

## Caracterización del agente causal del cancro del tallo de la soja en Uruguay

Stewart Silvina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INIA La Estanzuela. Ruta 50 km 11, 70006 Colonia, Uruguay. Correo electrónico: sstewart@inia.org.uy

Recibido: 30/5/14 Aceptado: 27/4/15

### Resumen

Sesenta aislamientos de los hongos pertenecientes al complejo *Diaporthe/Phomopsis* de la soja fueron caracterizados utilizando morfología clásica y PCR-RFLP para determinar especie y variedad dentro de la especie. Algunos de los atributos morfológicos estudiados se asocian a cierta variedad dentro del complejo *Diaporthe/Phomopsis*. Utilizando PCR-RFLP, 37 aislamientos fueron identificados como *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, 19 como *D. p.* var. *caulivora* y 4 como *D. p.* var. *meridionalis*. Si bien se determinó que las dos variedades de *Diaporthe phaseolorum* causales de cancro del tallo coexisten en nuestro país, el 83 % de los aislados fueron identificados como *D. p.* var. *caulivora*. Esta predominancia tiene implicancias directas en el manejo de la enfermedad, debido a que los genes de resistencia incorporados a los cultivares comerciales de soja que le confieren resistencia a cancro del tallo no son efectivos para controlar esta variedad del hongo.

**Palabras clave:** *Diaporthe phaseolorum*, *caulivora*, *meridionalis*, *phomopsis*

### Summary

## Characterization of the Causal Agent of Stem Canker of Soybean in Uruguay

Sixty isolates of fungi belonging to the *Diaporthe/Phomopsis* complex in soybean were characterized using classical morphology and PCR-RFLP to determine species and varieties within the species. Some of the morphological attributes studied were associated to certain variety within the complex *Diaporthe/Phomopsis*. Using PCR-RFLP, 37 isolates were identified as *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, 19 as *D. p.* var. *caulivora*, and 4 as *D. p.* var. *meridionalis*. Despite the fact that both varieties of *Diaporthe phaseolorum* causing stem canker coexist in our country, 83 % of the isolates were identified as *D. p.* var. *caulivora*. This predominance has direct implications on disease management, since resistant genes incorporated in most available soybean cultivars to control stem canker are not effective against this variety of the fungus.

**Keywords:** *Diaporthe phaseolorum*, *caulivora*, *meridionalis*, *phomopsis*

## Introducción

Durante la zafra 2012/13 el cultivo de soja en el Uruguay fue afectado por una enfermedad llamada cancro del tallo, con incidencias medidas en chacra de hasta 35-40 % (Stewart, no publicado). En el mundo y en la región, esta enfermedad es causada por dos variedades del hongo *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc.: *D. phaseolorum* var. *meridionalis* Fernández & Hanlin y *D. phaseolorum* var. *caulivora* Athow & Cadwell (Fernandez *et al.*, 1999; Pioli *et al.*, 2003; Yorinori, 1996). Estas dos variedades del hongo, además de *D. phaseolorum* var. *sojae* (Lehman) Wehmeyer agente causal del tizón de la vaina y el tallo, y *Phomopsis longicolla* Hobbs, agente causal de la pudrición de semilla de soja, forman el complejo *Diaporthe/Phomopsis* de la soja. En nuestro país, el único hongo de este complejo debidamente reportado es *D. phaseolorum* var. *sojae* (Monteiro *et al.*, 1984), no habiendo reportes previos de cancro del tallo.

Durante la década de 1970, el cancro del tallo fue detectado por primera vez en los estados del sur de Estados Unidos y el organismo causal fue identificado como *D. phaseolorum* var. *caulivora* (Backman *et al.*, 1981; Snow *et al.*, 1984). En 1992 se evaluó la patogenicidad de los aislados del sur y del norte de EUA, llegando a distinguir razas fisiológicas y diferencias en preferencias de temperatura entre los mismos, que posteriormente dieron lugar a la diferenciación entre *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (cancro del sur de EUA) y *D. phaseolorum* var. *caulivora* (cancro del norte de EUA) (Keeling, 1982, 1984, 1988; Morgan Jones, 1989), y a la clasificación como *variedades* del hongo. En Argentina, en 1992, se determinó que el cancro del tallo era causado por *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Ivancovich, 1992), extendiéndose luego a la zona núcleo de producción de granos de soja (Pioli *et al.*, 1997). En 1999 se identifica por primera vez a *D. phaseolorum* var. *caulivora* en la provincia de Santa Fe (Pioli *et al.*, 2001) y se afianza como agente predominante del cancro del tallo, debido a la disponibilidad de genotipos de soja con resistencia a *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Pioli *et al.*, 2002). En 2005 surge de forma epidémica en Buenos Aires con una prevalencia del 94 % e incidencias de hasta 55,5 % en el centro y sureste bonaerense (Grijalba *et al.*, 2011; Lago, 2010). En Brasil, el cancro del tallo fue identificado por primera vez en 1989, causado por *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, llegando a ocasionar pérdidas de hasta 100 % (Yorinori, 1996). Posteriormente, en 2006, se encuentra la forma *D. phaseolorum* var. *caulivora* en Rio Grande do Sul (Costamilan *et al.*, 2008).

La determinación de la variedad del hongo es importante porque hay cuatro genes mayores conocidos en soja que confieren resistencia a *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Rdm1-Rdm4), pero no confieren resistencia a la variedad *D. phaseolorum* var. *caulivora* (Pioli *et al.*, 2003). El cancro del tallo causado por *D. phaseolorum* var. *meridionalis* se maneja a través de resistencia genética, es así que la mayoría de las variedades comerciales de soja presentan en su descripción varietal la caracterización frente a esta enfermedad (resistente, susceptible o tolerante a cancro del tallo). Contrariamente, no se han detectado hasta el momento genotipos de soja resistentes a *D. phaseolorum* var. *caulivora* (Grijalba *et al.*, 2011). Sin embargo la evaluación de numerosos genotipos procedentes de diferentes fuentes de germoplasma de soja indican posibles fuentes de resistencia a esta variedad (Pioli *et al.*, 2012).

La determinación de la variedad del hongo mediante caracteres morfológicos es dificultosa, las características son altamente variables y muchas veces no permite establecer claras diferencias taxonómicas (Pioli *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1998). Algunas de las características morfológicas propuestas para la identificación son: color y apariencia de la colonia, tamaño y forma del estroma, tamaño de los conidios  $\alpha$  y  $\beta$ , y tamaño y arreglo de peritecios (Grijalba *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 1998). Para la reproducibilidad de algunos de estos atributos morfológicos se debería asegurar la repetitividad en las condiciones y los medios de cultivo utilizados (Fernandez y Hanlin, 1996). Con el objetivo de sortear estas dificultades, Zhang *et al.* (1998) desarrollan una técnica molecular basada en la amplificación del fragmento ITS del ADN ribosomal nuclear con el posterior uso de enzimas de restricción (PCR-RFLP). Esta técnica separa las especies del complejo *Diaporthe/Phomopsis* y diferencia con exactitud entre las variedades *D. phaseolorum* var. *meridionalis* y *D. phaseolorum* var. *caulivora*.

El objetivo de este trabajo fue determinar el agente causal del cancro del tallo en Uruguay, utilizando la técnica de PCR-RFLP y la identificación morfológica tradicional.

## Materiales y métodos

### Procedencia y obtención de los aislados

Se recuperaron un total de 60 aislados; un aislado obtenido de tallo afectado de la zafra 2011/2012, uno de semilla zafra 2011/2012, 57 de tallos afectados de la zafra 2012/13, y uno de raíz de la zafra 2012/13. Las muestras provinieron de 32 chacras en los departamentos de Colonia, Flores, Rivera, San José, Soriano y Treinta y Tres. Para la

obtención de los aislados la parte afectada del tallo fue puesta en cámara húmeda, luego de uno a cinco días se procedió a cortar a lo largo del tallo una lámina de la corteza hasta dejar expuesta la parte interna de los peritecios y/o picnidios, con una aguja flameada se extrajo el contenido de la estructura y se lo transfirió a PDA ácido (1 L de solución colada proveniente de 200 g papas hervidas, 10 g dextrosa, 20 g agar, tres gotas de ácido láctico al 25 % por placa de Petri). Todos los aislados fueron purificados utilizando el método de punta de hifa (French y Herbert, 1980), y fueron conservados a 4 °C en tubos con PDA.

### Extracción de ADN

Se utilizó un procedimiento de extracción CTAB modificado (Doyle y Doyle, 1987). Brevemente, se raspó el micelio de una placa de PDA con 8-10 días de crecimiento, se agregó 700 µl de buffer de extracción, se mezcló y se incubó a 65 °C por 60 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregó 700 µl de cloroformo isoamílico 24:1, mezclando suavemente. Se centrifugó 20 min a 3000 rpm, se pasó el sobrenadante a tubo nuevo y se repitió dos veces. Se agregó 500 µl de isopropanol y se dejó 2 h a 4 °C. Se centrifugó a 5000 rpm por 20 min, se descartó el sobrenadante y se agregó 200 µl de etanol 70 %, se repitió dos veces. Se invirtió el tubo, se dejó secar, y se resuspendió en 150 µl ddH<sub>2</sub>O estéril.

### Amplificación de la región ITS y RFLPs

Se utilizaron los cebadores universales ITS4 e ITS5 para amplificar la región ITS del ADN ribosomal nuclear en un ciclador MultiGene Thermalcycler (Labnet International, Inc.). Se utilizó un mix de 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dTTP, dAPT, dFTP, y dCTP; 0,5 pmol de los cebadores ITS 4 e ITS 5; 0,5 unidades de Taq polimerasa (HydroPol™ Bioline USA, Inc.) y 1 ¼ de ADN genómico para llegar a un volumen final de 20 ¼. El PCR se llevó a cabo con un ciclo de 96 °C durante 3 min, y 24 ciclos de 94 °C 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, luego 72 °C por 4 min. El producto de PCR fue cortado con las enzimas de restricción *Alu I* (Biolabs, Inglaterra) y *Rsa I* (Bioron, Alemania) siguiendo el protocolo del proveedor. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % y se detectaron con Gel Red™ o GoodView™ visualizándose bajo luz ultravioleta; se utilizó un marcador molecular de 1-kb ADN de doble hebra.

### Determinación morfológica

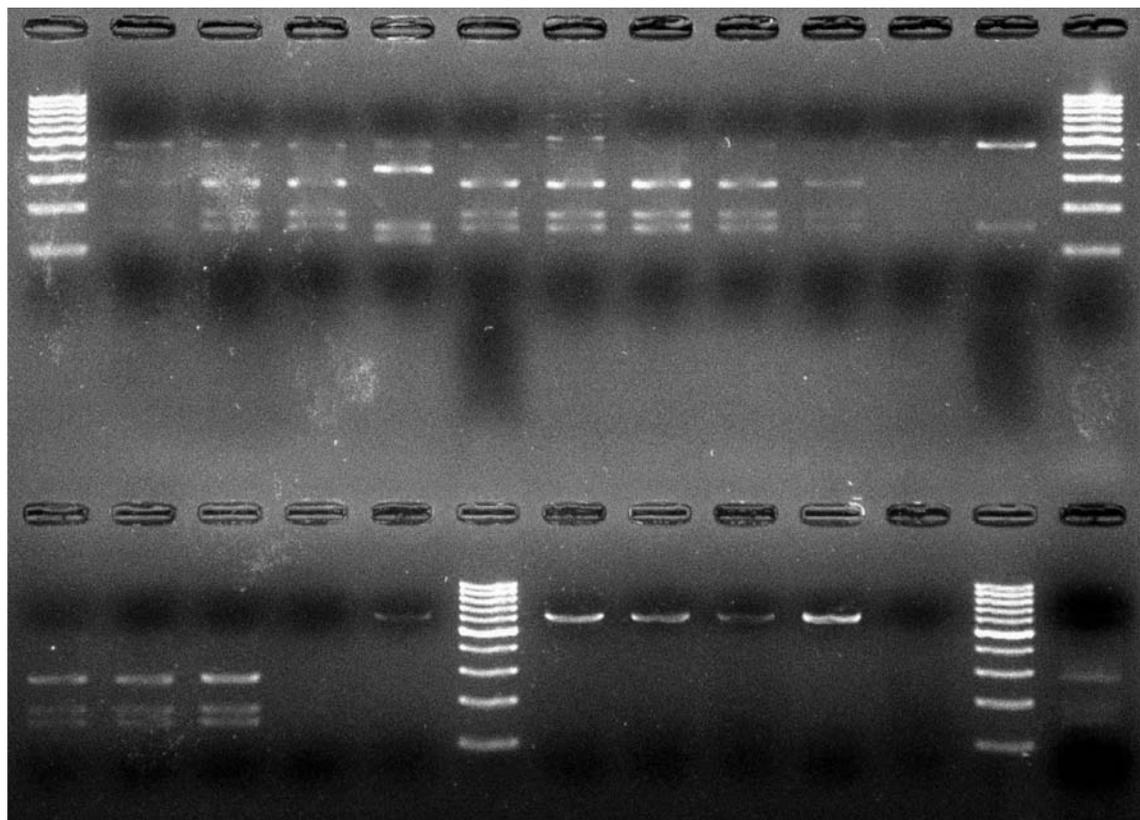
Los aislados fueron transferidos a PDA con tallos de soja estériles para inducir la formación de las estructuras sexuales y fueron incubados a 25 °C en la oscuridad por 30-40 días (Pioli *et al.*, 2003). Se caracterizó la morfología de la colonia: color, tipo de micelio, presencia y tipo de estroma, presencia de picnidios, presencia y tipo de conidio, presencia y tipo de agrupamiento de peritecios, presencia y forma del cuello del peritecio (Pioli *et al.*, 2003).

### Análisis de datos

Se realizó un análisis de correspondencia múltiple, utilizando PROC CORRESP en SAS versión 9.2 (SAS Institute, Cary, NC), entre las características morfológicas y el resultado de la identificación molecular de cada aislado. Previamente, a cada característica morfológica se le asignaron dos o tres atributos, basados en descripciones tomadas de la bibliografía (Zhang *et al.*, 1998; Pioli *et al.*, 2003) y en diferencias observadas a simple vista o con el uso de una lupa binocular y/o microscopio. Al carácter color se le asignaron dos atributos: blanco-grisáceo y blanco-amarroado. Al tipo de micelio se le asignaron tres atributos: micelio esponjoso, con hebras y con motas. Al tipo de estroma se le asignaron tres atributos: ausencia de estroma, estroma localizado y estroma extendido. A picnidios se le asignaron dos atributos: ausencia o presencia. A conidios se le asignaron tres atributos: ausencia, conidios tipo α y conidios tipo β. Los peritecios tienen como atributos ausencia y presencia de peritecios solitarios o agrupados. Al cuello del peritecio se le asignaron: ausencia o presencia de cuello largo y fino o corto y grueso.

### Resultados

Se amplificó el ADN de los 60 aislados en sucesivas corridas, todos ellos produjeron una banda de aproximadamente 600 pb. La enzima *Alu I* digirió 56 de los productos de PCR provenientes de la amplificación del ADN de los 60 aislados; de estos, 36 aislados presentaron dos bandas de 458/146 pb, 19 tres bandas de 281/176/145 pb y 1 tres bandas de 339/146/124 pb (Figura 1, Cuadros 1 y 2). Por el contrario, la misma enzima no digirió el producto de PCR proveniente de la amplificación del ADN de cuatro de los 60 aislados. La enzima *Rsa I* no digirió el ADN de ninguno de los productos de amplificación de los 60 aislados. Utilizando el criterio de patrón de bandas asociado a la especie/variedad del hongo de Riccioni (2009) y de Zhang *et al.* (1998) (Cuadro 1) se pudieron identificar y discriminar los 60



**Figura 1.** Bandas RFLP digeridas con *Alu I* para 19 de los aislamientos estudiados. Línea 1, 13, 19 y 25 marcador molecular 1 kb. Líneas 2-4, 6-10 y 14-16 *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, líneas 5 y 12 *D.p.* var. *sojae*, líneas 18 y 20-23 *D. p.* var. *meridionalis*, líneas 11, 17 y 24 blancos.

aislados estudiados en 37 *D. phaseolorum* var. *sojae*, 19 *D. phaseolorum* var. *caulivora* y 4 *D. phaseolorum* var. *meridionalis* (Cuadro 2).

Veintitrés de los 60 aislados (38,3 %) fueron determinados como pertenecientes al complejo *Diaporthe/Phomopsis* causales de cancro del tallo. Entre ellos, el 82,6 %

**Cuadro 1.** Patrón de bandeo para la identificación de especies/variedades del complejo *Diaporthe/Phomopsis* (modificado de Riccioni, 2009)

Especie/variedad	Largo de bandas (pares de bases)	
	Enzima <i>Alu I</i>	Enzima <i>Rsa I</i>
<i>P. longicolla</i>	458/146	394/210
<i>D. p.</i> var. <i>caulivora</i>	281/176/145	603
<i>D. p.</i> var. <i>meridionalis</i>	603	603
<i>D. p.</i> var. <i>sojae</i>	458/146 339/146/124	603

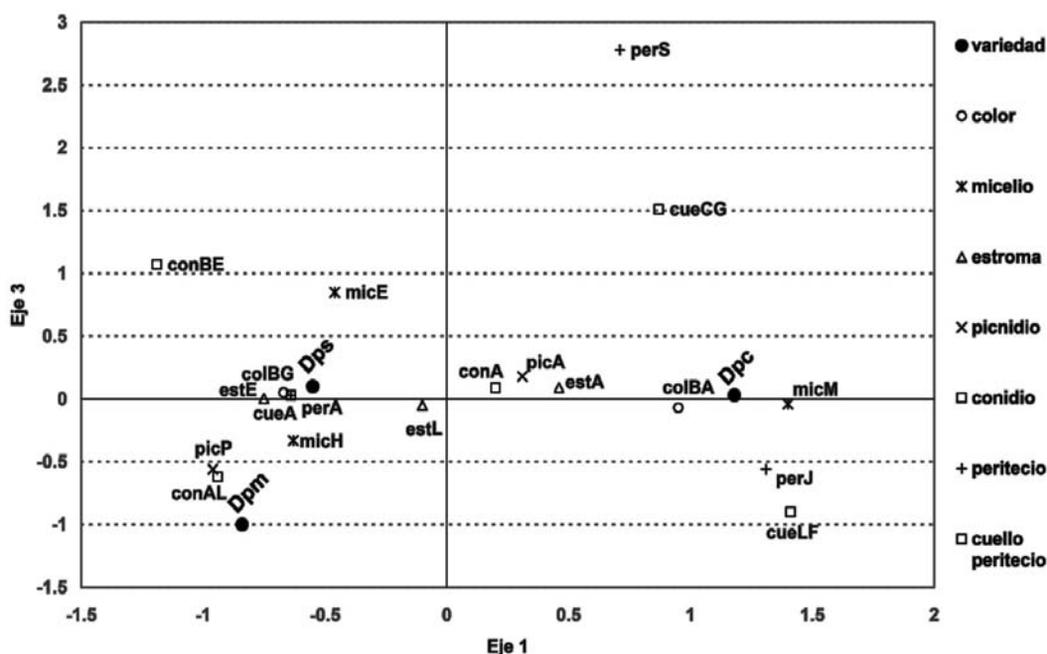
resultó de la variedad del hongo *D. phaseolorum* var. *caulivora*.

En general las características morfológicas evaluadas coinciden con las determinadas para cada especie y/o variedad del hongo. A pesar de ello, varios de los aislados presentaron características confusas o solapadas (color, agrupación de peritecios) con otros miembros del complejo *Diaporthe/Phomopsis*. Además, algunas estructuras nunca se formaron, como fue el caso de los picnidios en algunos aislados de *D. phaseolorum* var. *sojae*

Algunos de los atributos morfológicos estudiados se asocian más a cierta variedad del hongo que a otra, y explican un 46 % de la varianza o de la inercia acumulada (Figura 2). Es el caso de *D. phaseolorum* var. *caulivora* con el color blanco-amarronado, el micelio formando motas y la presencia de peritecios agrupados. La presencia de picnidios con conidios tipo  $\alpha$  se asocia más a *D. phaseolorum* var. *meridionalis*; y el color blanco-grisáceo, la ausencia de peritecios y de sus respectivos cuellos y la presencia de estroma extendido se asocian más a *D. phaseolorum* var.

**Cuadro 2.** Colección de aislados de *Diaporthe phaseolorum* por localidad, departamento, variedad de soja, y largo de banda resultante de la digestión de enzimas de restricción.

Muestra	Localidad	Departamento	Cultivar	Largo de bandas (pb)		<i>Diaporthe phaseolorum</i> var.
				Enzima <i>Alu I</i>	Enzima <i>Rsal</i>	
D03	La Estanzuela	Colonia	s/d	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D04	s/d	s/d	semilla	458/146	603	<i>sojae</i>
D05.1	Palmitas	Soriano	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D06.1	Palmitas	Soriano	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D07.1	Mercedes	Soriano	7000	458/146	603	<i>sojae</i>
D07.2	Mercedes	Soriano	7000	458/146	603	<i>sojae</i>
D07.3	Mercedes	Soriano	7000	458/146	603	<i>sojae</i>
D08	Tres arboles	San José	s/d	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D08.1	Tres arboles	San José	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D08.2	Tres arboles	San José	s/d	603	603	<i>mendionalis</i>
D08.3	Tres arboles	San José	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D09.2	Mercedes	Soriano	7321	458/146	603	<i>sojae</i>
D10	La Estanzuela	Colonia	NA 4990	458/146	603	<i>sojae</i>
D11	Mercedes	Soriano	6.2	458/146	603	<i>sojae</i>
D12.1	s/d	s/d	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D13	s/d	s/d	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D14	s/d	s/d	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D15.1	ruta 1	San José	IGRA 510	458/146	603	<i>sojae</i>
D15.2	ruta 1	San José	IGRA 510	458/146	603	<i>sojae</i>
D16.1	Mercedes	Soriano	s/d	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D16.2	Mercedes	Soriano	s/d	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D17.2	Treinta y tres	Treinta y tres	6126	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D18.1	Treinta y tres	Treinta y tres	DM6.8	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D18.2	Treinta y tres	Treinta y tres	DM6.8	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D19.1	Treinta y tres	Treinta y tres	RA55	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D20	Dolores	Soriano	5.9	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D20.2	Dolores	Soriano	5.9	458/146	603	<i>sojae</i>
D20.3	Dolores	Soriano	5.9	458/146	603	<i>sojae</i>
D21	Riachuelo	Colonia	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D22	San Pedro	Colonia	6.2	458/146	603	<i>sojae</i>
D23	San Pedro	Colonia	5.9	458/146	603	<i>sojae</i>
D24.1	Palmitas	Soriano	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D24.2	Palmitas	Soriano	s/d	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D25.1	Arroyo del medio	Soriano	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D25.2	Arroyo del medio	Soriano	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D26.2	Rafael Peraza	San José	FN 5.75	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D26.3	Rafael Peraza	San José	FN 5.75	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D26.4	Rafael Peraza	San José	FN 5.75	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D27	Puntas perdido	Flores	DM7.0i	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D27.1	Puntas perdido	Flores	DM7.0i	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D28	Paso Lajeado	Rivera	A 5909	458/146	603	<i>sojae</i>
D29	Rincón del pino	San José	DM7.0	603	603	<i>mendionalis</i>
D30	Rincón del pino	San José	DM7.0	458/146	603	<i>sojae</i>
D31	Rincón del pino	San José	A 5009	339/146/124	603	<i>sojae</i>
D32	Rincón del pino	San José	A 5009	458/146	603	<i>sojae</i>
D33	Paso Laguna	Treinta y tres	A 5909	458/146	603	<i>sojae</i>
D34.1	Rincón del pino	San José	A6411	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D34.2	Rincón del pino	San José	A6411	458/146	603	<i>sojae</i>
D34.3	Rincón del pino	San José	A6411	458/146	603	<i>sojae</i>
D35.1	Rincón del pino	San José	TJ2178	458/146	603	<i>sojae</i>
D35.2	Rincón del pino	San José	TJ2178	458/146	603	<i>sojae</i>
D36.1	Rincón del pino	San José	IGRA 562	458/146	603	<i>sojae</i>
D36.2	Rincón del pino	San José	IGRA 562	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D37.1	Rincón del pino	San José	IGRA 510	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D37.2	Rincón del pino	San José	IGRA 510	281/176/145	603	<i>caulivora</i>
D38	La Estanzuela	Colonia	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D38.1	La Estanzuela	Colonia	s/d	458/146	603	<i>sojae</i>
D38.2	La Estanzuela	Colonia	s/d	603	603	<i>mendionalis</i>
D39.1	Rincón del pino	San José	TJ 2164	603	603	<i>mendionalis</i>
D39.2	Rincón del pino	San José	TJ 2164	458/146	603	<i>sojae</i>



**Figura 2.** Asociación entre las variedades de *Diaporthe phaseolorum* y las características morfológicas de los aislamientos, realizado utilizando análisis de correspondencia múltiple (ACM). Referencias: colBG= color blanco-grisáceo, colBA= color blanco-amarronado, micE=micelio esponjoso, micH= micelio con hebras, micM= micelio con motas, estA= ausencia de estroma, estL= estroma localizado, estE= estroma extendido, picA= ausencia de picnidios, picP= presencia de picnidios, conA= ausencia de conidios, conAL= presencia de conidios alfa, conBE= presencia de conidios beta, perA= ausencia de peritecios, perS= presencia de peritecios solitarios, perJ= presencia de peritecios agrupados, cueA= ausencia de cuello, cueLF= presencia de cuello largo y fino, cueCG= presencia de cuello corto y grueso.

*sojae*. Estos dos últimos integrantes del complejo parecen ser más parecidos morfológicamente entre ellos, aunque esta similitud podría estar influenciada por el bajo número de aislados de *D. phaseolorum* var. *meridionalis* estudiados.

## Discusión

Este es el primer reporte de cancro del tallo de la soja en el país. En este trabajo se logra identificar tres integrantes del complejo *Diaporthe/Phomopsis*; *D. phaseolorum* var. *sojae* agente causal del tizón de la vaina y el tallo, y los dos agentes causales del cancro del tallo *D. phaseolorum* var. *meridionalis* y *D. phaseolorum* var. *caulivora*.

Si bien hubo atributos morfológicos de los aislados que se asociaron más a una variedad del hongo que a otra, no hubo una delimitación clara si se considera que un factor está bien representado en el espacio cuando la suma de sus contribuciones o la inercia acumulada es al menos un 60 %, mejor aún un 75 % (Bendixen, 2003). En este trabajo las dos dimensiones explican tan solo un 46 % de la varianza o de la inercia acumulada, por lo que las características

morfológicas utilizadas no serían suficientemente certeras como para delimitar especies o variedades dentro del complejo *Diaporthe/Phomopsis*. Son varios los autores que han mencionado solapamientos de las características morfológicas entre aislados de distintas especies dentro del complejo *Diaporthe/Phomopsis*, además de aislados atípicos e incongruencias en la morfología (Grijalba *et al.*, 2011; Pioli *et al.*, 2003; Yorinori 1991; Zhang *et al.*, 1998). Por otro lado, la técnica de PCR-RFLP propuesta es sencilla y discrimina fácilmente entre especies/variedades del hongo.

La proporción de aislados de *D. phaseolorum* var. *sojae* recuperada de la totalidad de los tallos fue alta (61,7 %), y estuvo probablemente influenciada por la metodología utilizada para aislar el hongo del tallo. Al dejar los tallos en cámara húmeda hasta obtener estructuras de las cuales aislar, se dio tiempo a que *D. phaseolorum* var. *sojae* colonizara el tallo, subestimando así la recuperación de los verdaderos agentes causales del cancro en el tallo. Para futuros trabajos, se propone el aislamiento directo a partir del margen de la lesión de tallos tan pronto han sido recolectados del campo (Grijalba *et al.*, 2011).

El agente causal del cancro del tallo más frecuentemente recuperado (>80 %) de los tallos fue *D. phaseolorum* var. *caulivora*. Se concluye que si bien en el país están presentes ambas variedades de *Diaporthe phaseolorum*, la variedad *caulivora* fue la que predominó, por lo que la epidemiología de la enfermedad se asemejaría a la del cancro del norte de EUA (Keeling, 1984, 1988).

La predominancia de *D. phaseolorum* var. *caulivora* podría estar asociada con las diferencias en los requerimientos de temperatura (o rangos de temperaturas óptimas) entre las variedades del hongo. El hongo *D. phaseolorum* var. *caulivora* prefiere temperaturas más frescas, entre 20 y 25 °C, mientras que *D. phaseolorum* var. *meridionalis* prefiere temperaturas más cálidas, entre 25 y 30 °C (Keeling, 1988). Esto coincide con que el 98 % de los aislados estudiados provienen del sur de nuestro país, con temperaturas medias relativas más frescas durante la zafra que en el norte del país.

Asimismo, los resultados podrían estar asociados indirectamente con la presión de selección ejercida por el uso de la resistencia a *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, incorporada en casi todas las variedades de soja utilizadas comercialmente en nuestro país que provienen de Argentina. Los genes de la soja que confieren resistencia a *D. phaseolorum* var. *meridionalis* no determinan resistencia a *D. phaseolorum* var. *caulivora* (Pioli *et al.*, 2003; Pioli, 2011), lo que tiene grandes implicancias para el manejo de la enfermedad, dado que aquellas variedades que aparecen caracterizadas como resistentes al cancro del tallo en realidad no serán resistentes a la variedad del hongo causal del cancro del tallo en Uruguay.

## Agradecimientos

A Marcelo Rodríguez por su dedicación en las distintas etapas de este proyecto, a Wilfredo Ibáñez por su asesoramiento estadístico, a Paula Silva y Luciana Landechea del laboratorio de biotecnología de La Estanzuela por su asesoramiento y buena disposición, y a los revisores por sus sugerencias.

## Bibliografía

- Backman PA, Crawford MA, White J, Thurlow DL, Smith LA. 1981. Soybean stem canker : a serious disease in Alabama. *Highlights Agricultural Research*, 28(4): 6.
- Bendixen M. 2003. A Practical Guide to the Use of Correspondence Analysis. *Marketing Research Marketing Bulletin*, 14. *Technical Note*, 2: 15.
- Costamilan LM, Yorinori JT, Almeida AMR, Seixas CDS, Binneck E, Araujo MR, Carbonari JA. 2008. First report of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* infecting soybean plants in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 33(5): 381 - 385.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11 - 15.
- Fernandez FA, Philips DV, Russin JS, Rupe JC. 1999. *Diaporthe-Phomopsis* complex. En: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC. [Eds.]. Compendium of soybean diseases. 4th ed. St. Paul : The American Phytopathological Society. pp. 33 - 35.
- Fernandez FA, Hanlin RT. 1996 Morphological and RADP analysis of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia*, 88: 425 - 440.
- French ER, Herbert TT. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José : IICA. 80 p.
- Grijalba PE, Ridaó A del C, Guillin E. 2011. Caracterización taxonómica y análisis de la variabilidad del agente causal del cancro del tallo de la soja en Buenos Aires (2005/2007). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 37(3): 290 - 297.
- Ivancovich A. 1992. Enfermedades del tallo de la soja : Carpeta de Producción. Pergamino : EE INTA. 11p.
- Keeling BL. 1988. Influence of temperature on growth and pathogenicity of geographic isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Plant Disease*, 72: 220 - 222.
- Keeling BL. 1984. Evidence of physiological specialization in *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Journal of the Mississippi Academy of Science*, 29(S): 5.
- Keeling BL. 1982. A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Phytopathology*, 72: 807 - 809.
- Lago ME. 2010. Etiología y aspectos epidemiológicos del cancro del tallo de la soja en el centro y sudeste bonaerense [Tesis Magister]. Balcarse : Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias. 87p.
- Monteiro C, Ferrés C, Correa A. 1984. Relevamiento micológico del cultivo de soja. En: 7a Reunión Técnica; 5 - 7 setiembre, 1984. Montevideo : Universidad de la República. Facultad de Agronomía. pp. 63.
- Morgan Jones G. 1989. The *Diaporthe/Phomopsis* complex : taxonomic considerations. En: Pascale AJ. [Ed.]. World Soybean Research Conference IV Proceedings. Buenos Aires : Orientación Gráfica Editora. pp. 1699 - 1706.
- Pioli RN. 2011. *Diaporthe/Phomopsis* : problema superado o amenaza latente? Una mirada retrospectiva y actual para abordar el desafío próximo. En: Quinto Congreso de la soja del Mercosur; Primer Foro de la Soja Asia-Mercosur; 14 - 16 de setiembre, 2011; Rosario, Argentina. Mercosojas 2011: un grano, un universo. Rosario: Bolsa de Comercio de Rosario. pp. 1 - 5.
- Pioli RN, Cairo CA, Pratta G, Morandi EN. 2012. Análisis de la resistencia a *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* en dos fuentes de germoplasma de *Glycine max*. En: XV Congreso Latinoamericano de Genética, XLI Congreso Argentino de Genética, XLV Congreso de la Sociedad Genética de Chile, II Reunión Regional SAG-Litoral; 28 - 31 de Octubre, 2012; Rosario, Argentina. Rosario: ALAG. pp. 10 - 15.
- Pioli RN, Morandi EN, Martínez MC, Lucca F, Tozzini A, Bisaro V, Hopp HE. 2003. Morphological, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. *Phytopathology*, 93: 136 - 146.
- Pioli RN, Morandi EN, Luque A, Gosparini CO. 2002. Recent outbreak of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in the main soybean producing region of Argentina. *Plant Disease Note*, 86(12): 1403.
- Pioli RN, Morandi EN, Bisaro V. 2001. First report of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in Argentina. *Plant Disease*, 85(1): 95.
- Pioli RN, Gattuso S, Prado D, Borghi A. 1997. Recent outbreak of stem canker (*D. phaseolorum* var. *meridionalis*) of soybean (*Glycine max*) in Santa Fe Argentina. *Plant Disease Note*, 81(10): 1215.
- Riccioni L. 2009. Identificación de las especies del complejo *Diaporthe/Phomopsis* por métodos moleculares. *Análisis de semillas*, 3(supl.2): 81-84.

- Snow JP, Berggren GT, Harville BG, Whitman HK.** 1984. Stem canker : A soybean disease recently found in Louisiana. *Louisiana Agriculture Magazine*, 27(8): 9 - 24.
- Yorinori JT.** 1996. Cancro da haste da soja : Epidemiologia e controle. Londrina : Embrapa. 75p. (Circular Técnica ; 14).

- Yorinori JT.** 1991. Distinction between pod and stem blight and stem canker Phomopsis on soybean seeds by blotter test. *Fitopatologia Brasileira*, 16: 37.
- Zhang AW, Riccioni L, Pederson WL, Kollipara KP, Hartman GL.** 1998. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. *Phytopathology*, 88: 1306 - 1314.