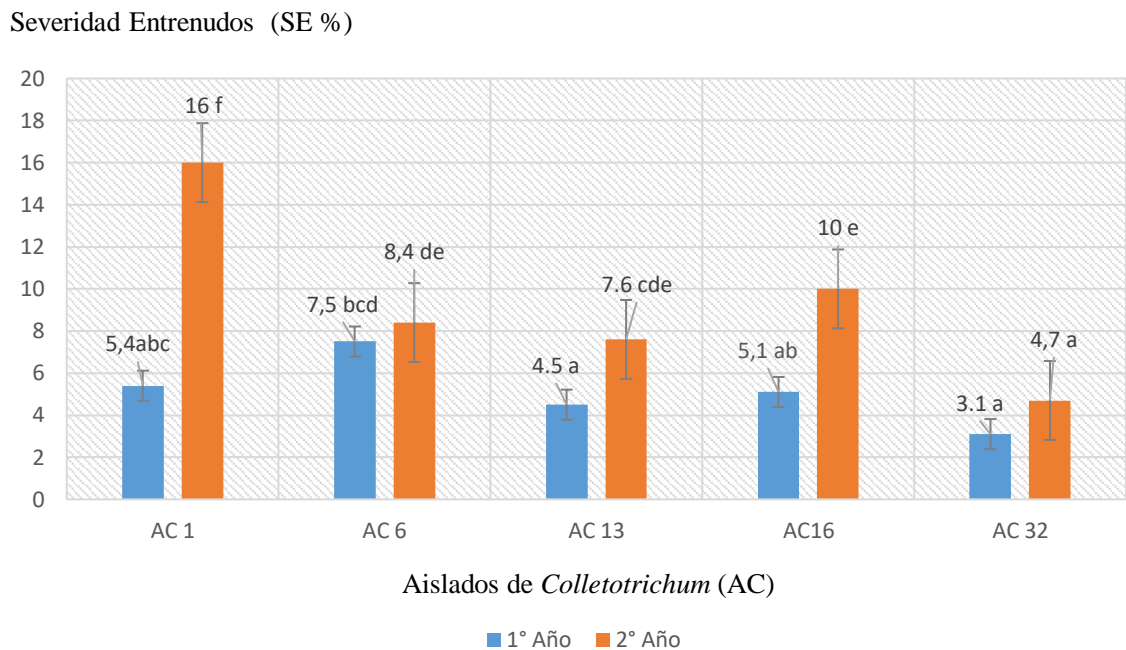
Figura 3 - 9: Valores de Severidad promedio, expresado en porcentaje en el comportamiento de 3 cultivares de soja en un manejo de siembra directa, con rastrojo en superficie como fuente de inóculo, en cada año agrícola evaluado.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Respecto a la interacción de los ciclos (años) agrícolas con los 5 aislados de G/C evaluados, mostraron diferencias significativas ($F: 6,88, p < 0.0001$). En la Figura 3 - 10, el 2° año de experimentación registró los mayores valores de severidad de entrenudos afectados. El aislado AC1, proveniente de maíz, generó el mayor valor (16%), y el aislado AC16, de soja, un valor de 10 SE%; luego las cepas de maíz causaron valores intermedios de SE%, AC6 (8,4 SE %) y AC13 (7,6 SE %), mientras que el aislado AC32 de soja causó el valor menor (4,7 SE%). Con respecto al 1° año todos los aislados tuvieron un comportamiento similar, excepto AC6 con valor superior a la media y el AC13 con un valor menor al resto de los aislados (Fig 3 - 10).

Figura 3 - 10: Interacción año agrícola por aislado expresado en porcentaje. de los valores de severidad de entrenudos promedio.



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

En la Tabla 3- 2 se aprecia la interacción significativa entre los cultivares de soja evaluados y las 5 aislados de *Colletotrichum* spp estableciéndose las siguientes relaciones:

Interacciones Compatibles

AC1 se comportó como virulento para cv Corsoy 79 que resultó ser susceptible (S) y DM4870 que se mostró moderadamente susceptibles (MS). El AC6 resultó virulento para DM4870 y Corsoy79 expresándose como S a MS respectivamente.

Interacciones Moderadamente Compatibles

AC16 se manifestó moderadamente virulento (MV) para DM4870 que resultó MS. AC32 resultó MV para Cv Corsoy 79 cuyo comportamiento fue MS.

Interacciones Incompatibles

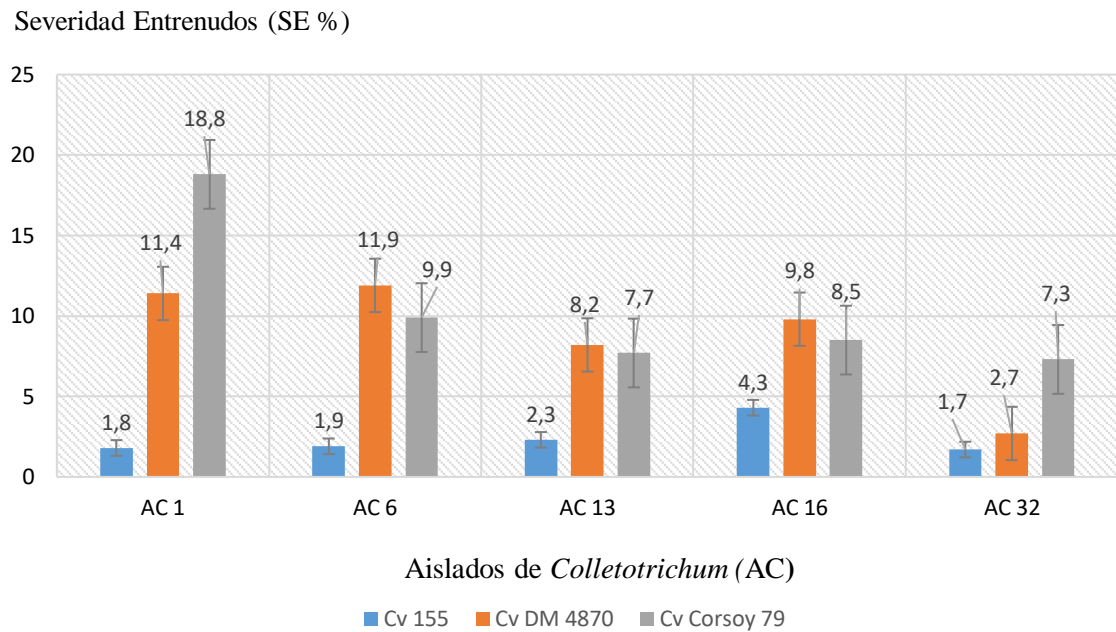
AC32 fue avirulento para Cv 155 y DM 4870. Este último resultó resistente (R) sólo frente a este aislado. Los aislados fueron todos avirulentos para Cv155 que resultó ser un cultivar R (Fig 3- 11).

Tabla 3 -2. Interacción entre cultivar (genotipo) y aislados de *Glomerella* / *Colletotrichum*

Cultivar (Cv)	Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp (AC)	Severidad / medias para cada interacción de cv por AC
155	AC 32	1.7 a
155	AC 1	1.8 a
155	AC 6	1.9 a
155	AC 13	2.3 a
DM 4870	AC 32	2.7 a
155	AC 16	4.3 ab
Corsoy 79	AC 32	7.3 bc
Corsoy 79	AC 13	7.7 c
DM 4870	AC 13	8.2 c
Corsoy 79	AC 16	8.5 cd
DM 4870	AC 16	9.8 cde
Corsoy 79	AC 6	9.9 cde
DM 4870	AC 1	11.4 de
DM 4870	AC 6	11.9 e
Corsoy 79	AC 1	18.8 f

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Figura 3 - 11: Valores de Severidad Entrenudos (SE %) promedio, expresados en porcentaje, en la interacción genotipo por aislado de *Colletotrichum*.



Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

3.3.2 Aplicación del 4° Postulado de Koch - reaislado e identificación a partir del material cosechado.

Con el objetivo de validar el agente causal en las pruebas de patogenicidad (3° PK) se tomaron porciones sintomáticas y asintomáticas de las plantas de soja cosechadas, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % y se sembraron en APGA hasta desarrollar colonias de G/C (4° PK) (Fig 3 - 12 a y b).

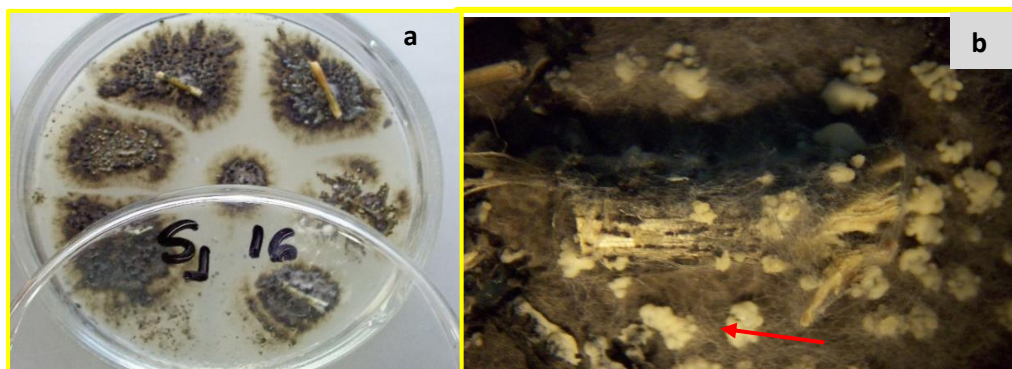


Fig 3 - 12: **a:** siembra de tallos de soja infectados con AC16 en APGA y la formación de colonias, confirmación del 4° postulado de Koch; **b:** tallos de soja infectados con AC16 mostrando la presencia de acérvulos color crema (flecha roja)

3. 4 DISCUSIÓN

El sistema agrícola utilizado en nuestro país durante las últimas 50 décadas se realizó con presencia de rastrojos en superficie, conocida como siembra directa o labranza cero. Si bien esta práctica permite avances notables en la conservación del suelo, el aspecto sanitario es un punto a trabajar por la disponibilidad y crecimiento exponencial de diferentes patógenos que se desarrollan y sobreviven en los rastrojos. En esta tesis se trabajó con un sistema de sucesiones de cultivos, ampliamente utilizado por los productores, donde se alternan cereales y oleaginosos con presencia de los respectivos restos de cosecha.

El agente causal es considerado tanto biotrófo, en una etapa breve y otro necrótrofo dando su carácter hemibiotrófo, se demostraron ambas etapas, desde la infección de soja a partir de rastrojos de maíz con presencia de *C. graminicola* y la manifestación de síntomas, con un comportamiento virulento en los distintos cultivares de soja, coincidentemente a lo estudiado por Rehka (2013) con respecto a la sobrevivencia de *C. graminicola* en el sorgo. La naturaleza destructiva de la antracnosis indicaría la existencia de un mecanismo eficiente para la supervivencia del hongo de una temporada a otra. En este contexto, el patógeno sobrevive en restos de cultivos enfermos, semillas de plantas infectadas y en hospedantes alternativos (Rehka, 2013).

Ramos et al. (2013) presentaron un primer informe de variabilidad genética en aislados de *C. truncatum* y *C. destructivum* recolectados de diferentes áreas de cultivo de soja en nuestro país, expresando que casi toda el área de cultivo de soja de Argentina se hace bajo sistemas de no labranza. Los restos de cultivo que permanecen en la superficie del suelo proporcionan condiciones óptimas para el desarrollo activo de estructuras reproductivas de *C. truncatum* y *C. destructivum*. Coincidimos a lo descripto por el autor en cuanto a la presencia de *C. truncatum* y aportamos la figura de *C. gloeosporioides* y *C. graminicola* en los cultivares de soja donde esta última especie de *Colletotrichum spp* obtuvo la mayor severidad de entrenudos infectados.

El nivel de variabilidad genética dentro de las poblaciones de patógenos de plantas proporciona una indicación de su adaptabilidad para superar la resistencia en plantas y otras medidas utilizadas para controlar el patógeno, como la aplicación de fungicidas en agroecosistemas (McDonald et al.,1989; McDonald y Linde 2002). En el presente trabajo, se suma al reporte de Ramos et al (2013) sobre la variabilidad genética en aislados de *C. truncatum*

y *C. destructivum* recolectados de diferentes áreas de cultivo de soja en Argentina. el primer antecedente de la presencia de *C. graminicola* como patógeno infeccioso en soja en nuestro país.

En el tetraedro de la enfermedad, un factor relevante, es el ambiente climático predisponente en el desarrollo de la enfermedad ; para *C. truncatum* el ambiente propicio para el progreso de antracnosis en soja, esta favorecido por temperaturas superiores a 25° C y lluvias abundantes a la madurez del cultivo, especialmente con alta densidad de siembra, donde la producción óptima de conidios ocurre entre 25 a 30 °C y mojado foliar (agua libre disponible) sobre la superficie de la hoja influyendo directamente sobre el proceso de infección y crecimiento del patógeno sobre la planta. En el caso de *C. graminicola* ocurre sobre un amplio rango de temperatura de 15 a 35 ° C, sin embargo, la penetración al hospedante ocurre sólo en el estrecho intervalo de 25 a 30°C (Bergstrom & Nicholson, 1999). En este trabajo el 2° año tuvo mayor porcentaje de severidad de entrenudos infectados, este 2 año presentó temperaturas medias menores a 25°C y bajas precipitaciones durante la etapa de fin de ciclo, donde se presenta con mayor virulencia la enfermedad, exponiendo una mayor amplitud en las condiciones predisponentes de la enfermedad (Anexo 1).

Las infecciones se produjeron con mayor severidad en el 2° entrenudo creciendo hacia arriba y hacia abajo de este punto medio, la enfermedad se concentró en estos 3 entrenudos medios, no obstante, Ramos et al., (2013) expresaron la posibilidad de la existencia de una débil capacidad de dispersión de las esporas, ya que tanto los conidios como las ascosporas están inmersas en una matriz mucosa, lo que evita la dispersión por viento. La única posibilidad de dispersión a largas distancias es mediante la transmisión de semillas, pero ambas especies no son patógenos de semillas frecuentes en la región pampeana. Sin embargo, en contraposición con Ramos et al., (2013) en los entrenudos superiores también se observó la presencia de la enfermedad, aunque en menor medida, no indicando una débil capacidad de dispersión de los mismos.

En el 2009 Crouch y Beirn, demostraron que la presencia de *C. graminicola* causa más destrucción cuando el inóculo primario se inicia a partir de residuos saprotróficos en la superficie del suelo, donde las acérvulas se forman a partir del tejido vegetal necrótico, produciendo numerosos conidios, fuente de inóculo secundario.

En cuanto la interacción genotipo por ambiente, los cultivares mantuvieron el mismo comportamiento (resistencia / susceptibilidad) en invernáculo (capítulo I 2) que en condiciones seminaturales, diferenciado los 3 genotipos: resistente, moderadamente resistente y susceptible.

Mientras que en la interacción ambiente por aislado la mayor virulencia en los genotipos de soja fue por *C. graminicola*, seguida por una severidad intermedia de *C. truncatum* y una severidad menor de *C. gloeosporioides*, patógeno no citado en soja.

En el 2007, Levin et al., mencionaron la capacidad de la antracnosis de causar infecciones latentes o quiescentes que se sitúan entre los más importantes de patógenos de postcosecha afectando a numerosos grupos de cultivo.

3.5 CONCLUSIONES

- ✚ En un sistema de rotación maíz – soja (ambos hospedantes de G/C), el rastrojo de maíz infestado de antracnosis resultó efectivo como fuente de inóculo primario de *C. graminicola*, *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* e inicio del proceso patogénico en los genotipos de soja.

- ✚ Los aislados AC1 y AC6 (*C. graminicola*) provenientes de maíz y el AC16 (*C. truncatum*) aislado de soja, luego de haber cumplido una etapa de supervivencia en rastrojo de maíz, resultaron ser los más virulentos para generar infecciones primarias en los genotipos de soja evaluados.

- ✚ Los genotipos de soja, en las condiciones de este experimento expresaron un comportamiento diferencial frente a los aislados G/C evaluados, mostrando una respuesta resistente (cv 155), moderadamente resistente (cv DM 4870) y susceptible (cv Corsoy 79).

- ✚ Se registraron interacciones significativas entre:
 - años por genotipos de soja, tal lo observado en el cv DM 4870 y Corsoy 79.
 - años por aislados de G/C, tal lo observado en AC1, AC13 (*C. graminicola*) y AC16 (*C. truncatum*).
 - genotipo por aislado, tal lo observado en la reacción de los cultivares DM 4870 y Corsoy 79 frente a las infecciones primarias ocasionadas a partir de rastrojo infectado por los diferentes aislados de G/C.

- ✚ El cv 155 se expresó como resistente a G/C en ambos años y el aislado AC6 (*C. graminicola*) resultó ser el más virulento sobre los genotipos de soja, teniendo similar comportamiento en los dos ciclos evaluados. Considerando la estabilidad del genotipo cv 155 en su comportamiento, resulta relevante para ser incluido como progenitor resistente y el aislado virulento AC6 para ser incorporado en programas de resistencia a antracnosis o en evaluaciones de las interacciones planta-patógeno.

- ✚ Tanto en inoculaciones forzadas (Capítulo 2) como en condiciones seminaturales (Capítulo 3), se definieron los 3 tipos de relaciones y se validó el comportamiento de incompatibilidad o de Resistencia (cv155), moderadamente resistente (cv4870) y compatible o de Susceptibilidades (cv Corsoy).

- ✚ La presencia de la enfermedad se manifestó en los 3 primeros entrenudos de soja, siendo los más afectados el 2° y 3°, evidenciando la capacidad de dispersión de las esporas a partir de las fructificaciones (peritecios *Glomerella* /acérvulas *Colletotrichum*) desarrolladas en el rastrojo de maíz.

- ✚ Se demostró que *C. gloeosporioides* (AC32) es una especie de G/C activa y efectiva en el proceso de infección de maíz - supervivencia en rastrojo de maíz y posterior infección en soja.

CONCLUSIONES FINALES

La relevancia a nivel mundial de la producción de los cultivos extensivos – soja y maíz– se basa en la provisión de materia prima y derivados alimenticios para el hombre, animales y otros aportes benéficos para estabilidad del suelo y microorganismos, el presente trabajo de tesis realiza un avance significativo en el conocimiento biológico y epidemiológico de la antracnosis, enfermedad común a ambos hospedantes, causada por un complejo de tres especies del binomio genérico *Glomerella Colletotrichum* (*C. truncatum*, *C. graminicola* y *C. gloeosporioides*) de amplia variabilidad genética y especificidad fisiológica capaces de interactuar con diferentes genotipos de un mismo hospedante y/o diferentes hospedantes.

Respecto a los objetivos planteados, a través del desarrollo de tesis se logró validar la identidad de un conjunto de aislados de *Colletotrichum*, causales de antracnosis, pertenecientes a tres especies: *C. truncatum*, *C. graminicola* y *C. gloeosporioides* mediante marcadores morfológicos y moleculares; demostrando además la diversidad de su origen agroecológico y de diferentes hospedantes gramíneas, oleaginosas y frutales. Se determinó, además y particularmente, la presencia de *C. graminicola* en maíz, *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* en el hospedante soja, *C. truncatum* en alfalfa y *C. gloeosporioides* en mandarina. La caracterización morfológica corroboró la presencia autóctona de conidios de *C. graminicola*, hospedante maíz, con conidios menores a los presentados por Manandhar y Hartmanet al., (1999), con forma de hoz y media luna. Y de *C. truncatum* con conidios curvos, delgados, no tabicados redondeados en el extremo y más largos que los descriptos por varios autores. La validación molecular por la técnica de RAPDs y la secuenciación de los fragmentos amplificados de primers ITs fue clave como herramienta auxiliar y complementaria que validó y fortaleció la identificación mediante marcadores morfológicos. A partir de los resultados obtenidos se alcanzó el cumplimiento del primer objetivo y, además, se demostró la presencia

de *Colletotrichum* en el área pampeana y la relevancia de la variabilidad patogénica al interactuar con los genotipos evaluados desafiando la resistencia efectiva del hospedante y promoviendo diferentes comportamientos frente al patógeno. Por lo tanto, se acepta la hipótesis 1 que plantea la variabilidad entre los genotipos y entre los aislados de G/C de diferentes agroambientes argentinos.

La implementación y desarrollo de los bioensayos para evaluar interacciones entre cultivos y patógenos del G/C permitió confirmar la aplicación del postulado de Koch 3 (inoculaciones) y el postulado de Koch 4 (reaislamiento del patógeno causal) para antracnosis en soja y maíz. Se validaron los métodos de inoculación en soja y maíz, logrando desarrollar infecciones efectivas y el reaislamiento del patógeno causal de antracnosis, dando cumplimiento al postulado 3 y 4 de Koch. La escala de severidad aplicada para cuantificar la antracnosis, expresada por el parámetro de severidad en entrenudos del tallo de ambos cultivos, permitió diferenciar el comportamiento de los genotipos vegetales (resistente / susceptible) y fúngicos (avirulento / virulento).

Respecto a la Antracnosis en soja, se observó que la sintomatología tuvo un avance tanto acrópeto como basípeto a partir del segundo entrenudo o punto de inoculación, y amerita destacarse que el 10 % de los tallos inoculados presentaron acérvulas distribuidas en forma alineada, sintomatología no reportada previamente para antracnosis. La evaluación de las interacciones soja – G/C mostró que el aislado AC 24 (*C. gloeosporioides*) obtenido de mandarina fue el más virulento en generar antracnosis en soja. Y respecto del comportamiento diferencial de las cepas de *C. graminicola* obtenidos de maíz, el aislado AC13 no diferenció genotipos de soja de comportamiento resistente o susceptible; mientras que el AC1 resultó virulento sobre el genotipo cv 155 (potencialmente resistente) quien resultó fenotípicamente susceptible a esta cepa de G/C.

En referencia a la antracnosis en maíz, se observó el avance acrópeto de la enfermedad en los entrenudos del tallo (caña). Los aislados G/C c evaluados a través de las interacciones con distintos genotipos de un mismo hospedante o diferentes hospedantes (cereal y leguminosas), expresaron distinto grado de avirulencia/virulencia. Los aislados de *Colletotrichum* spp. de mayor virulencia en maíz fueron AC16 (*C. truncatum*) y AC32 (*C. gloeosporioides*) provenientes de soja y el AC24 de mandarina, en ambos años agrícolas, demostrando el riesgo epidemiológico de la enfermedad en diferentes secuencias de cultivos. Se caracterizó diferencialmente a los híbridos AX 878, Sy 1979 y Sy 747 como resistente, moderadamente resistente y susceptible, respectivamente. Resultando el genotipo AX 878 una fuente potencial de resistencia antracnosis en maíz. La caracterización de los genotipos de los cultivos estudiados de acuerdo a su respuesta de resistencia, MR/MS o Susceptibilidad, resultará de suma utilidad para su potencial incorporación en programas de mejoramiento. A partir de estos resultados se logró cumplimentar del segundo objetivo y, además, se demostró las inoculaciones artificiales o pruebas de patogenicidad fueron efectivas al ser aplicadas en diferentes genotipos de soja y maíz promoviendo el desarrollo de la enfermedad desde la penetración y la infección en condiciones semicontroladas de invernadero o pequeñas parcelas. Como resultado del estudio de estas interacciones PPA se diferenciaron genotipos R/S y cepas de GC Av/v, permitiendo aceptar la hipótesis 2.

Asimismo, para dar cumplimiento al tercer objetivo se evaluó al complejo *Glomerella/Colletotrichum* y sus interacciones con tres genotipos de soja bajo condiciones seminaturales, y en una rotación maíz – soja. En este sistema, la técnica de inoculación natural basada en la disponibilidad de rastrojo de maíz infectado en superficie, resultó efectiva y permitió detectar el comportamiento diferencial de los genotipos (resistente, moderadamente resistente y susceptible) de soja frente a los aislados de G/C asociados al residuo de cosecha.

De esta manera en el marco de ésta tesis, se demostró que en un sistema de rotación maíz – soja (ambos hospedantes de G/C), el rastreo de maíz infestado en ciclos anteriores con cepas originalmente de soja y maíz, resultó efectivo como fuente de inóculo primario de *C. graminicola*, *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* e iniciar el desarrollo de antracnosis en los genotipos de soja. Los aislados AC1 y AC6 (*C. graminicola*) provenientes de maíz y el AC16 (*C. truncatum*) obtenido de soja, luego de haber cumplido una etapa de supervivencia en rastreo de maíz, resultaron ser los más virulentos para generar infecciones primarias en los genotipos de soja evaluados. Mientras que *C. gloeosporioides* resultó ser una especie de G/C activa y efectiva en el proceso de infección de maíz - supervivencia en rastreo de maíz y posterior infección en soja. Por su parte, los genotipos de soja, en las condiciones de este experimento, expresaron un comportamiento diferencial frente a los aislados G/C evaluados, resultando fenotípicamente resistente (cv 155), moderadamente resistente (cv DM 4870) y susceptible (cv Corsoy 79) frente la antracnosis. En el contexto de la variabilidad genética vegetal y fúngica detectadas, se registraron interacciones significativas entre años por genotipos de soja e interacciones años por aislados de G/C. Observándose, además, interacciones específicas entre determinados genotipos de soja y cepas fúngicas. No obstante, en los dos ciclos evaluados, el cv 155 se expresó como resistente a G/C y el aislado AC6 (*C. graminicola*) resultó ser el más virulento sobre los genotipos de soja. La estabilidad del genotipo cv 155 en su comportamiento frente a la antracnosis avala su selección como progenitor resistente. Y respecto a la virulencia, el aislado proveniente de maíz podrá ser incorporado en próximas evaluaciones de interacciones planta - patógeno.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis aportan información relevante sobre las etapas de parasitismo y supervivencia del ciclo biológico del patógeno *Glomerella Colletotrichum*, las respuestas fisiológicas y genéticas de los hospedantes y la importancia

epidemiológica de la antracnosis que afecta a los cultivos soja y maíz, relevantes para la macroregión tanto por el área sembrada como por los recursos económicos y alimentarios que generan. Este contexto conduce a repensar las prácticas agrícolas y la rotación de cultivos dentro del manejo cultural, las estrategias químicas y fundamentalmente las herramientas genéticas como promotoras del mejoramiento vegetal e incorporación de resistencia a enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

Afanador-kafuri, L.; Dror, M.; Maymon, M; Stanley F. 2003. Caracterización de los aislados de *Colletotrichum* de Tamarillo, Passiflora y Mango en Colombia e identificación de una especie única del género. *Fitopatología* 93 (5): 579-87.

Agrios, G. N. 2005a. *Fitopatología*. Ed Limusa. 2^{da} Edición. 819 pp.

Agrios, G. 2005 b. Diseases caused by Ascomycetes and Deuteromycetes (mitosporic fungi). Pages 483-500 in: *Plant Pathology*, fifth ed. Elsevier Academic Press, Boston

Agueci, D.; Tettamanti, N.; Pioli, R.; Feldman S.; Leguizamón, E. 2005. Relevamiento de EFC y Roya Asiática de la soja en especies Leguminosas. *Agromensajes FCA-UNR*. Edición Diciembre 17:38-39.

Aizen, M; Garibaldi, L y Dond, M. 2008. Expansión de la soja y diversidad de la agricultura argentina. *Ecología austral* v.19 n.1 Córdoba.

Ainsworth, G.; Gorrión, F.; Sussman, A. 1973. *Los hongos: un tratado avanzado*. IV (B): 504 pp.

Alameda, I. 2005. Distribución vertical y temporal de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) sobre una siembra comercial de Gandul (*Cajanus Cajan* L.) Tesis Grado De Maestro en Ciencias en Biología. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez.

Alexopoulos, C.; Mims, C.; Blackwell, M. 1996. *Introductory mycology. Applied Microbiology*. New York: Wiley and Sons. 243 – 247pp.

Malraqibshamran, Z. S.; Lateef Al-Awsi, G. R., Khamis, A. S.; Tolaifehy, Z; Jameel, Z. 2018. Rapd-PCR is a good dna fingerprinting technique to detect phylogenetic relationships among staphylococcus aureus isolated from different sources in hilla city, iraq. *Biochem. Cell. Arch.* Vol. 18, Supplement 1, 1157-1161 pp.

- Anderson, K.; Buchwaldt, L.; Sillero, J. y Gossen, B. D. 2000. Host range of *Colletotrichum truncatum* from lentil. (Abstr.) Can. J. Plant Pathol. 22:180.
- Andrus, C. y Moore, W. 1935. *Colletotrichum truncatum* (Schw.), on garden and lima beans. Phytopathology 25, 121-125.
- Armstrong-Cho, C. y Banniza, S. 2006. *Glomerella truncata* sp. nov., the teleomorph of *Colletotrichum truncatum* Crop Development Centre, University of Saskatchewan, 51 Campus Drive, Saskatoon, Canada.
- Armstrong-Cho, C.L.; Banniza, S. 2006. *Glomerella truncata* sp. nov., the teleomorph of *Colletotrichum truncatum*. Mycol. Res. 2006, 110, 951–956 pp.
- Badu-Apraku, B., Gracen, V. y Bergstrom, G. 1987. A major gene for resistance to anthracnose leaf blight in maize. Plant Breed. 98:194-199 pp.
- Bailey, J.A. and Jeger, M.J. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International. Wallingford, UK.
- Barbieri, M., Ciampi-Guillardi, M., Moraes, S.; Bonaldo, S. , Rogério, F., Linhares, R. y Massola, N. 2017. Primer informe de *Colletotrichum cliviae* causante de antracnosis en la soja en Brasil. Enfermedades de las plantas, 101 (9), 1677-1677 pp.
- Barker, I. y Pitt, D. 1987. Selective medium for the isolation from soil of the leaf curl pathogen of anemones. Transactions of the British Mycological Society 88:553–555 pp.
- Barnett, H. y Hunter, B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Baxter A.; Westhuizen, G.; Van D. y Eicker, A. 1983. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. South African Journal of Botany 2: 259 - 289 pp.

Bellé, C., Ramos, R. , Gabriel, M.; Kaspary, T; Lima de Brida, A. 2019. *Colletotrichum gloeosporioides* causing leaf anthracnose on *Oxalis corniculata* in Brazil. Australasian Plant Pathology Society Inc. Planta de Australasia Dis. Notas 14: 36.

Benavidez, R.; Pioli, R.; Morandi, E.; 2010. Response of the edamame edible soybean germplasm to *Diaporthe phaseolorum*, causal agent of soybean stem canker, in Argentina. - Tropical Plant Pathology. 48-51pp.

Beno, D.; Prusky, D. 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. Phytopathology, Saint Paul, v.90, n.5, 553 – 559 pp.

Bentancur, E.; Borges, R. 2002. Descomposición de rastrojo de cultivos en siembra sin laboreo: trigo, maíz, soja y trigo después de maíz o de soja. Agrociencia. Vol.VI. N° 1. 20-26 pp.

Bergstrom, G.C.y Nicholson, R.L. 1999. The biology of corn anthracnose: Knowledge to exploit for improved management. Plant Disease 83: 596-608.

Bisang, R. 2008. La agricultura argentina: cambios recientes, desafíos futuros y conflictos latentes. *Boletín Elcano* (106). 7 pp.

Bolsa de Comercio de Rosario. 2003. Boletín informativo. Anuario. N° 40. 2005 – Año X. www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/aves/informes/boletines/archivos/.

Boning, K. y Wallner, F. 1936. Welke, Fusskrankheit and andere Schddigungen an Mais durch *Colletotrichum graminicolum* (Ces.) Wilson. Phytopathol. Z. 9, 99-110.

Bose, S., Sindhan, G. y Pandey, B. 1973. Studies on the die back disease of mango in the Tarai region of Kumaon. Progressive Horticulture., 1973;5:41-53.

Braithwaite, K; Irwin, J; y Manners J. 1990. Ribosomal DNA as a Molecular Taxonomic Marker for the Group Species *Colletotrichum gloeosporioides*. Ausr. Syst. BOI., 3, 733-8. Plant

Pathology Unit, Department of Botany, The University of Queensland, St Lucia, 4067, Australia.

Buchwaldt, L., Anderson, K., Morrall, R.; Gossen, B. y Bernier, C. 2004. Identification of lentil germ plasm resistant to *Colletotrichum truncatum* and characterization of two pathogen races. *Phytopathology* 94:236-243.

Buchwaldt, L., Morrall, R., Chongo, G., y Bernier, C. 1996. Windborne dispersal of *Colletotrichum truncatum* and survival in infested lentil debris. *Phytopathology* 86:1193-1198.

Bueno dos Reis J., Carvalho Mendes, F.; Dos Santos T.; Massena Reis, V. 2002. Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do Solo. Documentos 51. Embrapa. Planaltina DF. Brasil.

Cabrera, M.; Alvarez, R.; Raimondo, M; Cúndom, M; Gutiérrez, S. 2004. Importancia de las enfermedades de fin de ciclo de la soja (*Glycine max*), en el NEA. Actas Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Secretaria General de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes. Argentina. (www.unne.edu.ar).

Cabrera, M.; Cabrera, M.; Cúndom, M ; Alvarez, R.; Raimondo, M.; Paz, J. 2001. Antracnosis de la soja en el NE de Argentina. *Fitopatología Brasileira* Vol. 26. Supl. 465 (749).

Cai, L.; Hyde, K.; Taylor P.; Weir, B.; Waller, J.; Abang M, Zhang J, Yang Y, Phoulivong S and Liu Z. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39: 183-204.

Calzada, J. y Corina, S. 2017. Bolsa de Comercio de Rosario. Anuario Estadístico (Statistical Annuary). 74 pp.

Cannon, P., Buddie, A. y Bridge, P. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon*, 104: 189-204.

Cannon, P.; Bridge, P.; Monte, E. 2000. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. Cap. 1:1-20. *Colletotrichum: host specificity, pathology and host pathogen interaction*. CABI Biosciences APS Press, St. Paul, MN.

Carson, M. y Hooker, A. 1981. Inheritance of resistance to stalk rot caused by *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 71:1190-1196.

Carson, M. y Hooker, A. 1980. Inheritance of resistance to anthracnose leaf blight in five inbred lines of corn. *Phytopathology* 71:488-491.

Cardwell, K.; Hepperly, P. y Frederiksen, R. 1989. Patotipos de *Colletotrichum graminicola* y transmisión de semillas de sorgo antracnosis. *Plant Disease* 73: 255-257.

Carmona, M.; Gally, M.; Grijalba, P.; Sautua, F. 2015. Evolución de las enfermedades de la soja en la Argentina: pasado, y presente. Aportes de la FAUBA al manejo integrado. *Rev. Agronomía & Ambiente* 35(1): 37-52. FA-UBA, Buenos Aires, Argentina.

Carmona, M. 2014. Tesis Doctoral. Enfermedad de fin de ciclo y mancha ojo de rana en el cultivo de soja: desarrollo y validación de un sistema de puntuación del umbral de control. La Plata. Argentina. 180 pp.

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/34100/Documento_completo.pdfsequence=4

Carmona, M.; Gally, M.; Sautua, F.; Abello, A.; Lopez, P. 2011. Uso de mezclas de azoxistrobina y triazoles para controlar enfermedades de fin de ciclo de la soja. *Summa Phytopathologica*, v.37, n.2,.134-139 pp.

Carmona, M. 2011. Damages caused by frog-eye leaf spot and late season disease in soybean in Argentina and control criteria. *Tropical Plant Pathology* 36: 1356-1358.

Carmona, M.; Moschini, R.; Cazenave, G. y Sautua, F. 2010. Relación entre la precipitación registrada en estados reproductivos de la soja y la severidad de *Septoria glycines* y *Cercospora kikuchii*. *Tropical Plant Pathology* 35(2): 71-78

Carmona, M.; Gally, M. y Sautua, F. 2009. Identificación y Manejo de las Enfermedades. En: Manual del cultivo de soja / Fernando Oscar García; Ignacio Antonio. 99-127pp.

Carmona, M.; Reis, E. y Gally, M. 2006. Pudriciones de tallo y raíces en el cultivo de maíz. Revista maíz en siembra directa AAPRESID. Agosto de 2006. 86-89 pp.

Casela, C.; Ferreira A. y Santos, F. 2001. Differences in Competitive Ability among Races of *Colletotrichum graminicola*. In Mixtures Fitopatologia Bras. Vol.26(2) Brasilia.

Casela, C. , Santos, F. y Ferreira, A. Reaction of sorghum genotypes to the anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. Fitopatologia Brasileira 26:197-200. 2001.

Casela, C., Frederiksen, R.; Jacobs, T.; Parlevliet, J. 1993. Variability in the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola* in Brazil and USA. Durability of disease resistance. Current Plant Science Biotechnology Agriculture 18:310.

Castiglione, S; Wang, G.; Damiani, G, Bandi, C.; Bisoffi, S; Sala, F. 1993. RAPD Fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. Theor Appl Genet (1993) 87:54-59

Chen L. S.; Chu, C.; Liu, R.; y Tsay, J. 2006. PCR-based Detection and differentiation of Anthracnose Pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from Vegetable Soybean in Taiwan National Chiayi University, Chiayi, Taiwan. Phytopathology 154, 654–662.

Chowdhury, S. 1936. A disease of *Zea mays* caused by *Colletotrichum graminicolum*. Indian J. Agr. Sci. 6: 833-843.

Chongo, G.; Gossen, B. y Bernier, C. 2002. Infection by *Colletotrichum truncatum* in resistant and susceptible lentil genotypes. Can. J. Plant Pathology. 24:81–85.

Chongo, G y Bernier, C. 2000. Disease incidence, lesion size, and sporulation in *Colletotrichum truncatum* as influenced by lentil genotype and temperature. *Can. J. Plant Pathology* 22: 236-240.

Chongo, G. and Bernier, C. 1999. Field and growth chamber evaluation of components of partial resistance to *Colletotrichum truncatum* in lentil. *Can. J. Plant Pathology* 21:58-63.

Corda, A. 1831. Die Pilze Deutschlands. In: Deutschlands Flora in Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen 3 (ed. J. Sturm). Abt., tab. 21-32. Nürnberg; Sturm 12: 33-64.

Cordeiro de Almeida, L. 2005 Identificação específica de *Colletotrichum*, caracterização da agressividade e efeito de indutores químicos no controle da antracnose em maracujá amarelo Tese apresentada ao programa de pós-graduação em fitossanidade – universidade federal rural de pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor em fitopatologia. Recife –pe fevereiro, Studies on anthracnose of sorghum caused by *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson. 78 pp.

Correa Londoño; L.; Lavalett Oñate; M. y Afanador Kafuri, L. 2007. Uso de métodos multivariantes para la agrupación de aislados de *Colletotrichum spp.* con base en características morfológicas y culturales. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. Vol. 60, No. 1. 3671-3690 pp.

Crouch, J.A. y Beirn, L.A. 2009. Anthracnose of cereals and grasses. *Fungal Diversity* 39: 19-44.

Cuming, A. 2009. Plant-pathogen interactions: a view from the evolutionary basement. *New Phytology* 183, 237-239.

Dale, J.; Manners, J. y Irwin, J. 1988. *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing different anthracnose diseases on *Stylosanthes* in Australia carry distinct double-stranded RNAs. *Transactions of the British Mycological Society* 91, 671-676.

Damm, U., Woudenberg, J., Cannon, P. y Crous, P. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39: 45-87.

Dean, R.; Van Kan J.; Zacharias A. Pretorius, K. Hammond-Kosack; Di Pietro, D. Spanu y Foster, G. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 13 (4), 414–430.

Dellaporta, S., Wood, J. y Hicks, J. 1983. Una planta de minipreparación de ADN: versión II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 19-21.

Devine, T. y Breithaupt, B. 1981. Frecuencias de los alelos de respuesta de nodulación, *Rj₂yRj₄*, en la introducción de plantas de soja y líneas de reproducción. Departamento de EE.UU. Agricultura Tecnología Toro. 1628. p.42. U.S. Department. Agriculture. Technical. Bull. 1628, 42-42.

Distéfano, S. y Gadbán, L. 2007a. Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la ciclo 2006/2007. Pag. 15-21 en: Soja. Actualización 2007. Información para Extensión N° 7. EEA. Marcos Juárez. 74 pp.

Distefano; S. 2013. Informe sanitario de la campaña de soja 2012/13. E.E.A Marco Juárez, Córdoba. <https://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja-2012-13>.

Dias, M.D.; Dias-Neto, J.J.; Santos, M.D.; Formento, A.N.; Bizerra, L.V.; Fonseca, M.E.N.; Boiteux, L.S.; Café-Filho, A.C. 2019. Current Status of Soybean Anthracnose Associated with *Colletotrichum truncatum* in Brazil and Argentina. *Plants*, 8, 459.

Días, C; De Rossi, R; Couretot, L; Sillón, M.; Formento, M y Gonzalez, V. 2012. La prevalencia de antracnosis prevalencia y distribución de enfermedades del maíz en Argentina XXIX Congreso Nacional de Milho e Sorgo - Águas de Lindóia – Brasil.

Dokken, F. 2007. Submerged Fermentation of *Colletotrichum truncatum* for Biological Control of Scentless Chamomile. Thesis Submitted for obtain the Degree of Master of Science in the

Department of Applied Microbiology and Food Science University of Saskatchewan, Saskatoon.<http://hdl.handle.net/10388/etd-05312007-203817.107> pp.

Domsch, K., Gams, W. y Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. Volumes I y II. Academic Press. Londres. 860 pp.

Du, M., C. Schardl, E. ; Nuckles; Vaillancourt, L. J. 2005. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia*. 97: 641-658.

Edgerton C. W. 1914. Plus and minus strains in the genus *Glomerella*. *American Journal of Botany*. Volume I, Plate XXIII. 243- 256 pp.

Edgerton, C. 1912. Plus and Minus Strains in an Ascomycete. (Abstract) *Science*, n. s., 35: ISI.

EMBRAPA .2008 Tecnologia de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2009 e 2010.. Londrina: Embrapa Soja. 261 pp

ENAPRO.2017. Ente Adminstrador del Puerto de Rosario, <http://www.enapro.com.ar>.

European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2004. *Glomerella acutata*. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34:193–199.

Farr D.; Aime M.; Rossman A.y Palm M 2006. Species of *Colletotrichum* on Agavaceae. *Mycological Research* 110: 1395-1408.

Fernández F. y Hanlin R. 1996. Morphological and RAPD analysis of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia*, 88, 425–440.

Fehr, W.y Caviness, C.; Stages of soybean development. 1977. Special Report. 87. <http://lib.dr.iastate.edu/specialreports/87>.

- Ferraguti, F. 2014. Maíz en fechas tardías: una alternativa que llegó para quedarse. Jornada de Maíz tardío. 20 de mayo de 2014. INTAEEA Oliveros. 2 pp.
- Fisher, M., Henk, D., Briggs, C.; Brownstein, J.; Madoff, L.; McCraw, S. y Gurr, S. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194.
- Flood, J. 2010. The importance of plant health to food security. *Food Secur.* 2, 215– 231.
- Ford, R., Banniza, S., Photita, W. y Taylor, P.W.J. 2004. Morphological and molecular discrimination of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose on lentil in Canada. *Australasian Plant Pathology* 33: 559-569.
- Freeman, S.; Talma K., y Ezra S. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruit. *Plant Disease / Vol. 82 No. 6*.
- Fries, E. 1825. *Systema Orbis Vegetabilis*. Sweden, Lund; Typographica Academica 1:1- 369.
- Freeman, S., Katan, T. y Shabi, E. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from Avocado and Almond Fruits with Molecular and Pathogenicity Tests. *Applied and environment microbiology*: 62 (3):1014–1020.
- Gatica S.; Seijas C, Carmona M y Gally M. 2014. Reacción diferencial de genotipos comerciales de maíz a antracnosis (*Colletotrichum graminicola*). Actas XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. San Luis, República Argentina.
- Galli, J.; Panizzi, R. de C.; Vieira, R. 2007a. Efeito de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Phomopsis sojae* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja. *Summa Phytopathologica*, v.33, n.1,.40-46 pp.
- Gally, M., Ramos, A.M., Dokmetzian, D. & Lopez, S.E. 2007b. Genetic variability of *Phytophthora sojae* isolates from Argentina. *Mycologia*,99 (6), 877 - 883.

Garcia, F.; Ciampitti, I.; Baigorri, H. 2009. Manual del cultivo de soja. Editores- 1a ed. - Buenos Aires: International Plant Nutrition Institute. 180 pp.

Gibson, R. J. 1994. An investigation into the epidemiology and control of anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) of lentil in Manitoba. M.Sc. Thesis. University of Manitoba, Winnipeg, Canada. 85 pp.

Gimenez Pecci, M. y De Rossi, R. 2017. ¿Cuáles son las enfermedades relevantes en fechas tardías? Congreso de Maíz Tardío El mismo maíz, un nuevo desafío: Compendio primer congreso de maíz tardío. Lugar: San Isidro; Año: 2017; 107 – 125 pp. www.congresomaiztardio.com.ar › presentaciones

Giorda, L y Vallone, S. 1997. Enfermedades de la soja en la Argentina. San Juan: INTA-Centro Regional Cordoba/INTA-EEA Marcos Juarez/INTA-EEA Manfredi (INTA. Centro Regional Cordoba. Agro, 1). 72pp.

Gonçalves Barros, G. 2008. Avaliação da resistência de genótipos de soja a *Colletotrichum truncatum* e estudo da diversidade genética de isolados utilizando a técnica molecular rapd. Fesurv – Universidade de rio verde pró-reitoria de pós-graduação e pesquisa faculdade de agronomia. Rio Verde Goiás – Brasil. Programa de Pósgraduação em Produção Vegetal, <http://www.fesurv.br/producaovegetal/admin/images/pdfs/540306629.pdf>. 64 pp.

González, M.; Ferrero Holtz, E.; Moreno; G.; Svartz, H. 2015. Rotación soja-maíz: efecto de la mineralización del rastrojo sobre la producción de nitratos y el rendimiento de maíz. Revista Agronomía & Ambiente 35(1): 53-58. FA-UBA, Buenos Aires, Argentina.

Guthrie, P.; Magill, C.; Frederiksen, R. y Odvody, G. 1992. Random amplified polymorphic DNA markers: A system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology 82:832-835.

Gregory, P., Johnson, N., Newton, A., y Ingram, J. 2009. Integrating pests and pathogens into the climate change/ food security debate. Journal of Experimental Botany, 60(10), 2827-2838.

Hall, R. 1994 .Compendium of Bean Diseases. 2nd. ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Mn. USA. 73. 6 pp.

Hang, H. 2013 First Report of *Colletotrichum chlorophyti* Infecting Soybean Seed in Arkansas, United States. Plant Disease 97, 1510.

Hammerschmidt, R. 1999. Resistencia inducida a la enfermedad: ¿cómo las plantas inducidas detienen los patógenos? Physiological and Molecular Plant Pathology 55 (2), 77–84.

Hartman, G.; Sinclair, J. y Rupe, J. 1999. Compendium of soybean diseases. 4th Ed. Saint Paul MN. APS Press, The American phytopathological Society, St. Paul MN, USA. 100 pp.

Hartman, G.; Rupe, J.; Sikora,E.; Domier,L.; Davis,J. y Steffey,K. (eds.). 2015. Compendium of Soybean Diseases and Pests. Fifth Edition. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA,201pp.

Hernández, F; Pioli, R. Peruzzo, A, Formento, N y Pratta, G. 2015. Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislados de *Phomopsis longicolla* (teleomorfo desconocido: Diaporthales) de la región templada y subtropical de Argentina. Revista Biologica Tropical Vol. 63 (3): 871-884, September 2015.

Hines, R; Shaw, J y White, D. 2001. University of Illinois (0 -5) Stalk Rot Rating Scale. <http://fyi.uwex.edu/fieldcroppathology/files/2011/03/stalkrotscale.pdf>.

Holliday, P. 1980. Fungus Diseases of Tropical Crops. Cambridge University Press, Cambridge.Dover Publications, INC. New York. ISBN 0 – 486 -68647 -7. 607 pp.

Howard, C.; Maas, J.; Chandler, C; Albrechts, E. 1992. Anthracnose of strawberry caused *Colletotrichum* complex in Florida. Plant Disease. 76:976-981.

Hyde, K., Cai, L., Cannon, P., Crouch, J., Crous, P., Damm, U., Goodwin, P., Chen, H., Johnston, P., Jones, E., Liu, Z., McKenzie, E. Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.,

Pfenning, L, Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R., Tan, Y., Taylor, P., Weir, B., Yang, Y. y Zhang, J. 2009. *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity 39: 147-182.

Hyde, K.;Cai, L.; Cannon, P.;Crouch,J.;Crous,P.;Damm,U.;Goodwin,P.;Chen,H.;Johnston,P.; Jones, E. 2009. *Colletotrichum* – Names in Current Use. Fungal Diversity. 2009, 39, 147–183.

Hyde, K.; Cai, L., McKenzie, E., Yang, Y., Zhang, J. y Prihastuti, H. 2009. *Colletotrichum*, a catalogue of confusion. Fungal Diversity 29, 1–17.

Index Fungorum 2015.

<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.aspRecordID=280780>

Incremona, M.; Pioli R.; Mariatti, A.; Rodriguez Randa, E.; Bocca, P.; Barrinat, N.; Aseguinolaza; M.; Rodriguez, J. 2013a. Primer informe sobre la distribución atípica de las acervulas de *Colletotrichum* spp. sobre tallos de soja (*Glycine max* l). XV Congreso y XXXIII Reunion Anual de la Sociedad Biología de Rosario. 28 y 29 de noviembre de 2013. Facultad de Cs Agrarias. UNRosario.

Incremona, M.; Pioli, R.; Ghio, A. 2013b. Comportamiento de tres cultivares de soja frente a aislados de *Colletotrichum* de soja y maíz en condiciones semi naturales (Cátedra de Fitopatología). XV Congreso y XXXIII Reunion Anual de la Sociedad Biología de Rosario. 28 y 29 de noviembre de 2013. Facultad de Cs Agrarias. UNRosario. CC 14 (S2125ZAA) Zavalla.

Incremona, M; R. Pioli, y A. Ghio, N. 2011. Evaluación del método de inoculación y escala de severidad para cuantificar antracnosis en maíz en condiciones semi naturales. XIII Congreso y XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 162 pp.

Incremona, M; Pioli, R; Ghío, A; Formento, N. 2009 a. Caracterización morfológica de aislados del complejo *Glomerella* - *Colletotrichum* obtenidos de diversos hospedantes y regiones de argentina. XI Congreso, XXIX Reunion Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Fac. Cs. Agrarias, UNR. CC14. 2125, Zavalla, SF. 3 y 4 de diciembre 2009.

Incremona, M.; Ghío, A.; Pioli, R. 2009 b. Biodiversidad fúngica asociada a rastrojo de maíz procedente de la región productora de argentina Fitopatología, XI Congreso, XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Fac. Cs. Agrarias, UNR. CC14. 2125, Zavalla, SF. 3 y 4 de diciembre 2009.

Informe Anual de Cifras Oficiales de la Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación, SAGPyA, 2018. www.sagpya.gov.ar.

Informe Semanal. Bolsa de Comercio. 2018. AÑO XXXVI – N° 1866. Dirección de informaciones y estudios económicos. www.bcr.com.ar. 26 pp.

Informe Anual SAGyP. 2017. Estimaciones del Ministerio de Agroindustria <https://www.argentina.gob.ar/agroindustria/agricultura-ganaderia-y-pesca/subsecretaria-de-agricultura>.

Informe Semanal. Bolsa de Comercio. 2016. AÑO VIII - N° 435 <http://www.bcr.com.ar/Pages/GEA/infTodos.aspx>.

Informe Anual de Cifras Oficiales de la Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación, SAGPyA. 2003. <https://www.argentina.gob.ar/agricultura/agricultura-ganaderia-y-pesca>.

International Fusarium Laboratory Workshop. 2010. Dpto. Microbiología. Facultad Cs. Exactas, Físico Químicas y Naturales. Marzo 7 de diciembre, UN Río Cuarto. Directora: Dra Sofía Chulze, docente e investigadora del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNRC y organizadora del Workshop.

Ivancovich, A. 2013. Enfermedades de Soja: Diagnostico y Manejo. E.E.A Pergamino. Ministerio de Agricultura Ganaderia y Pesca Presidencia de la Nacion.

Khan, M. y Sinclair, J. 1992. Pathogenicity of sclerotia- and nonsclerotia-forming isolates of *Colletotrichum truncatum* on soybean plants and roots. *Phytopathology* 82:314-319.

Klingelfuss, L. y. Yorinori, J. 2001. Infecção Latente De *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii*. Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina. Em Soja Fitopatologia. Brasileira. Vol.26(2)158-164.

Kumar, N. 2006. Studies on anthracnose of sorghum caused by *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson. Thesis submitted to the University of Agricultural Sciences, Dharwad in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science (Agriculture) Department of plant Pathology College of Agriculture, Dharwad University of Agricultural Sciences, November, 2006. 84 pp.

Latunde-Dada, A. 2001. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. Molecular Plant Pathology (2001) 2(4), 187–198.

Levin; L; Ramos, A., Parisi, M. y M. Gall. 2007. Screening of *Colletotrichum* (Ascomycota) isolates, causal agents of Soybean Anthracnose, for Laccase production. Boletín. Sociedad. Argentina de. Botánica. 42 (1-2): 71.

Li Forseille. 2007. Molecular and pathological differentiation of *Colletotrichum truncatum* from scentless chamomile and legume crops A Thesis Submitted to the College of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in the Department of Biology University of Saskatchewan Saskatoon Canada. <https://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk3/SSU/TC-SSU-03142007150935.pdf>. 111 pp.

Londoño, G. ; Lavalett Oñate, L.; Galindo Villardón, M y Afanador Kafuri, L. 2007. Uso de métodos multivariantes para la agrupación uso de métodos multivariantes para la agrupación uso de métodos multivariantes para la agrupación. Revista Facultad Nacional de Agricultura de Medellín. Vol.60, No.1. 3671-3690 pp.

Maas, J.L. 1998. Compendium of strawberry diseases. 2º ed. Press, St Paul, MN. 98 pp.

Mahmodi, F., Kadir, J., Wong, M. y Nasehi, A. 2013. First Report of Anthracnose Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on Soybean (*Glycine max*) in Malaysia. Plant Disease 97, 841.

Maizar. 2019. Congreso Maizar: El despegue internacional. Parque Norte. Buenos Aires. <http://www.congresomaizar.org.ar/>.

Maizar .2013. La cadena del maíz y las oportunidades para desarrollo en la argentina. La cadena del maíz y las oportunidades para desarrollo en la Argentina. Bs As.Consultoría elaborada por MAIZAR por encargo del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. <http://www.maizar.org.ar/vertext.php?id=425>. 137 pp.

Maizar. 2008. Desafíos y Oportunidades para las cadenas de valor del Maíz y Sorgo Argentinos. Buenos Aires.MAIZAR –Asociación Maíz y Sorgo Argentino. www.maizar.org.ar. 31 pp.

Maizar. Maiz y Nutricion. 2006. Recopilación de ILSI Argentina .Serie de Informes Especiales Volumen II, octubre de 2006. Argentina. JOURNAL OF CLICAL MICROBIOLOGY. 65-69 PP

Makino, S; Okada, Y; Maruyama, T; Kaneko, S y Sasakawa, C. 1994. PCR-Based Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting of *Yersinia pseudotuberculosis* and Its Practical Applications. 65-69 pp.

Manandhar, J. B. y Hartman, G. L. 1999. Anthracnose. Págs. 13-14, Compendium of Soybean diseases 4^{ed}. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. USA.

Manandhar, J. ; Hartman, G. y Wang, T. 1995. Conidial germination and appressorial formation of *C. capsici* y *C. gloeosporioides* isolates from pepper. Plant Disease. 79:361-366.

Manandhar, J.; Hartman, G. y Sinclair, J. B. 1986. *Colletotrichum destructivum*, the anamorph of *Glomerella glycines*. Phytopathology 76:282-285.

Manandhar, J.; Kunwar, I. ; Singh, T.; Hartman, G. y Sinclair, J. B. 1985. Penetration and infection of soybean leaf tissue by *C. truncatum* and *G. glycines*. Phytopathology 75:704-708.

Manulis, S; Kogna, N; Reuven, M. 1994. Use of the RAPDs technique for identification of *Fusarium oxysporum f.sp dianthi* carnation, Phytopathology 84: 98-101.

McDonald BA y Linde C.2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review Phytopathology*. 40: 349-379.

Mc Donald, B.; McDermott, J; Goodwin, S; Allard; R. 1989. The Population Biology of Host-Pathogen Interactions. *Annual Review Phytopathology*. 27:77-94.

Masel, A., Braithwaite, K., Irwin, y: Manners, J. 1990. Highly variable molecular karyotypes In the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Current Genetics* 18, 81-86.

Menat J, Cabral AL, Perumal V, Wei Y, Banniza S. 2012. Sistema de apareamiento de *Glomerella truncata* otra especie de *Glomerella* con un sistema de apareamiento atípico. *Mycologia* 104. 641–649.

Menat, J., Armstrong-Cho, C. y Banniza, S. 2016. Falta de evidencia de reproducción sexual en poblaciones de campo de *Colletotrichum lentis*. *Ecología fúngica*, 20, 66-74.

Mc Gee, D. 1988. Maize diseases. A reference source for seed technology. APS Press. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota. 150 pp.

Meenakshi Sharma and Saurabh Kulshrestha. 2015. *Colletotrichum gloeosporioides*: An anthracnose Causing Pathogen of Fruits and Vegetables. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, August 2015. Vol. 12(2).

Mendez, E. 2009. Tesis de Grado en Ingeniería Industrial perspectivas de biocombustibles en Argentina. Instituto Tecnológico de Buenos Aires. Universidad Privada. <http://ri.itba.edu.ar/handle/123456789/722.85> pp.

Menezes, M. 2006. Aspectos biológicos e taxonômicos de especies do gênero *Colletotrichum*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciencia Agronômica*, Recife, vol. 3, 170-179 pp.

Mills. P.; Sreenivasaprasad, S. and. Brown A. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *Microbiology Letters* 98 (1992) 137-144.

Mims, C. y Vaillancourt, L. 2002. Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*, and by a *C. graminicola* pathogenicity mutant. *Phytopathology* 92:803-812.

Moab Diany Dias.2014. Etiologia, diversidade do agente causal e controle químico da antracnose da soja. Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Fitopatologia programa de pós-graduação em Fitopatologia. Brasília – DF.

Münch S , Lingner U , Floss D , Ludwig N , Sauer N , Deising H . 2008. El estilo de vida hemibiotrófico de las especies *Colletotrichum*. *J Plant Physiol.* Enero de 2008; 165 (1): 41-51. Epub 2007.

Münch S, Lingner U, Floss DS, Ludwig N, Sauer N, Deising HB. 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology* 165:41-51.

National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Nash, R. y Jansen, L.1973. Determinación de interacciones de pesticidas fitotóxicos en el suelo. *Journal of Environmental Quality Abstract* 2: 503 - 510.

Nicholson, R.L. 1992. *Colletotrichum graminicola* and the anthracnose disease of maize and sorghum. In: Bailey, J.A., Jeger, M.J. (Eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CABI, Wallingford, 186–202 pp.

O'Connell, RJ y Bailey, JA 1991 Hemibiotrofia en *Colletotrichum lindemuthianum* , en K. Mendgen y D.-E. Lesemann (eds.), *Microscopía electrónica de patógenos de plantas* , Springer-Verlag, Berlín, págs. 211–222.

O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., et al. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* 44, 1060–1065.

Oerke, EC. 2006. Pérdidas de cultivos a plagas. Journal of Agricultural Science, 144, 31–43. Cambridge University Press.

Ouellet, T. y Seifert, K. , 1993: Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. Phytopathology, 83: 1.003-1.007.

O'Neill, N.; Van Berkum, P., Lin, J., Kuo, J., Ude, G., Kenworthy, W. Y Saunders, J. 1997. Application of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) for the genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa (*Medicago sativa*). Phytopathology 87:745-750.

O'Neill, N. R. 1996. Pathogenic variability and host resistance in the *Colletotrichum trifolii*/*Medicago sativa* pathosystem. Plant Disease 80: 450-457.

O'Neill, N.R., and Saunders, J.A. 1994. Compatible and incompatible responses in alfalfa cotyledons to races 1 and 2 of *Colletotrichum trifolii*. Phytopathology 84:283-287.

Passarella, V. y Savin, R. 2003: Características físico-químicas de los granos y usos principales. En: E. Satorre, R. Benech Arnold, G. Slafer, E. de la Fuente, D. Miralles, M.E. Otegui, R. Savin (eds). Producción de cultivos de granos. Bases funcionales para su manejo. Ed. Facultad de Agronomía, Buenos Aires. 9-23pp.

Penzig, A 1882. Hongos agrumicoli. Contribuzione allo studio dei funghi parassiti degli agrumi. Michelia 2, 385 – 508pp.

Peruzzo A., Hernandez F., Lima Brito Junior S., Malone G., Ploper L. y Pioli R. Marcadores moleculares de tipo polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs) para la validación de híbridos en la F1 de cruzamientos para estudios de resistencia a la cancrrosis del tallo de la soja (*Diaporthe phaseolorum var. caulivora*). 4to Congreso Argentino de Fitopatología. 19 al 21 de abril de 2017. Mendoza, Argentina. Pag 463 (C -070).

Pioli R.N. 2007. Proyecto PID.AGR100. Sec.C yT.UNR.PID AGR.100, Convoc.UNR 2007. Período 2007-2010 Tema: “Estudio de algunas estrategias parasitarias y de defensa vegetal desarrolladas en asociaciones fúngicas de importancia económica en el cultivo de soja”. 01/01 2007- 31/12/2010. Proyecto Interdisciplinario e Interinstitucional. Directora: Dra. Rosanna Pioli. Acreditado Res. CS 193/2007 y continuidad 2008 por Res. CS 512/2008

Pioli R.; Morandi E.; Gattuso S. 2005a. Histological modifications on soybean stem tissues induced by *Diaporthe phaseolorum var. meridionalis*. USA. Biocell 29(1):142.

Pioli, R. y Morandi, E. 2005b. (Publicación de Tesis Doctoral) Capítulo Review of *Diaporthe phaseolorum var. sojae* and *P. longicolla* on soybean and others hosts. In Crop Protection Compendium. CAB Internacional. 33 pág. e imágenes. Ed. L. McGillivray. Wallingford, UK.

Pioli, R.N. 2004. Caracterización Morfológica y Fisiológica de una Interacción Planta Hospedante - Patógeno Fúngico de Interés Agrícola. 2004. Evaluación: Sobresaliente. Res. CD 131/04, 01/07/04. Bibliotecas Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR. y Ciencias. Agrarias UNR: Directores: Dr. AL. Borghi y E. Morandi. Consultor: Dora Barreto. 148 pp.

Pioli, R.; Morandi, E.; Martínez, M.; Lucca, M.; Tozzini, A.; Bisaro, V.; Hopp, H.E. 2003a. Morphologic, Molecular and Pathogenic Characterization of *Diaporthe phaseolorum* Variability in the Core Soybean Producing Area of Argentina. Phytopathology, 93(2):136-146.

Pioli, R.N; Nisensohn, L.; Luque, A. 2003b. First report of *Colletotrichum* associated to *Commelina erecta* L. USA. Biocell 27(2):255.

Pioli RN, Benavídez R, Morandi EN, Bodrero M, 2000. Epidemiological study of diseases associated to soybean carpels and seeds, in Santa Fe, Argentina. Fitopatología, 35(2):111-118.

Pioli, R; Benavídez, R; Morandi, E, Bodrero, M. 2000. Estudio epidemiológico de patógenos fúngicos asociados a semillas y frutos de soja. Ed. Asociación Latinoamericana de Fitopatología. ISSN 0430-6155. Fitopatología, 35(2):111-118.

Pioli, R.; Benavídez, R.; Morandi, E. 1997. Estudio preliminar sobre la Incidencia de patógenos en semillas de Soja (*Glycine max*) para consumo humano fresco - edamamé. Ed. Asociación Latinoamericana de Fitopatología Fitopatol.: Vol. 32(2):116-120.

Ploper, D, González, V, Reznikov, S; Hecker, L, De Lisi, V, Henríquez, D, Carlos A. Stegmaye y Mario R. Devani. 2015. Evaluación de la eficiencia de fungicidas para el control de las enfermedades foliares de la soja en Tucumán, Argentina. Revista Industrial y Agrícola. de Tucumán Tomo 92 (1): 01-15; 2015.

Ploper, L. 2011. Editorial. En: Devani, M. R.; F. Ledesma y J. R. Sánchez (eds.), El cultivo de la soja en el Noroeste Argentino, ciclo 2010/2011. Publ. Espec EEAOC (43): 8-9.

Ploper, L. 2004. VII° World Soybean Research Conference. Brasil.606-614 pp.

Pontón, R. 2006. Análisis del transporte marítimo del complejo soja de Argentina. 3° Congreso de Soja del MERCOSUR. Rosario, Argentina. Libro de Conferencias, Foros y Workshops:153-156.

Prusky, D.; Freeman, S.; Dickman, M.B. (eds). 2000. *Collectotrichum*: host specificity, pathology and host pathogen interaction. APS Press, St. Paul, MN. 393 pp.

Ramos, A. M.; Tadic, L. F., Cinto, I.; Carmona, M y Gally, M. 2013. Molecular characterization of *Colletotrichum* species causing soybean anthracnose in Argentina. MYCOTAXON; Lugar: USA; Año: 2013 vol. 123. 457 – 465 pp.

Rekha, KM. 2013. Studies on characterization and management of *Colletotrichum graminicola*, the causal agent of anthracnose of sorghum. Thesis. G. B. Pant University of Agriculture & Technology, Pantnagar - 263 145, U.S. Nagar Uttarakhand, India.<http://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/72243>. 160 pp.

Reznikov, S; Vicente De Lisi; Paula Claps Victoria González M.; Devani A.; Castagnaro L. Daniel Ploper. 2019. Evaluación de la eficacia y el tiempo de aplicación de diferentes fungicidas para el manejo de enfermedades foliares de la soya en el noroeste de Argentina. Protección de cultivos. Volumen 124. Octubre de 2019.

Ritchie, S.; Hanway J.; Thompson, H. 1982. How a corn plant develop. Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service Ames, Iowa. Special Report n° 48. <https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1155170>.

Riccioni, L.; Conca, G. y Hartman, G. L.1998.First Report of *Colletotrichum coccodes* on Soybean in the United States. Plant Disease: 82:959.

Rodríguez-López, E.S.; González Prieto, J.M.; Mayek-Pérez, N. 2009. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz.y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. Revista Mexicana de Fitopatología, Ciudad Obregón, v.27, n.1,,53-63 pp.

Rogério, F; Maisa Ciampi-Guillardi; Marina Coan Goldoni Barbieri; Carlos Augusto Dórea Bragança; Claudine Dinali Santos Seixas. 2016. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated soybean anthracnose in Brazil. Universidade de São Paulo, Departamento de Fitopatologia e Nematologia (ESALQ/USP).

Rossi, R. L. 2006. Impactos recientes de la soja en la Argentina. 3° Congreso. de Soja del MERCOSUR. Rosario, Argentina. 27 al 30 de junio. 115 - 118

Saccardo, P. 1884. Sylloge Sphaeropsidearum et Melanconiearum. Sylloge Fungorum. 3: 1-840 pp.

Saharrea, E. 2017. El sector del biodiesel en la República Argentina y la cuestión del desarrollo sustentable: descripción, perspectivas e inserción internacional.Universidad Torcuato Di Tella Departamento de Ciencia Política y Estudios Internacionales.40 pp. https://repositorio.utdt.edu/bitstream/handle/utdt/LEI_2017_Saharrea.

Sharma, T. R y Tewar, J. P. 1998. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycol. Res.* 102 (7): 807–814 pp.

Sanz Martín, J. 2016. Estudio y caracterización funcional de efectores implicados en la interacción *Colletotrichum graminicola*-maíz. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Departamento de microbiología y genética. Área: genética. Universidad de Salamanca. España. <https://pdfs.semanticscholar.org>. 218 pp.

Santacruz Delgado, C. 2013. Tesis de Maestría: Caracterización Morfológica, Patogénica y Molecular de especies de *Colletotrichum spp.* causantes de la antracnosis del fruto de ají y pimentón *Capsicum spp.* en el Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira Facultad de Ciencias Agropecuarias Escuela de Posgrado.

Sant' Anna, J.; Miyamoto, C.; Rosada, L.; Franco, C.; Kaneshima, E. y Astro-Prado, M. 2010. Genetic relatedness of Brazilian *Colletotrichum truncatum* isolates assessed by vegetative compatibility groups and RAPD analysis. *Biol Res* 43: 51-62

Satorre, E. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Revista Ciencia Hoy*. Volumen 15 N° 87. 24 – 31 pp

Sharma, R. 2009. Genetic differentiation of host limited forms of *Colletotrichum truncatum* from northwestern Himalayas. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42: 960–966.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP). 2001/ 2003/ 2006 – 07/2019. Informe Anual de Cifras Oficiales de la Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación. Estimaciones Agrícolas. <https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/estimaciones>.

Selby, A y Manns, T. 1909. Studies in diseases of cereals and grasses. *Ohio Agricultural Experimental Station Bulletin* 203: 187-236.

Saharrea, J. 2017. El sector del biodiesel en la República Argentina y la cuestión del desarrollo sustentable: descripción, perspectivas e inserción internacional. Universidad Torcuato Di Tella Departamento de Ciencia Política y Estudios Internacionales. 54 pp.

Sharma, S.K.; Gupta, G.K.; Ramteke, R. 2011. *Colletotrichum truncatum* [(Schw.) Andrus & W.D. Moore], the causal agent of anthracnose of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill. A Review. Soybean Res. 2011, 9, 31–52.

Shear, C. y Wood, A. 1913. Studies of Fungous Parasites Belonging to the Genus *Glomerella*. Bur. Pl. Ind. BuI. 252.

Sherriff, C., Whelan, M. ; Arnold, G. y Bailey, J. A. 1995. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. Mycol. Res. 99:475-478.

Shurtleff, M. 1992. Compendium of corn diseases. APSS Press St Paul. Minnesota. EUA. Pag. 105.

Sillon, M. 2014. Las principales enfermedades fungicas del cultivo de maiz, Reconocimiento y recomendaciones del manejo. Horizonte digital.com.

[http://horizonteadigital.com/investigacion/ha54/Principales enfermedades fungicas maiz.pdf](http://horizonteadigital.com/investigacion/ha54/Principales_enfermedades_fungicas_maiz.pdf).

Sillon, M; Fontanetto, H. 2011. Epidemiología de Las Principales Enfermedades Fúngicas de Maíz, Cuantificación y Principios de Manejo. Inta – Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Información técnica cultivos de verano. Ciclo 2011 Publicación Miscelánea N° 121 129.

Sillón, M.; Igarzábal, D.; 2008. Capítulo 6: Enfermedades del cultivo de maíz. Capítulo 7: Plagas del cultivo de maíz. - En: Producción de Maíz. - Editor/es: CREA. - AACREA. –19 pp.

- Sinclair J. y Backman P. 1989. Compendio de enfermedades de la soja. American Phytopathological Society; 3ª edición. 104 pp.
- Sinclair, J. 1991. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease* 75: 220 – 224.
- Sianvimo. 2017. <https://www.sinavimo.gov.ar/plaga/Colletotrichum-graminicola>.
- Snowdon, R.J. Langsdorf, A. 1998. An Introduction to DNA Fingerprinting Using RFLP and RAPD Techniques. Universitat, Ludwigstrasse Giessen, Germany. Chapter 3. 99 -127pp.
- Solomon E. P., Berg L. R., Martin D. W. 2007. *Biology* 8th. Edition. Understanding Diversity: Systematics (Chapter 23). Thomson, Brooks/Cole. USA In: 1379 pp.
- Sreenivasaprasad S, Mills P R, Meehan B M and Brown A E. 1996. Phylogeny and systematic of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* 39: 499-512
- Sreenivasaprasad S, Sharada K, Brown A y Mills PR. 1992. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* 45:650–655.
- Staples, R; Laccetti, L y Yaniv, Z. 1976. Appressorium formation and nuclear división in *Colletotrichum truncatum*. *Archives Microbiology*. 109:75 – 84.
- Stonem, B. 1898. A comparative study of the developmente of some anthracnose. *Botical Gacette*, Vol 26. 69- 120 pp.
- Struble, F. y Keitt, G. 1950. Variability and inheritance in *Glomerella cingulata* (Stonem.) and v. s. from Apple. *American Journal of Botany*, vol. 37, no. 8, October.
- Sukno, S; Garcia,V; Shaw; B. D. y Michael R. Thon. 2008. Root Infection and Systemic Colonization of Maize *Colletotrichum graminicola*. *Applied and environmental microbiology*, p. 823–832 Vol. 74, No. 3.

Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: J.A. Bailey, and M.J. Jeger. *Colletotrichum*; Biology, Pathology and Control. British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. London, England. 388 pp.

Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli, and Stromata. Commonw. Mycological Institute, Kew. London.

Sutton, B. C. 1968. The appressoria of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum*. Can. J. Bot. 46:873-876.

Svetaz L.; Pioli, RN; Zacchino, S; Petenatti, E. 2006. Compuestos antifúngicos de origen vegetal para el control de patógenos de fin de ciclo asociados en Soja. Ergomix. com. <http://www.engormix.com/MAagricultura/soja/articulos/compuestos-antifungicos-origen-vegetal-t1136/415-p0.htm>

Talhinhas, P.; Sreenivasaprasad; S.; Neves-Martins; J.; Oliveira. 2005. Los análisis moleculares y fenotípicos revelan la asociación de diversos grupos de *Colletotrichum acutatum* y un bajo nivel de *C. gloeosporioides* con antracnosis de oliva. Applied. Environmental. Microbiology. 71:2987-2998

Tiffany, L. y Gliman, L.C.1954. Species of *Colletotrichum* from legumes. Mycologia: 46: 52 - 75.

Tiffany, L.H. 1951. The antracnose complex on soybean. Review Applied Mycology 30, 598–599.

USDA. United States Department of Agriculture. 2017. Servicio Nacional de Estadísticas Agropecuarias. <https://www.nass.usda.gov/index.php>.

Vaillancourt, L. y Hanau, R. 1992. Genetic and morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum. Exp. Mycol. 16:219-229.

Vaillancourt, L., Wang, J. y Hanau, R. 2000. *Colletotrichum* host specificity, pathology, and host-pathogen interaction Eds. Dov Prusky, Stanley Freeman and Martin B. Dickman. St Paul, Minnesota. APS Press the American Phytopathological Society. 393 pp.

Valenzuela, N.; Lara-Viveros, F., Andrade-Hoyos, P.; Aguilar-Pérez, Luis; Aguado Rodríguez, G. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.7 Núm.5. 1189-1198 pp.

Van Dyke, C. G.; and Mims, C. W. 1991. Ultrastructure of conidia, conidium germination and appressorium development in the pathogenic fungus, *Colletotrichum truncatum*. Canadian Journal of Botany 69:2455-2467.

Vargas, W. 2016. Enfermedad del agro: avances en estudios para combatir la Antracnosis. <https://www.conicet.gov.ar/enfermedad-del-agro-avances-en-estudios-para-combatir-la-antracnosis/>

Venard, C. y Vaillancourt, L. 2007. Penetration and colonization of unwounded maize tissues by the maize anthracnose pathogen *Colletotrichum graminicola* and the related nonpathogen *Colletotrichum sublineolum*. Mycologia 99: 368-377.

Venard, C. y Vaillancourt, L. 2007. Colonization of fiber cells by *Colletotrichum graminicola* in wounded maize stalks. Phytopathology 97:438-447.

Voet, D y Voet, J. 2007. Bioquímica. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1776 pp.

Von Arx J. y Müller E. 1954. Die Gattung der amersporen Pyrenomyceten. Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz 11(1): 1-434.

Von Arx, J. 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopathologische Zeitschrift 29: 413-468 pp.

Von Arx, J. 1970. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. New York. Stechert-Hafner. 288 pp.

Watson, S. 1988. Corn Marketing Processing and Utilization. In: Sprague G. F y J. Dudley (eds). Corn and corn improvement (3^a ed). Series Agronomy N° 18 American Society of Agronomy, Inc. Publishers. Madicson, Wisconsin, USA. 881 – 940 pp.

Wayne Smith, C. 2004. Corn origin, history, technology and production. John Willey & Sons. Inc. 949 pp.

Weeds, P, Chakraborty, S., Fernandes, C., Charchar, M, Ramesh, C, Kexian, Y., y Kelemu, S. 2003. Diversidad genética en *Colletotrichum gloeosporioides* de *Stylosanthes* spp. en Centros de Origen y Utilización. *Fitopatología*, 93 (2), 176-185.

Weir, P. y Ulrike, D. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115–180.

Weidemann, G.J., Tebeest, D.O. y Cartwright, R.D. 1988. Host Specificit of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. aechynonebe and *C. truncatum* in the Leguminosae. *Phytopathology* 78, 986 - 990.

Wharton, P.; Julian, A. y O’Connell, R. J. 2001. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 91:149-158.

Wharton, P. y J. Diéguez-Uribeondo. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61, 3-22.

White, D. 1999. Compendium of corn diseases. American Phythopalogical Society. Third Edition. APS. 78 pp.

White, T.; Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and*

applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

Wilson, G. 1914. The identity of the anthracnose of grasses in the United States. *Phytopathology* 4: 106-112.

Wrather J.A., Anderson T.R., Arsyad D.M., Gai J., Ploper L.D., Porta-Puglia A., Ram H.H., Shannon G., Balardin R., Carregal L., Escobar R., Gupta G.K., Tenuta A. 2010. Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries in 2006. *Plant Health Progress*, 10: 1094.

Wrather, J.; Anderson, T.; Arsyad, D.; Tan Y.; Ploper, L.; Porta- Puiglia, A., Ram, H. y Yorinori J. 2001. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean producing countries in 1998. *Can. J. Plant Pathology* 23: 115-121.

Wrather, J., Anderson, T.; Arsyad, D., Gai, J., Ploper, L., Porta-Puglia, A., Ram, H. y Yorinori, J. 1997. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. *Plant Disease* 81:107-110.

Yang, H. y Hartman, G. 2015. Methods and evaluation of soybean genotypes for resistance to *Colletotrichum truncatum*. *Plant Disease* 99:143-148.

Yang, H.; Haudenschild, J.y Hartman, G. 2014. *Colletotrichum incanum* sp. nov., a curved conidial species causing soybean anthracnose in USA. *Mycologia* 106, 32–42.

Yang, H.; Haudenschild, J.; Hartman, G. 2012. First report of *Colletotrichum chlorophyti* causing soybean anthracnose. *Plant Disease* 96, 1699.

Ybran, R; Lacelli, G. 2016. Informe estadístico mercado de la soja. Inta Reconquista. 9 pp. https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_informe_estadistico_del_mercado_de_soja.pdf

ANEXO 1

Condiciones ambientales de humedad y precipitaciones medias y temperaturas mínimas y máximas en los dos años de experimentación en la localidad de Zavalla, provincia de Santa Fe.

Humedad media

	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
2011	57	63	62	65	76	74	75	58	53	56	55	52
2012	60	65	62	61	72	73	75	64	59	65	63	68
2013	54	54	58	59	63	65	63	58	65	65	63	64

Precipitaciones media

	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
2011	185	33	59	57	23	19	14	16	0.8	98	194	14	711
2012	124	104	105	258	60	2.8	0	99	38	123	77.0	148	905
2013	60	3.0	61.0	89.5	4.0	0	41	0	90	51.0	39.5	15.0	454

Temperaturas mínimas

	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
2011	7	4	2.5	-1	-3	-6	-7	-8	-2	-3	6	6	-0.3
2012	9	5	3	-4	-4	-9	-11	-5	-2	-3	5	7	-0.7
2013	3	1	1.2	-1.5	-3	-7	-8	-10	-5	-2	4.5	4.5	-1.7

Temperatura máximas

	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
2011	37	38	36	28.9	28	19	21	19	26	27	31	37	28.9
2012	40	38	34	31.5	24	20	19	24	28	28	34	36	29.7
2013	34	33	32.5	30.2	23	24	20	30	30	30	37	40	30.4