

## Tasa de crecimiento y patogenicidad de aislamientos de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*

### Growth rate and pathogenicity of isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*

Grijalba P<sup>1</sup> y A del C Ridao<sup>2</sup>

**Resumen.** *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* es el agente causal prevalente del cancro del tallo de la soja (CTS) en la Argentina; apareció principalmente en la subregión pampeana sur, pero también en zonas cálidas observándose diferencias en incidencia, severidad y virulencia. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la tasa de crecimiento *in vitro* y la patogenicidad de aislamientos provenientes de plantas de soja, a diferentes temperaturas. Se seleccionaron 20 aislamientos de la provincia de Buenos Aires. Se midió la tasa diaria de crecimiento de nueve de ellos y de dos aislamientos de referencia, en agar papa dextrosa (APD) y distintas condiciones de luz/oscuridad, a cuatro temperaturas (15, 20, 25 y 30 °C). Mediante la técnica del escarbadiente se inocularon cuatro aislamientos en un cultivar de soja susceptible; las plantas inoculadas se incubaron en cámara de crecimiento a 15, 20 y 25 °C. Otros 17 aislamientos se inocularon en condiciones de campo e invernáculo. Se registró el porcentaje de plantas muertas. La tasa promedio de crecimiento de los aislamientos fue mayor a medida que aumentó la temperatura: a 15 °C fue similar entre ellos, a 20 °C hubo pequeñas diferencias, a 25 °C se diferenciaron dos grupos, mientras que a 30 °C no hubo crecimiento. Todos los aislamientos fueron patógenos. Las temperaturas de incubación indujeron diferentes porcentajes de mortandad: a 15 y 20 °C en cámara e invernáculo (a < 20 °C) los valores fueron entre 75 y 90%, mientras que a 25 °C en cámara y campo (a > 20 °C) los porcentajes de plantas muertas fueron inferiores a 40%. Se sugiere que temperaturas inferiores a 20 °C no permitirían observar diferenciación fisiológica entre las dos variedades causantes de CTS. La similitud de crecimiento y el alto porcentaje de plantas muertas indicarían que la incidencia y severidad se deberían a las condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo de la enfermedad.

**Palabras clave:** Soja; Cancro del tallo; *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*; Tasa de crecimiento.

**Abstract.** *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* is the major causal agent of stem canker in soybean (CTS) in Argentina. It has appeared mainly in the Southern Pampeana sub-region, but also in warm areas, and it has been observed with different levels of incidence, severity and virulence. The objective of this work was to study the growth rate *in vitro* and the pathogenicity of isolates from soybean plants at different temperatures. Twenty isolates from Buenos Aires Province were selected. The daily growth rate was measured in nine of them and in two reference isolates in potato dextrose agar (APD), under different light/darkness conditions at four temperatures (15, 20, 25 and 30 °C). The toothpick technique was used to inoculate four isolates on 10 plants of a susceptible soybean cultivar, which were incubated in growth chambers at 15, 20 and 25 °C. Another 17 isolates were inoculated in the field and in a greenhouse. The number of dead plants was recorded. The growth rate of the isolates was greater with higher temperature: at 15 °C they were similar, at 20 °C there were small differences, at 25 °C two groups were detected whereas at 30 °C there was no growth. All the isolates were pathogenic. The different incubation temperatures induced different levels of plant death: at 15 and 20 °C in both the chamber and greenhouse (at < 20 °C), the values were between 75 and 90%, while at 25 °C in both the chamber and field (at > 20 °C), the percentage of dead plants was less than 40%. It is suggested that temperatures lower than 20 °C would not allow to observe physiological differences between the different varieties which cause CTS. The similarity of growth and the high number of dead plants indicate that the incidence and severity of the disease would be due to environmental factors.

**Keywords:** Soybean; Stem Canker; *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*; Growth rate.

<sup>1</sup> Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Cátedra de Patología Vegetal Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina.

Address Correspondence to: Pablo Enrique Grijalba, e-mail: grijalba@agro.uba.ar

Recibido / Received 22.X.2012. Aceptado / Accepted 3.V.2013.

## INTRODUCCIÓN

Dentro del complejo *Diaporthe/Phomopsis* (*D/P*) se cita a *D. phaseolorum* var. *meridionalis* F. A. Fernández (*Dpm*) y *D. phaseolorum* var. *caulivora* Athow & Caldwell (*Dpc*), como agentes causales del cancro del tallo (CTS) de la soja [*Glycine max* (L.) Merr.] (Fernández y Hanlin, 1996; Hartman et al., 1999). Durante tres décadas, hasta las publicaciones de Morgan-Jones (1985; 1989), las dos variedades del patógeno se incluían en *Dpc*, posteriormente diferenciadas por características morfológicas y fisiológicas. La primera observación de variabilidad entre aislamientos de *Dpc* fue estudiada por Keeling (1984) en Mississippi; sin embargo, en ese momento las dos entidades podrían haber estado implícitas en esa variabilidad.

En Argentina el CTS causado por *Dpm* alcanzó características epidémicas en la campaña 1996/97 (Ploper et al., 1997; Grijalba y Marino, 2001; Pioli et al., 2003). Como consecuencia de la incorporación (a los cultivares comerciales) de genes de resistencia, la prevalencia e intensidad de la enfermedad disminuyó (Ploper, 2004). Sin embargo el CTS reapareció también con características epidémicas a partir de 2005. En la actualidad *Dpc* es el agente causal prevalente en el área sur de la región sojera de Argentina (Pioli et al., 2005; Grijalba y Guillín, 2007; Ridao y Lago, 2007; Lago, 2010). *D. phaseolorum* var. *caulivora* fue citado por primera vez en el país por Pioli et al. (2001); desde entonces, el patógeno se ha observado en diferentes áreas, principalmente en la provincia de Buenos Aires, con diferencias en incidencia, severidad y virulencia (Grijalba y Guillín 2005; Lago et al., 2007; Lago 2010).

El complejo *D/P* se caracteriza por presentar variabilidad en relación a la morfología, a la coloración de la colonia, formación y tamaño de estromas, y su posición dentro de los tejidos del hospedante. Por otra parte presenta variabilidad en la morfología del peritecio, formación del conidioma, velocidad de crecimiento y forma de las ascosporas (Morgan-Jones, 1985). Hobbs y Phillips (1985) agregaron a estas diferencias los síntomas en plantas de soja en el campo. Backman et al. (1985), utilizaron el criterio de velocidad de desarrollo radial a 30 °C e indicaron discontinuidades entre aislamientos originados en diferentes zonas geográficas. Estos autores mostraron una diferenciación fisiológica, y justificaron la designación de aislamientos del norte y del sur de EEUU como entidades separadas en "formas especiales". Keeling (1984) comparó aislamientos de diferentes regiones geográficas, estudió la patogenicidad en varios cultivares de soja y sugirió la presencia de seis razas fisiológicas, tres provenientes del norte y tres del sur de los EEUU. Por su parte Higley y Tachibana (1987) demostraron especialización fisiológica dentro de aislamientos de la var. *caulivora* y, debido a la patogenicidad diferente de los aislamientos del norte respecto de los del sur, se sugirió la existencia de dos razas. Keeling (1988) puso en evidencia las diferencias entre las dos entidades, siendo los aislamientos del sur más tolerantes al calor que los del norte.

A su vez Ploetz y Shokes (1989) encontraron variabilidad entre aislamientos de diferentes grupos de compatibilidad vegetativa en *Dpm*. Keeling (1986) citó que la diferencia en el crecimiento micelial y en la virulencia de los aislamientos del norte y del sur de los EEUU se relacionó con su distribución geográfica. Trabajando con aislamientos de *Dpc*, Pacumbaba (1988) observó diferencias cuando crecían a distintas temperaturas y regímenes de luz.

En EEUU se ha asociado la presencia de *Dpm* con climas templado-cálidos, en tanto que *Dpc* se relacionó con climas templado-frescos (Morgan-Jones, 1989). Para nuestro país, si bien los reportes de epifitias de CTS por *Dpm* provienen de las zonas sojeras del norte y las ocasionadas por *Dpc* de la subregión pampeana sur, *Dpc* ha sido citada en zonas cálidas (Pioli, 2003). Costamilan et al. (2008) observaron inclusive la presencia de CTS por *Dpc* en el estado de Río Grande del sur (Brasil).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la tasa de crecimiento *in vitro* y la patogenicidad de aislamientos de *Dpc* en plantas de soja, a diferentes temperaturas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los aislamientos de *Dpc* fueron obtenidos de lotes comerciales de soja de la provincia de Buenos Aires, durante los años 2005, 2006 y 2007. En laboratorio, a partir del margen de la lesión de las plantas con síntomas de cancro, se cortaron trocitos de la médula de 2-3 mm de largo, y se desinfectaron mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto. Luego se sembraron en cajas de Petri con agar papa dextrosado al 2% acidificado (APDA) con 0,2% de ácido láctico (pH 4,5). Las cajas se incubaron en estufa a 25 ± 2 °C durante 3 a 4 días, y posteriormente en cámara climática con ciclos de 12/12 h de luz ultravioleta cercano y oscuridad, durante 10 a 15 días. Los cultivos purificados mediante la siembra de puntas hifales se mantuvieron en tubos estría con APD y en tubos eppendorf a 4 °C.

La patogenicidad de los aislamientos se probó mediante el método de inoculación del escarbadiante (Young, 1943; Hildebrand, 1953; Yorinori, 1996). El inóculo se preparó colocando puntas de escarbadiantes, previamente hervidas y autoclavadas, en forma horizontal en cajas con APD, que se sembraron con cada aislamiento en estudio. Las cajas se incubaron en estufa a 25 ± 2 °C, hasta que los escarbadiantes quedaron completamente colonizados (aproximadamente a los 10-12 días). Se inocularon 10 plantas de soja del cultivar DM 3700 RR, con antecedentes de susceptibilidad al patógeno (Grijalba y Guillín, 2007). Estas plantas habían crecido en macetas de plástico, previamente lavadas con hipoclorito de sodio, con un sustrato comercial esterilizado. A las plantas, en estado vegetativo V1 (Fern y Caviness, 1977), a los 12-15 días de la siembra, un cm debajo del nudo cotiledonar se les insertó una punta de escarbadiante. Luego las plantas se cubrieron con bolsas de polietileno humedecidas interiormente con agua, para lograr alta humedad relativa y evitar la desecación del inóculo en los

primeros estadios de la patogénesis. La incubación se realizó en cámara climática a  $25 \pm 2$  °C, con 12 h de luz y 12 h de oscuridad y en invernáculo. Después de 72 h se retiraron las bolsas de polietileno y se mantuvieron con las condiciones descriptas. La evaluación de la reacción se realizó 14 días después de la inoculación. Se consideró como resultado positivo el desarrollo de al menos un cancro visible en el tallo de una de las plantas inoculadas y/o síntomas de oscurecimiento interno en la médula. El hongo se aisló de la periferia de las lesiones después de 30 días de la inoculación, mediante el procedimiento antes descrito, en medio APDA y fue comparado con las características morfológicas de las colonias originales. Se cumplió así con los postulados de Koch.

**Crecimiento micelial *in vitro* con diferentes temperaturas y regímenes de luz.** Para evaluar la influencia de la temperatura sobre *Dpc* se llevó a cabo un ensayo para el cual se seleccionaron tres aislamientos de cada una de las Zonas (1) Norte, 05-3 (San A. de Areco), 06-01 (Ramallo) y 07-2 (Pergamino); (2) Centro, 07-1 (Gral. Rodríguez), 07-3 (Trenque Lauquen) y 07-7 (Azul), y (3) Sur, 05-2 (Mar del Plata), 07-8 (San Manuel) y 07-14 (Necochea) (Tabla 1). Como aislamientos patrones para identificar diferencias y/o similitudes se incluyó: un aislamiento de *Dpc* proveniente de USA y uno de *Dpm* proveniente de Venado Tuerto (ambos mantenidos en la colección de hongos de la Facultad de Agronomía de la U.B.A.).

Un trocito de un cm de diámetro, obtenido con un sacabocado, de cada colonia de 7 días de crecimiento en APD, se colocó en cada caja de Petri que contenía 15 mL. de APD. Estas cajas se incubaron en una cámara climática marca Sanyo modelo MIR-553 con dos condiciones de luz (oscuridad continua, y 12 h de luz/12 h de oscuridad) y a cuatro temperaturas (15, 20, 25 y 30 °C). El crecimiento de las colonias se midió diariamente (mm/día), con una regla milimetrada, a partir del segundo día y durante cuatro días consecutivos. El día uno se descartó debido a la adaptación de cada cepa al medio de cultivo. El experimento se llevó a cabo mediante un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con cuatro repeticiones. Con los valores de la tasa de crecimiento obtenidos se efectuó un análisis de varianza y las comparaciones posteriores entre medias se hicieron con el test de DGC (Di Rienzo et al., 2002), con un  $\alpha=0,05$  (Gomez y Gomez, 1984). Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa Infostat (2009).

**Patogenicidad de aislamientos inoculados a distintas temperaturas.** Para conseguir las condiciones deseadas en cuanto a la exposición de las plantas a diferentes temperaturas, se realizaron tres ensayos: a) en cámara climática de crecimiento, b1) en invernáculo y b2) en el campo.

**a) Ensayo en cámara climática.** Debido a la disponibilidad de la cámara climática, las inoculaciones de plantas se hicieron con dos aislamientos del norte de la provincia de Buenos Aires

**Tabla 1.** Denominación, procedencia y cultivar de soja (originario), de los aislamientos de *Diaporthe /Phomopsis*.

**Table 1.** Designation, source and soybean cultivar (original) of the isolates of *Diaporthe / Phomopsis*.

Denominación	Origen	Zona	Cultivar
<i>Dpc</i> -05-1	Mar del Plata	S	DM3700
<i>Dpc</i> -05-2	Mar del Plata	S	DM 4600
<i>Dpc</i> -05-3	San A de Areco	N	DM3700
<i>Dpc</i> -06-1	Ramallo	N	S/D
<i>Dpc</i> -07-1	Gral Rod.	C-N	DM3700
<i>Dpc</i> -07-2	Pergamino	N	DM3700
<i>Dpc</i> -07-3	Trenq. Lauq	C	DM4600
<i>Dpc</i> -07-4	Quequen	S	DM3100
<i>Dpc</i> -07-5	Gral Piran	S	DM4800
<i>Dpc</i> -07-6	Quequen	S	P93B34
<i>Dpc</i> -07-7	Azul	C	S/D
<i>Dpc</i> -07-8	S. Manuel	S	DM3700
<i>Dpc</i> -07-10	Balcarce	S	DM3700
<i>Dpc</i> -07-13	Tandil	S	SPS 3900
<i>Dpc</i> -07-14	Necochea	S	DM4200
<i>Dpc</i> -07-15	Necochea	S	NK37
<i>Dpc</i> -07-16	Tandil	S	AW4500
<i>Dpc</i> -07-18	Urdampilleta	C-S	DM4600
<i>Dpc</i> -07-19	Guaminí	C-S	Dm4800
<i>Dpc</i> -07-20	Loberia	S	DM 3100
<i>Dpc</i> -Patrón	USA	Col	S/D
<i>Dpm</i> -2	Vdo.Tuerto	Col	S/D

Ejemplo de nomenclatura: *Dpc* (variedad del patógeno); 07 (año de recolección); 1 (Número de aislamiento).

20 aislamientos de *Dpc* locales + aislamiento Patrón + 1 aislamiento de *Dpm*. Zona: C= centro, N= norte, S= Sur de Buenos Aires, Col= Colección. S/D= Sin Dato.

Example of Nomenclature: *Dpc* (variety of pathogen); 07 (sampling year); 1 (Isolation number). 20 local isolates of *Dpc* + isolate check + 1 isolate of *Dpm*.

Zone: C= center, N= North, S= South of Buenos Aires, Col= Collection. S / D= No Data.

(05-3; 06-1), dos del sur (05-1; 07-8) y la cepa patrón de *Dpc* como testigo positivo (Tabla 1). Las plantas hospedantes utilizadas (cultivar DM 3700 RR), el método de inoculación y las condiciones de luz/oscuridad fueron similares a los utilizados en el ensayo de patogenicidad. Se probaron temperaturas de 15, 20 y 25 °C (30 °C se descartó ya que ningún aislamiento estudiado presentó crecimiento) provistas por la cámara climática con control de temperatura y luz.

Las macetas fueron ubicadas en un DCA, con cuatro repeticiones por tratamiento. Cada repetición consistió de una maceta con 10 plantas inoculadas. Como testigo se usó una

maceta con 10 plantas a las que se les insertó una punta de escarbadiente sin hongo. El registro de la reacción se hizo luego de 15 días de la inoculación, por recuento del número de plantas muertas, afectadas y sanas. Las plantas afectadas fueron aquellas que, si bien no murieron, presentaron síntomas de cancro exterior y/u oscurecimiento interno de la médula.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la expresión de los síntomas se utilizó la fórmula propuesta por Yorinori (1996), basada en el porcentaje de plantas muertas (% PM).

$$\% \text{ PM} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de plantas muertas} + \text{N}^\circ \text{ de plantas afectadas} / 2) \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de plantas inoculadas}}$$

Los datos del % PM se sometieron a un análisis de varianza y posterior comparación de medias mediante el test DGC (Di Rienzo et al., 2002), con un  $\alpha=0,05$  (Gómez y Gomez, 1984).

**Tabla 2.** Porcentaje promedio de plantas muertas debido a la inoculación de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* a 15, 20 y 25 °C. **Table 2.** Mean percentage of dead plants after inoculation with *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* at 15, 20 and 25 °C.

Temperatura (°C)	Porcentaje de plantas Muertas (% PM)
15	90,00 B
20	90,50 B
25	38,16 A

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Cada valor es el promedio de 4 repeticiones efectuadas 15 días después de la inoculación. Test DGS ( $p=5\%$ ).

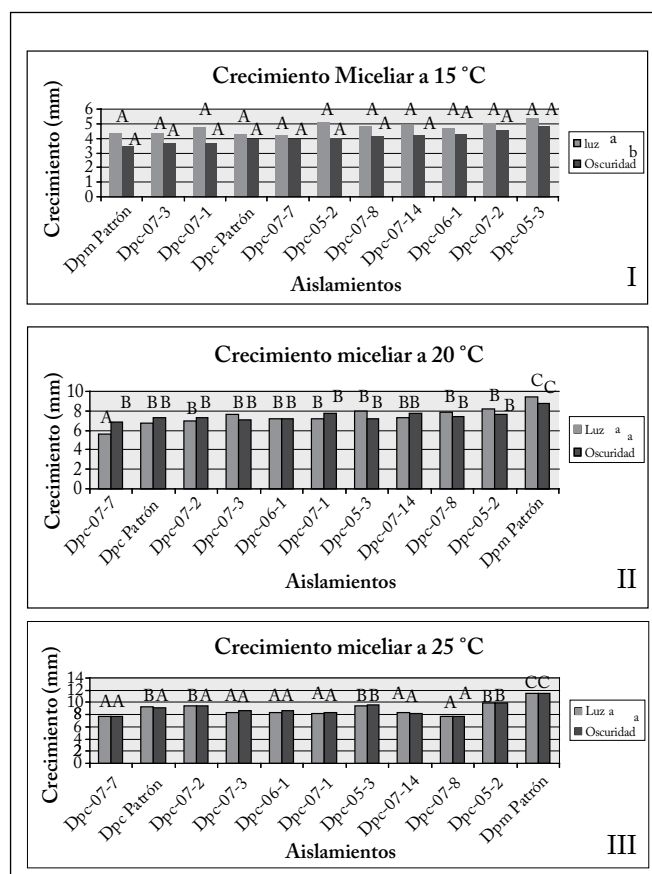
Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ). Each value is the mean of  $n=4$ . Sampling was conducted 15 days after inoculation. DGS test ( $p=5\%$ ).

**b) Ensayos en condiciones de invernáculo y en el campo.** Para complementar los ensayos de cámara climática, se efectuaron dos ensayos en macetas en condiciones de invernáculo (b1) y en el campo (b2). Se inocularon 17 aislamientos locales de *Dpc*: -06-1, -07-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, más la cepa patrón de *Dpc* como testigo positivo (Tabla 1). El cv. de soja (DM 3700 RR) utilizado y el método de inoculación (escarbadiente) fueron los mismos a las pruebas de patogenicidad. Los ensayos fueron conducidos en dos estaciones del año:

**b1)** A fines del invierno-primavera (agosto-septiembre de 2009): las plantas se mantuvieron en invernáculo, con registros diarios de temperaturas (mediante termómetro de máxima y mínima) entre 10 y 22 °C, y alternativamente, cuando la temperatura sobrepasó los 22 °C a mediodía, se colocaban al aire libre (máxima 21,1 °C) (Sitio Web de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2010).

**b2)** A fines de primavera-verano (diciembre 2008-enero 2009): las plantas (en macetas) se mantuvieron en el campo donde la temperatura mínima registrada fue de 19,3 °C y la temperatura máxima de 31,1 °C (Sitio Web de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2010).

En ambos ensayos las macetas fueron ubicadas en un DCA, con dos repeticiones por tratamiento. Cada repetición consistió de una maceta con 10 plantas inoculadas. Como testigo se usó una maceta con 10 plantas a las que se les insertó una punta de escarbadiente sin hongo. El registro de la reacción se hizo luego de 30 días de la inoculación, al igual que en el ensayo en cámara climática mediante el recuento del número de plantas muertas, afectadas y sanas. Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la expresión de los síntomas también se utilizó la fórmula propuesta por Yorinori (1996), basada en el porcentaje de plantas muertas (% PM).



**Fig. 1.** Tasa diaria promedio de crecimiento micelial de 10 aislamientos de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* y uno de *D. phaseolorum* var. *meridionalis* con dos regímenes de luz I: 15 °C; II: 20 °C; III: 25 °C.

Test DGC: Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), mayúsculas entre aislamientos y minúsculas entre factores. Cada valor representa la media del crecimiento de 4 repeticiones. Note el cambio de escala en el eje y entre paneles.

**Fig. 1.** Average daily rate of mycelial growth of 10 isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and one of *D. phaseolorum* var. *meridionalis* with two light regimes. I: 15 °C; II: 20 °C; III: 25 °C.

DGC test: Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ), uppercase letters among isolates, lowercase letters between factors. Each value represents the mean of growth of  $n=4$ . Note the change of scale in the y axis among panels.

Los datos del % PM se sometieron a un análisis de varianza y posterior comparación de medias mediante el test DGC (Di Rienzo et al., 2002), con un  $\alpha=0,05$  (Gómez y Gomez, 1984).

## RESULTADOS

De un total de 42 aislamientos obtenidos, se seleccionaron 20 con características de *Dpc*, de acuerdo a la localidad o zona geográfica dentro de la provincia de Buenos Aires y del cultivar de soja del que fueron aislados (Tabla 1).

Los ensayos de patogenicidad de los aislamientos locales de *Dpc* dieron resultado positivo, manifestado por el desarrollo de un cancro visible y/u oscurecimiento interno de la médula en al menos una de las diez plantas inoculadas.

**Crecimiento micelial de los aislamientos a diferentes temperaturas y regímenes de luz.** Los valores de la tasa del crecimiento micelial de 9 aislamientos de *Dpc* y las cepas patrones a 15 °C fueron similares, y sometidos a análisis de varianza indicaron que ninguno presentó diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el crecimiento con luz intermitente (12/12 h luz-oscuridad) u oscuridad constante manifestó diferencias significativas (Fig. 1-I).

Los resultados del análisis de varianza del crecimiento micelial a 20 °C demostraron que sólo el aislamiento *Dpc*-07-7 creció menos y se diferenció estadísticamente de los demás aislamientos. Sin embargo, todos presentaron menor tasa de

crecimiento respecto al patrón de *Dpm* (Fig. 1-II).

La Fig. 3 muestra que a 25 °C hubo variación entre los aislamientos. Un grupo presentó una tasa de crecimiento diario menor, compuesto por los aislamientos *Dpc*-07-1, 3, 7, 8, 14 y 06-1 y otro con una tasa mayor: *Dpc*-07-2, 05-2, 3 y *Dpc* Patrón. Tanto con la condición de alternancia de luz/oscuridad u oscuridad constante, el aislamiento 05-2 creció 14,1% y 15,02% respectivamente, más que la media general de todos los aislamientos. Por su parte las dos cepas que menos crecieron con respecto a la media general de todos los aislamientos de *Dpc* y en ambas condiciones de luz, fueron *Dpc*-07-7 y 07-8. La disminución promedio para ambos aislamientos fue de aproximadamente 11% (Fig. 1-III)

A 30 °C ningún aislamiento de *Dpc* probado manifestó crecimiento; a diferencia del patrón de *Dpm*. Teniendo en cuenta el total de aislamientos probados a 15, 20 y 25 °C, el promedio general indicó mayor crecimiento a medida que aumentó la temperatura (Fig. 2).

### Inoculación de los aislamientos a distintas temperaturas.

**a) En cámara climática:** El porcentaje promedio de plantas muertas a 15 y 20 °C fue similar entre aislamientos. Aunque en la fórmula del % PM se incluyeron los síntomas de muerte y de plantas afectadas, a estas temperaturas no se observaron "plantas afectadas". No hubo diferencias estadísticamente significativas (Fig. 3). Los valores oscilaron entre 80 y 100%.

Por su parte, a 25 °C los aislamientos conformaron dos grupos estadísticamente diferentes. Uno se caracterizó por inducir un mayor porcentaje de plantas muertas, constituido por *Dpc*-

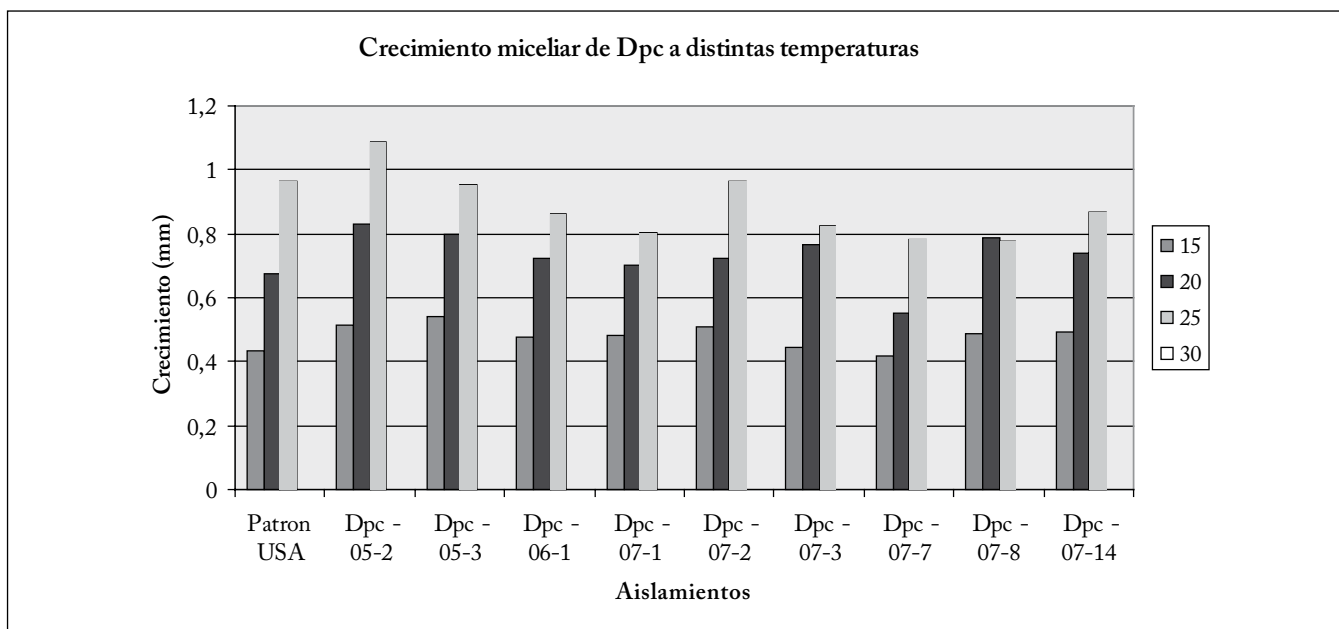
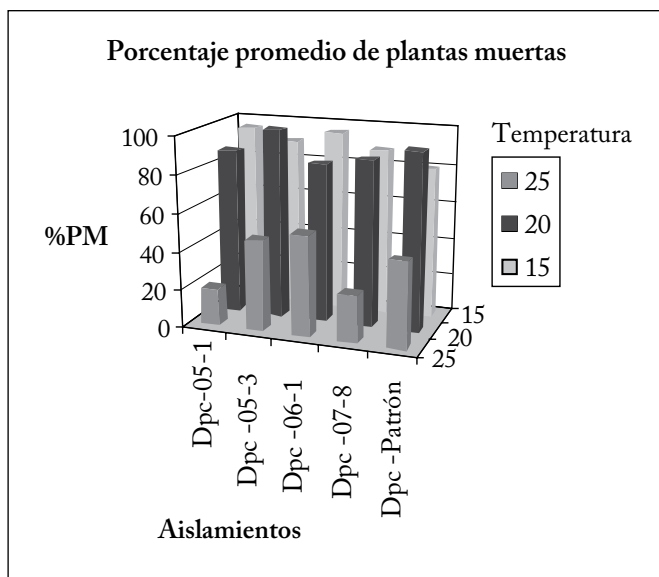


Fig. 2. Porcentaje promedio de plantas muertas (% PM) debido a la inoculación de 5 aislamientos de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* a 15, 20 y 25 °C.

Fig. 2. Daily mycelial growth of 10 isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* planted at 15, 20, 25 and 30 °C.



**Fig. 3.** Porcentaje promedio de plantas muertas (% PM) debido a la inoculación de 5 aislamientos de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* a 15, 20 y 25 °C.

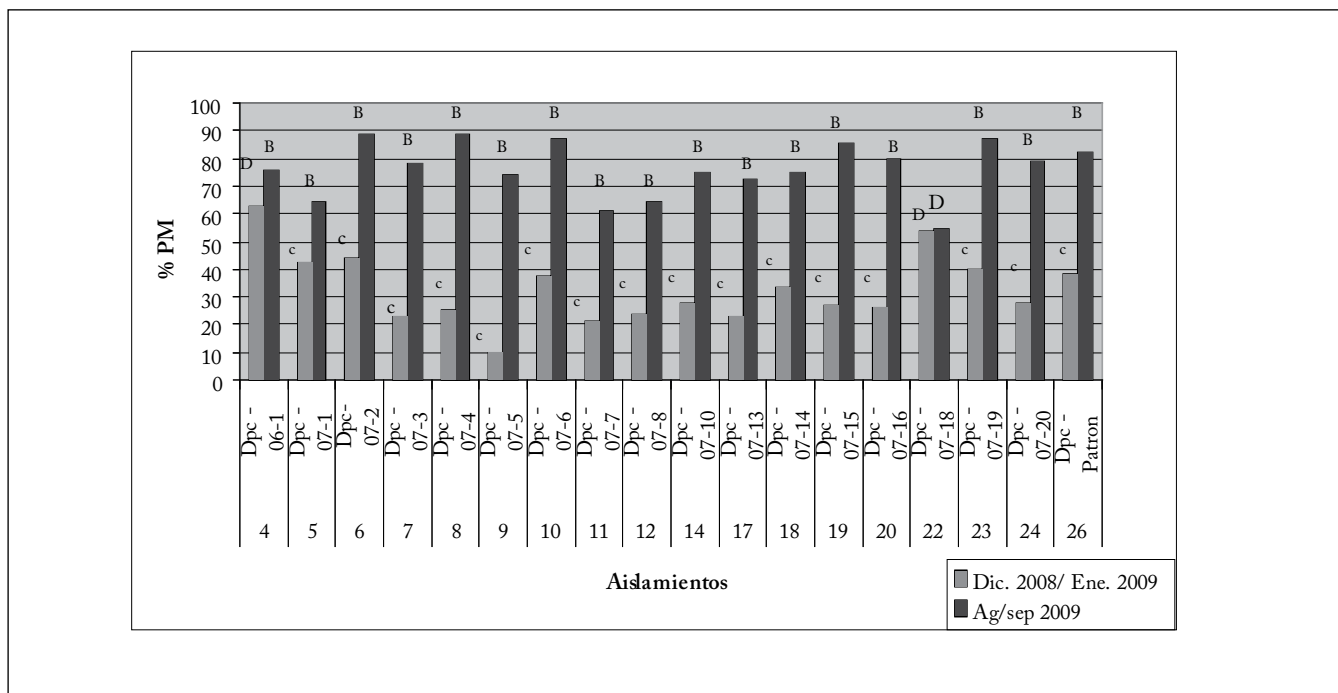
**Fig. 3.** Average percentage of dead plants (% PM) due to the inoculation of 5 isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* at 15, 20 and 25 °C.

05-1 y 07-8, y el otro por inducir menores valores, representado por *Dpc*-Patrón, 05-3 y 06-1. Los datos oscilaron entre 20 y 53% (Fig. 3). A esta temperatura se observaron plantas afectadas que no llegaron a morir en el transcurso del ensayo.

**b) En condiciones de invernáculo y en el campo:** En condiciones de invernáculo y en el campo la variabilidad de la reacción fue alta, y el rango promedio de plantas muertas osciló entre 10 y 89%. Las plantas en estos ensayos presentaron mejor estado general, menos ahiladas y con tallos más gruesos que en los ensayos en la cámara climática. En la inoculación b1) efectuada a fin de invierno-primavera, la mortandad fue mayor que en b2) a fin de primavera-verano. El rango de valores osciló entre 54,5 a 89% y 10 a 62,5%, respectivamente (Fig. 4).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que, con las condiciones de incubación probadas la máxima tasa diaria de crecimiento micelial de *Dpc* fue a 25 °C. A 30 °C ningún aislamiento manifestó crecimiento, diferenciándose de *Dpm*. Sin embargo, Backman et al. (1985) notaron que la tasa de crecimiento a 30 °C indicó discontinuidad entre los aislamientos de distinto origen. Keeling



**Fig. 4.** Porcentaje de plantas muertas inoculadas con aislamientos de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* en condiciones de invernáculo (Ag / Sep. 2009) y en el campo (Dic. 2008 / Ene. 2009).

Test DGC: Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), mayúsculas entre aislamientos, minúsculas entre campo/invernáculo. Cada valor es el promedio de 2 repeticiones evaluadas 30 días después de la inoculación.

**Fig. 4.** Percentage of dead plants inoculated with isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* under greenhouse (Ag / Sep. 2009) and field conditions (Dec. 2008 / Ene. 2009).

DGC test: Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ), capital letters among isolates, lowercase letters between field / greenhouse. Each value is the mean of  $n=2$ . Sampling was conducted 30 days after inoculation.

(1988) midió el crecimiento miceliar *in vitro* de *Dpc*, originario del sur y del norte de los EEUU: los aislamientos del sur alcanzaron un máximo de crecimiento a 25 °C y no se inhibieron a 32 °C, mientras que los del norte fueron inhibidos a 30 °C.

En este trabajo la tasa de crecimiento de todos los aislamientos de *Dpc* estudiados a 15 °C no se diferenció de la del patrón de *Dpm*. Asimismo, Keeling (1988) no encontró diferencias en el crecimiento miceliar de las cepas del Norte y del Sur de EEUU a temperaturas menores de 20 °C. Estos resultados y los antecedentes, sugieren que temperaturas por debajo de 20 °C no permitirían observar una posible diferenciación fisiológica entre las dos variedades causantes de CTS.

En las condiciones de este ensayo, si bien algunos aislamientos presentaron cierta variabilidad en relación con la tasa diferencial de crecimiento en medio de cultivo, en general no se encontró una alta variabilidad dentro de cada temperatura. Se podría inferir que las diferentes temperaturas de las distintas zonas geográficas de la provincia de Buenos Aires no ejercerían una presión de selección en la población del patógeno, dado que, dentro de la zona sur, un aislamiento (07-8) presentó la mayor tasa y otro (05-2) el menor crecimiento. Sin embargo, Atapia (1986) notó grandes variaciones entre aislamientos de *Dpc* en relación al crecimiento a diferentes temperaturas y regímenes de luz. Este autor encontró que el máximo crecimiento fue a 20 °C con luz, en tanto que a 30 °C el máximo crecimiento fue alcanzado en oscuridad.

En relación al factor luz, cierta variabilidad fue obtenida considerando la incubación bajo ciclos de luz-oscuridad u oscuridad continua. Se demostró que los ciclos de luz/oscuridad tuvieron un efecto positivo sobre la tasa de crecimiento a 15 °C; la incubación a las otras temperaturas estudiadas, no determinó diferencias significativas respecto al factor luz. Esto podría ser un factor para que los rastrojos dejados en superficie en épocas invernales, en sistemas de labranza de siembra directa, sean colonizados por el patógeno y presenten desarrollo de las estructuras reproductivas (Grijalba y Ridao, 2012).

El mayor porcentaje de plantas muertas ocurrió en cámara climática a temperaturas controladas y constantes de 15 y 20 °C. Los cinco aislamientos probados indujeron una mortandad similar entre ellos. A 25 °C, la mortandad de plantas fue menor y se diferenciaron dos grupos de aislamientos, uno provocó el doble de plantas muertas que el otro. Con las inoculaciones de invernáculo, con temperaturas variables que no superaron los 22 °C, la mortandad fue alta y similar entre los 18 aislamientos probados. Con las condiciones en el campo (ensayo b2) en Dic. 2008/ Ene. 2009, con temperaturas muy superiores, entre 19,3 y 31,1 °C, la mortandad de plantas disminuyó considerablemente, y solamente dos aislamientos (DPC-07-18 y 06-1) presentaron mortandad intermedia. En los casos de temperaturas mayores, probablemente las plantas no contraerían a la enfermedad. Estos resultados coincidirían con lo informado por Lago (2010) y Ridao (2012) quienes encontraron mayor incidencia del cancro del tallo de la soja en

el campo, en las siembras tempranas, con temperaturas relativamente bajas a templadas. En siembras tardías se encontró menor incidencia de la enfermedad. Similarmente, Madani et al. (1988) indicaron que en las siembras tardías las plantas “escapaban” a la enfermedad. En este trabajo se utilizó la fórmula propuesta por Yorinori (1996). Si bien ella se usa en ambos cancros del tallo de la soja, no la hemos propuesto nosotros pero entendemos que no solo se evalúan plantas muertas ya que en ellas se estima que la mitad de las plantas afectadas morirían en el campo. Tal vez en el futuro, sería aconsejable evaluar la severidad de la enfermedad midiendo el tamaño de la lesión, la cantidad de tallos afectados por planta y/o la alteración de los distintos componentes de rendimiento.

Kulik (1989) relacionó la velocidad de crecimiento miceliar *in vitro* de las cepas con la patogenicidad *in vivo*, y reportó que las cepas con crecimiento lento fueron más patógenas que las de crecimiento rápido. En este trabajo, no se relacionó velocidad *in vitro* de los aislamientos con su patogenicidad. Si bien Kulik mencionó que trabajó con *Dpc*, existe la posibilidad que las dos variedades causantes del cancro del tallo hayan estado incluidas; además el autor no hizo referencia a la temperatura con la cual condujo los ensayos de inoculación para determinar la patogenicidad.

Rupe y Sutton (1994) encontraron la mayor tasa de infección entre 22 y 30 °C, la que bajó considerablemente fuera de ese rango, aunque ellos trabajaron con biotipos de *Dpc* del sur de EEUU. En este trabajo ningún aislamiento desarrolló a 30 °C sobre medio de cultivo, por lo cual no se inocularon plantas a esa temperatura. Keeling (1988) presentó evidencias de que los aislamientos provenientes del norte de los EEUU no fueron patógenos a 30 °C, mientras que los del sur sí lo fueron a temperaturas entre 21 °C y 30 °C. Consecuentemente, dicho autor sugirió que dado el efecto de las temperaturas sobre el crecimiento y la patogenicidad de los aislamientos del norte y del sur, la temperatura podía influir en la distribución regional del patógeno. En nuestro país, *Dpm* fue encontrado produciendo epifitias en zonas sojeras del norte de la Argentina (Ploper, 1997). En cambio, con *Dpc* las epifitias fueron registradas principalmente en el centro-sur de la región, donde normalmente las temperaturas son más frescas (Ridao y Lago, 2007; Lago, 2010). No obstante, este patógeno fue identificado también en las provincias de Córdoba y Santa Fe (Pioli, 2007).

La similitud de crecimiento y el alto porcentaje de plantas muertas indicaría que las diferencias encontradas en la incidencia y severidad de cancro del tallo de la soja ocasionado por *Dpc* en la provincia de Buenos Aires se deberían al ambiente, adecuado para el desarrollo de la enfermedad.

## REFERENCIAS

- Atapia, E.E. y R.P. Pacumbaba (1986). Growth of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* isolates on media at various pH and temperature levels. *Phytopathology* 76: 1115 (Abstr.)

- Backman, P.A., D.B. Weaver y G. Morgan-Jones (1985). Soybean stem canker: An emerging disease problem. *Plant Disease* 69: 641-647.
- Costamilan, L.M., J.T. Yorinori, Á.M.R. Almeida, C.D.S. Seixas; E. Binneck, M.R. Araújo y J.A. Carbonari (2008). First report of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* infecting soybean plants in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 33: 381-385.
- Di Rienzo, J.A., A.W. Guzmán y F. Casanoves (2002). A multiple comparison method based on the distribution of the root node distance of a binary tree obtained by average linkage of the matrix of euclidean distances between treatment means. *JABES* 7: 1-14.
- Fehr, W.R. y C.E. Caviness (1977). Stages of soybean development. Iowa Agr. Exp. Stn. Spec. Rep. 80. 11 p.
- Fernández, F.A. y R.T. Hanlin (1996). Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia* 88: 425-440.
- Gomez, K.A. y A.A. Gomez (1984) Statistical procedures for agricultural research. New York, John Wiley y Sons. 680 p.
- Grijalba, P.E. y S. Marino (2001). Cancro del tallo de la soja: patogenicidad, prueba de algunos cultivares de soja y de hospedantes alternativos. *Revista Facultad de Agronomía* 21: 55-59.
- Grijalba, P.E. y E. Guillin (2005). *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* en Buenos Aires. En: Proc. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Córdoba, Argentina. p. 428.
- Grijalba, P.E. y E. Guillin (2007). Occurrence of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in the southern part of Buenos Aires province, Argentina. *Australian Plant Disease Notes* 2: 65-66.
- Grijalba, P.E. y A. del C. Ridao (2012). Survival of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* (causal agent of soybean stem canker) artificially inoculated in different crop residues. *Tropical Plant Pathology* 37: 271-274.
- Hartman, G.L., J.B. Sinclair y J.C. Rupe (Eds.) (1999). Compendium soybean diseases. 4th. Ed. APS Press Inc., St. Paul, MN, 100 p.
- Higley, P.M. y H. Tachibana (1987). Physiologic specialization of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in soybean. *Plant Disease* 71: 815-817.
- Hildebrand, A.A. (1953). An elaboration of toothpick method of inoculating plants. *Canadian Journal of Agricultural Science* 33: 506-507.
- Hobbs, T.W. y D.V. Phillips (1985). Identification of *Diaporthe phomopsis* isolates from soybean. *Phytopathology* 75: 500.
- Infostat. Software estadístico. (2009). Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC). [www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)
- Keeling, B.L. (1984). Evidence for physiologic specialization in *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Journal of the Mississippi Academy of Sciences* Suppl. 29: 5.
- Keeling, B.L. (1986). Effect of temperature on the growth of Northern and Southern isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Phytopathology* 75: 1278 (Abstr.).
- Keeling, B.L. (1988) Influence of temperature on growth and pathogenicity of geographic isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Plant Disease* 72: 220-222.
- Kulik, M.M. (1989). Variation in pathogenicity among isolates of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *caulivora*. *Mycologia* 81: 549-553.
- Lago, M.E. (2010). Etiología y aspectos epidemiológicos del cancro del tallo de la soja en el centro y sudeste bonaerense. Tesis Magister Scientiae en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 87 p.
- Lago M, E., A. del C. Ridao y S. Sanmartino (2007). Prevalencia e incidencia del cancro del tallo de la soja en el SE de la provincia de Buenos Aires., Argentina. *Fitopatología Brasileira* 32. Suplemento 311 p.
- Madani, A., V.T. Omer Sapra y B.P. Pacumbaba (1988). Relationship between Stem Canker incidence and agronomic performance of soybean at different dates of planting. *Phytopathology* 78: 1563 (Abstr.).
- Morgan-Jones, G. (1989). The *Diaporthe/Phomopsis* Complex: Taxonomic considerations. En: Actas IV Conf. Mundial de Investig. en soja, Bs. As., Argentina. pp 1699-1715.
- Morgan-Jones, G. (1985). The *Diaporthe/Phomopsis* complex of soybeans: morphology. Proceedings of the conference on the *Diaporthe/Phomopsis* complex of soybean. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Fort Walton Beach, Florida, USA. pp. 1-7.
- Pacumbaba, R.P. (1988). Variation in structure growth and pathogenicity of stem canker pathogen from the southeastern United States. *Phytopathology* 74: 827 (Abstr.).
- Pioli, R.N. (2007). Situación del Complejo *Diaporthe/Phomopsis* en el cultivo de Soja de Argentina. Actas de 3º Congreso de Soja del Mercosur (Rosario-Sta. Fe): Mercosoja 325-331.
- Pioli, R.N., E.N. Morandi y V. Bisaro (2001). First report of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in Argentina. *Plant Disease* 85: 95.
- Pioli, R.N., E.N. Morandi, M. Martinez, A. Tozzini, V. Bisaro y E. Hopp (2003). Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina Current Microbiology. *Phytopathology* 93: 136-146.
- Pioli, R.N., C. Cairo y E.N. Morandi (2005). Prevalence of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* as causal agent of soybean stem canker in Argentina. *Biocell* 29: 141.
- Ploetz, R.C. y F.M. Shokes (1989). Variability among isolates of *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* in different vegetative compatibility groups. *Canadian Journal of Botany* 67: 2751-2755.
- Ploper, L.D. (2004). Economic importance and control strategies for the major soybean diseases in Argentina. Proceedings VII World Soybean Research Conference. IV International Soybean Processing and Utilization Conference. III Congreso Brasileiro de Soja. Foz do Iguasu. PR, Brazil. pp. 606-614.
- Ploper, L.D., V. Gonzalez; G. Salas y M. Devani (1997). Cancro del tallo: importante enfermedad de la soja en el noroeste argentino. *Avance Agroindustrial* 69: 3-7.
- Ridao, A. del C. y M.E. Lago (2007). "Cancro del tallo de la soja". *Visión Rural XIV* 68: 56-57.
- Ridao, A. del C. (2012). Fechas de siembra y aparición del Cancro del tallo de la soja en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Libro resúmenes XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. San Luis-Argentina: 123 p.
- Rupe, J.C. y E.A. Sutton (1994). Effect of temperature on infection of soybean by southern biotype of the stem canker pathogen, *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Phytopathology* 84: 1120 (Abstr.).
- Sitio Web de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (2010). [http://www.buenosaires.gov.ar/areas/hacienda/sis\\_estadistico/areas\\_tematicas/medio\\_ambiente/index.php](http://www.buenosaires.gov.ar/areas/hacienda/sis_estadistico/areas_tematicas/medio_ambiente/index.php). Consultado 07/2011.
- Yorinori, J.T. (1996). Cancro da haste da soja: Epidemiologia e controle. Circ. Tecnica N 14. Embrapa. Londrina. 75 p.
- Young, H.C. (1943). The toothpick method of inoculating corn for ear and stalk rots. *Phytopathology* 33: 16 (Abstr.).