

## **DETECCION DE *Phomopsis sojae* DURANTE EL CULTIVO DE SOJA**

### **Técnica de laboratorio**

#### **Introducción**

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.) se cultiva en Argentina desde 1960 y ha sido el cultivo de más rápida adopción y expansión en la historia de la agricultura Argentina. En la actualidad, es el principal producto de la agricultura nacional, por su participación en el valor total de la producción y de las exportaciones. La producción pasó de 59.000 toneladas en la campaña 1970/71 a 35 millones de toneladas en la campaña 2002/2003. En el mismo período la superficie de siembra evolucionó de 37.700 has a 12.800.000 has, con un rendimiento promedio de 2600 kg/ha (Escande, 2002; SAGPyA, 2003). Durante la campaña 2002/03 en la provincia de Córdoba se sembraron 3.564.352 has, con una producción de 9.851.100 ton, con un rendimiento promedio de 2.780 kg/ha (SAGPyA, 2003).

La soja se cultiva en Argentina en una amplia zona, desde los 23° a los 38° de latitud Sur, estando concentrada en un 95% en la región pampeana norte, en las provincias de Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, Buenos Aires, La Pampa y San Luis, distribuyéndose el resto en las provincias del noroeste (Salta, Tucumán, Santiago del Estero, Chaco) y el noreste (Corrientes y Misiones). En esta amplia zona, las condiciones edáficas y climáticas influyen en el desarrollo y prevalencia de las enfermedades. La importancia económica de éstas depende de la zona, del patógeno presente, del manejo del cultivo y del grado de susceptibilidad del cultivar utilizado.



**Figura 1: Cultivo de soja**

Las enfermedades constituyen uno de los principales factores limitantes del cultivo de soja, afectando tanto el rendimiento como la calidad de la semilla. A nivel mundial se calcula que las pérdidas promedio atribuibles a enfermedades oscilan entre 10 y 15%. En las áreas de reciente introducción, el rendimiento es usualmente alto, reduciéndose luego debido a la ocurrencia de enfermedades favorecidas por la uniformidad del germoplasma, la inclusión sostenida de soja en la rotación de cultivos y la reducción de las labranzas con el fin de preservar los suelos agrícolas. En Argentina, se estima que las pérdidas originadas por enfermedades alcanzan valores superiores a las 900.000 Tn/año, causando un perjuicio económico de más de 250 millones de dólares (Wrather *et al.*, 1997).

Hoy, las pérdidas directas por enfermedades se estiman entre 1,9 y 2,4 millones de toneladas anuales, que significan aproximadamente \$1.007 a 1.300 millones anuales (Vallone, 2002). Enfermedades endémicas como las “podredumbres” por *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora sojae* incrementaron su severidad. Enfermedades emergentes como el “cancro del tallo” (*Diaporthe phaseolorum* var. *Meridionalis*), el “síndrome de la muerte repentina” (*Fusarium solani* f.sp. *glycines*) y la “podredumbre marrón” (*Phialophora gregata*) se intensificaron. Las enfermedades de fin de ciclo y las que afectan la calidad de la semilla, principalmente mancha marrón (*Septoria glycines*), tizón del tallo y vaina (*Phomopsis* spp.), mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*), mancha ojo de rana (*C. sojina*), antracnosis (*Colletotrichum* spp.) y *Alternaria* spp. se observaron con frecuencia. Las epifitias registradas en los últimos años en la Argentina indican claramente la importancia de las enfermedades para el cultivo de soja (Escande, 2002).

A esto se suma la aparición en la campaña 1997/98 del “oidio” (*Microsphaera diffusa*) sobre todo en la zona norte del país. Algunos integrantes del complejo *Diaporthe/Phomopsis* presentaron una manifestación epifítica, produciendo pérdidas puntuales de hasta un 100% en la campaña 1998/99 en el sur de la provincia de Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos (Vallone, 2002).

El tizón de la vaina y del tallo, causado por *Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell.) Sacc. f. sp. *sojae*, anamorfo *Phomopsis sojae* Lehman, es una de las enfermedades fúngicas que está adquiriendo importancia creciente en nuestra zona productora, siendo considerada endémica en casi todas las áreas productoras de soja del mundo. El daño producido se manifiesta en disminución del rendimiento y deterioro de la calidad de la semilla y el grano (Abney y Ploper, 1988; Sinclair y Backman, 1989).

La podredumbre de la semilla es el primer síntoma de la enfermedad que puede observarse a campo. Así mismo puede ocurrir “damping off” de pre y postemergencia, causado por el inóculo presente en el rastrojo y semillas (Vallone *et al.*, 1997). El patógeno puede afectar también a las semillas, produciendo enmohosado, rajaduras y una coloración blanquecina, sobre todo si se presentan condiciones de alta humedad en el período entre madurez y cosecha (Figura 2).

La sintomatología del tizón de la vaina y del tallo presenta picnidios distribuidos, en hileras sobre los tallos y dispersos en las vainas (Figura 2). Estos síntomas no se expresan en plantas verdes. Los mismos se observan durante la senescencia de las plantas, en tallos y pecíolos luego de que las hojas se caen y los tallos y vainas se tornan marrones (Kmetz *et al.*, 1978). La repentina aparición de los picnidios de *P. sojae* en los tallos de soja, a la madurez del cultivo, indica una infección sistémica. Según Kmetz *et al* (1974) y Kmetz *et al* (1979) este patógeno causa infecciones latentes y locales en los tejidos inmaduros de soja con la producción de estructuras de fructificación a la madurez y senescencia del cultivo. Kilpatrick (1957), sugirió que el patógeno se convierte en sistémico luego de su establecimiento en plantas de soja. Gerdemann (1954), cree que *P. sojae* permanece semidormante a través de la estación de crecimiento y se convierte en sistémico cuando la planta madura.

Considerando lo expresado anteriormente se asume como hipótesis lo siguiente:

“Infecciones endofíticas por *Phomopsis sojae* en etapas fenológicas previas a la senescencia del cultivo pueden ser determinadas y cuantificadas *in vitro*”.



**Figuras 2: picnidios en tallo, vainas y semilla**

## Materiales y Métodos

### Metodología 1

Se sembraron semillas del cultivar Don Mario 4800 procedente de un lote afectado por *Phomopsis sojae* en la campaña 2001/02. El porcentaje de infección de las semillas se determinó en laboratorio por síntomas y por aislamiento en agar papa dextrosa (APD) al 2% pH 5,5.

La siembra se realizó en el campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Fig. 3) y el muestreo se efectuó en cada uno de los siguientes estadios fenológicos: a) cotiledonar, b) V2 (segundo nudo), c) V5 (quinto nudo), d) R2 (plena floración), e) R5 (llenado de granos) y f) R7 (comienzo de madurez fisiológica)

En cada uno de estos estadios se establecieron cinco estaciones de muestreos al azar en distintos surcos del ensayo, estando formadas cada una de ellas por 10 plantas seguidas, lo que hace un total de 50 plantas en cada oportunidad de muestreo.

Las plantas muestreadas se lavaron con agua corriente. De cada planta se obtuvo una porción de 5mm de largo, correspondiente al hipocótilo y epicótilo del primer nudo y la porción superior e inferior de los restantes nudos. Estas porciones se embebieron por un minuto en hipoclorito de sodio al 0,5% para su desinfección superficial, luego se realizó un enjuague con agua destilada estéril y se colocaron sobre papel de filtro estéril para la absorción del excedente de agua.

En cámara de flujo laminar se tomaron los pequeños trozos y se colocaron en cajas de Petri conteniendo APD con estreptomina.

El medio se ajustó a un pH de 5.5 utilizando ácido sulfúrico. Una vez autoclavado durante 20 minutos y antes de distribuirlo en las cajas de petri, se agregaron 200 ppm de estreptomina por litro de medio.

Posteriormente se incubaron por siete días a una temperatura de 25-30°C.

Finalmente se analizaron las colonias presentes identificando la presencia de *P. sojae*.



**Figura 3: Ensayo-Campo experimental UNRC**

### **Metodología 2**

Los ensayos se realizaron en invernáculo. Las semillas que se utilizaron fueron del cultivar Don Mario 4800, provenientes de plantas sembradas en el campo experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto, en la campaña 2002/03, las cuales estaban infectadas con *Phomopsis sojæ*.( Fig. 5).



**Figura 4: Semillas infectadas utilizadas en la siembra**

Estas semillas se sembraron en invernáculo (Universidad Nacional de Río Cuarto), en macetas plásticas de 20 cm de diámetro.

En los estadios fenológicos cotiledonar, V2 (segundo nudo), V5 (quinto nudo) y R2 (plena floración) se realizaron muestreos de 50 plantas cada vez.

Las plantas fueron procesadas de la misma manera que lo explicado en la metodología 1.

La diferencia con la metodología anterior radicó en que para acidificar el medio de cultivo se utilizó ácido láctico.

## Resultados Metodología 1

### Año 2002 Muestras provenientes del campo de experimentación UNRC

**Estadio:** Hoja unifoliada completamente desarrollada (en este caso la muestra se tomo del epicótilo)

**Resultados:** No se logró aislar ninguna colonia de *Phomopsis spp.* (0%)

**Estadio:** 2º nudo con hojas completamente desarrolladas (V2)

**Resultados:** No se logró aislar ninguna colonia de *Phomopsis spp.* ( 0%)

**Estadio:** V5 (Las muestras fueron tomadas del nudo del 1º par de hojas).(10%)

**Resultados:**

Bloque	Presencia de <i>Phomopsis</i>
1	1 planta
3	1 planta
4	2 plantas
5	1planta

Aquí no se distinguía si la muestra correspondía a hipocótilo o epicótilo.

## Resultados Metodología 2

**Año 2003 (Marzo-Abril). Las muestras se obtuvieron en invernáculos (Córdoba y Río IV). En cada estadio se analizaron 50 plantas.**

**Estadio:** Cotiledonar

**Resultados:** solo una planta (aislamiento a partir de epicótilo)(1%)

**Estadio:** 2º nudo con hojas completamente desarrolladas (V2)

**Resultados:** No se logró aislar ninguna colonia de *Phomopsis spp.*(0%)

**Estadio:** V4

**Resultados:**

<b>Presencia de <i>Phomopsis</i></b>	<b>Ubicación</b>
Planta N° 15	2º nudo epicótilo
Planta N° 18	Nudo cotiledonar – hipocótilo
Planta N° 19	Nudo cotiledonar – hipocótilo

Total:(6%)

**Año 2003 (Octubre- Noviembre). Las muestras se obtuvieron en invernáculos (Córdoba y Río IV).**

**Estadio:** 2º nudo con hojas completamente desarrolladas (V2)

**Resultados:** No se logró aislar ninguna colonia de *Phomopsis spp.*(0%)

**Estadio:** V4

**Resultados:** solo una planta (aislamiento a partir del nudo cotiledonar - epicótilo)(1%)

**Estadio:**V6

<b>Presencia de <i>Phomopsis</i></b>	<b>Ubicación</b>
Planta N° 19	Nudo cotiledonar- epicótilo
Planta N° 44	Nudo cotiledonar – hipocótilo
Planta N° 46	Nudo cotiledonar – epicótilo
Planta N° 35	Nudo cotiledonar- epicótilo
Planta N° 27	Nudo cotiledonar – hipocótilo
Planta N° 37	Nudo cotiledonar – hipocótilo

Total:(12%)

## **Discusión:**

Algunos investigadores sugieren que *Phomopsis sojae* luego de establecerse en las plantas de soja se convierte en sistémico (Kilpatrick, 1957) o permanece semidormante a través de la estación de crecimiento y se convierte en sistémico cuando las plantas maduran. El argumento de la actividad sistémica de *P. sojae* se basa en la observación de los picnidios, que aparecen repentinamente en tallos y pecíolos cuando la planta madura.

Otros autores como Kmetz *et al* (1979), indican que *P. sojae* produce infecciones locales. Estos investigadores realizaron un trabajo donde la ocurrencia de infecciones locales fue demostrada en estudios de inoculación donde el patógeno fue reaislado de los sitios de inoculación y no de sitios más distantes a esos puntos; tampoco produjo síntomas de la enfermedad en los puntos de inoculación. Este resultado evidencia que *P. sojae* no tiene movimiento en plantas inmaduras. También Hill y Horn (1981), indican que *P. sojae* produce infecciones locales. La aparición repentina de picnidios cuando la planta de soja madura, en condiciones de campo, puede resultar probablemente de múltiples infecciones locales. Se realizaron ensayos de inoculación, en distintos estadios fenológicos. Luego se observaron al microscopio electrónico los tallos inoculados. No se observó la presencia del patógeno hasta los estadios R6 y R7, cuando las hifas comenzaron a aparecer y a colonizar los tallos, lo que indica que el patógeno permanece semidormante y cercano al punto de infección hasta que la planta alcanza la madurez.

Según los resultados obtenidos en este trabajo se confirma la información obtenida por Kmetz *et al* (1979) y Hill y Horn (1981), quienes indican que *P. sojae* produce infecciones locales. Los resultados obtenidos indican claramente dicha afirmación, ya que los porcentajes en que se aisló *P. sojae* no superaron en ninguno de los casos el 15%. Este bajo valor de aislamientos se explica sabiendo que el patógeno produce infecciones locales, porque al obtener porciones del tallo al azar para realizar los aislamientos, es baja la probabilidad de encontrar una porción infectada por *P. Sojae*. Porque como se mencionó anteriormente, el patógeno infecta en un punto determinado permaneciendo semidormante y no se mueve dentro de la planta hasta la madurez de la misma.

Luego de este análisis, se concluye que la hipótesis planteada no es verdadera. La determinación *in vitro* de infecciones de *P. sojae*, en etapas fenológicas previas a la



sensencia, no es una técnica que pueda ser utilizada, ya que el patógeno no tiene movimiento dentro de la planta, hasta su madurez, por lo tanto depende del azar la elección de porciones de tallos donde haya infecciones locales de *P. sojae*.

### **Bibliografía Citada**

ABNEY, T. S and L. B. PLOPER. 1988. Seed diseases. Pag. 3-6 in: Soybean diseases of the North Central Region. T. D. Wyllie and D. H. Scott, eds. APS Prress. The American Phytopathological Society. St. Paul. M. N. EE. UU. 149 pp.

BAIGORRI, H. y L. SEGURA (Editores). 2002. Información para Extensión N°:74. EEA INTA Marcos Juárez.

BOLSA DE CEREALES. 1996. Revista bolsa de cereales. Anuarios estadísticos 1995/1996. Bs. As.

CUNIBERTI, M., R. HERRERO, S. DE VALLONE y H. BAIGORRI. 2002. Pag F12-25 en: Soja Aspectos generales de la campaña 2001/2002 en la región central del país. Soja actualización 2002. EEA INTA Marcos Juárez.

ELLIS, M. A., M. B. ILLYAS, F. D. TENNE, J. B. SINCLAIR, and H. L. PALM. 1974. Effect of foliar applications of benomyl on internally seedborne fungi and pod and stem blight in soybean. Plant Dis. Repr. 58: 760-7630.

PRASARTSEE, C., F. D. TENNE, M. B. ILYAS, M. A. ELLIS, and J.B. SINCLAIR. 1975. Reduction of internally seedboorne *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* by fungicides sprays. Plant Dis. Repr. 59:20-23.

RODRÍGUEZ, J. M. 1997. Perspectivas de los aceites y harinas proteicas. Pag. 17-21 en: Expo-Soja 97. EEA Marcos Juárez. Córdoba.

ROSS, J.P. 1975. Effect of overhead irrigation and benomyl sprays of late-season foliar diseases, seed infection, and yields of soybean. Plant Dis. Repr. 59:809-813.

SAGPyA. 2002. [http://: www.sagpya.mecon.gov.ar](http://www.sagpya.mecon.gov.ar)

SINCLAIR, J. B. and P. A. BACKMAN. 1989. Compendium of soybean diseases. 3<sup>rd</sup> ed. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul. MN. EE. UU. 106 pp.

TEKRONY, D. M., D. B. EGLI, J. BALLE, L. TOMES and R.E. STUCKEY. 1984. Effects of date of harvest maturity on soybean seed quality and *Phomopsis* sp seed infection. Crop Sci. 24: 189-193y

VALLONE, S. y L. GIORDA 1997 Enfermedades de la soja en la Argentina. Agro 1 de Córdoba. EEA INTA Marco Juárez.