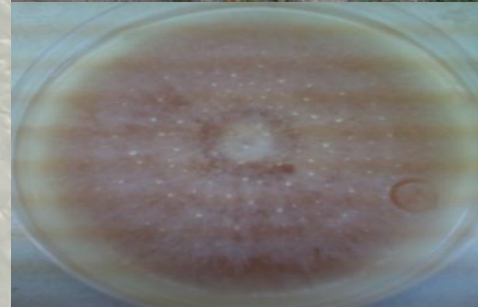
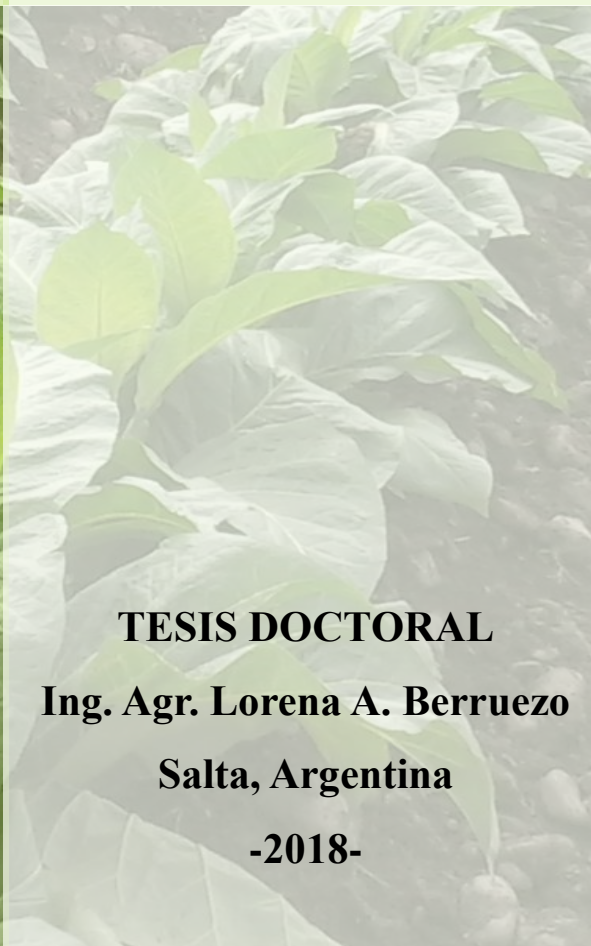




UNIVERSIDAD NACIONAL DE SALTA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

“Caracterización morfológica, biológica y molecular de los complejos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* asociados al cultivo de *Nicotiana tabacum* L. en el Noroeste Argentino”



TESIS DOCTORAL

Ing. Agr. Lorena A. Berruezo

Salta, Argentina

-2018-



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SALTA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

“Caracterización morfológica, biológica y molecular
de los complejos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium
solani* asociados al cultivo de *Nicotiana tabacum* L.
en el Noroeste Argentino”

TESIS DOCTORAL

Ing. Agr. Lorena A. Berruezo

Salta, Argentina

-2018-

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad
Nacional de Salta

Directora: Dra. Marta Zulema Galván
Co-Directora: Dra. Guadalupe Mercado Cárdenas

Lugar de trabajo:
Estación Experimental Agropecuaria Salta
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

DEDICATORIA

A los pilares de mi vida Santi, Juana y Pablo.

Y especialmente, a mi madre, que siempre me dió palabras de aliento para emprender o continuar mis sueños y proyectos. “Las almas que se aman no tienen olvido no tienen adiós”.

AGRADECIMIENTOS

A Guada y Marta por ser incentivo y orientación constante. A Guada por transmitir su amor por la fitopatología y ser guía en mis primeros paso en este camino. A Marta por su apoyo en el área molecular.

A Sebastian Stenglein por guiarme académicamente y por su incondicional predisposición para ayudarme.

A todo el equipo de Sanidad Vegetal por su buena predisposición y ayuda.

A Eleo y Noe por su amistad y compañía en ésta etapa.

A mis familiares, por la comprensión, el amor, la dedicación y el cariño, en todos los momentos de mi vida.

A mis padres, que me enseñaron a amar al prójimo, a valorar la vida y a nunca bajar los brazos.

Y a las grandes amistades conquistadas en estos 5 años.

A INTA Estación Experimental Salta por haberme permitido tener lugar de trabajo y a CONICET por la posibilidad económica de realizar este postgrado.

INDICE GENERAL

ABREVIATURA Y SIGLAS.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
CAPÍTULO I. Introducción general, hipótesis de trabajo y objetivos	1
INTRODUCCIÓN	1
Origen y distribución geográfica de <i>Nicotiana tabacum</i>	1
Importancia económica mundial, nacional y regional.....	2
Ecología del cultivo.....	3
Producción de tabaco	4
Importancia de las enfermedades en tabaco	5
Interacción hospedante-patógeno-ambiente	6
Enfermedades causadas por <i>Fusarium</i> spp.	7
Sintomatología	8
- Marchitamiento vascular por <i>Fusarium oxysporum</i>	8
- Podredumbre radicular por <i>Fusarium solani</i>	9
Taxonomía de <i>Fusarium</i>	10
- Concepto de especies y poblaciones en <i>Fusarium</i>	11
Taxonomía de los complejos <i>F. o.</i> y <i>F. s.</i>	12
Rango de hospedante y forma especial del complejo <i>F.o</i> y <i>F.s</i>	12
Biología y ecología	13
Manejo de la enfermedad	15
- Manejo genético	15
- Manejo cultural	16
- Manejo biológico.....	17
- Manejo químico.....	18
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	19
OBJETIVOS	19
Objetivos específicos:	19
CAPÍTULO II. Dinámica de la intensidad del marchitamiento vascular y de la podredumbre radicular causadas por <i>Fusarium</i> spp. en el cultivo de tabaco en el NOA.....	21

INTRODUCCIÓN	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Área y diseño de muestreo	25
Variables analizadas	27
Análisis estadístico	27
RESULTADOS	28
Descripción de síntomas del complejos <i>F. o.</i> y <i>F.s.</i>	28
Estadística descriptiva de los datos	31
Dinámica de la incidencia y severidad de <i>Fusarium</i> spp. en base al estadio fenológico del cultivo en la provincia de Salta.	31
Dinámica de la incidencia y severidad de <i>Fusarium</i> spp. en base al estadio fenológico del cultivo en la provincia de Jujuy	35
Prevalencia del marchitamiento vascular y podredumbre radicular por provincias y por departamento.	38
Prevalencia por provincia según el complejo por campaña agrícola.....	39
Asociación entre intensidad del marchitamiento vascular y podredumbre radicular por los complejos <i>F.o.</i> y <i>F.s.</i> y las variables agronómicas.....	40
Análisis de asociación de la enfermedad con el tipo de almácigo	40
Asociación entre la enfermedad con las variedades empleadas	42
Asociación de la incidencia con la rotación de cultivo	45
Análisis estadísticos entre intensidad de enfermedad y variables meteorológicas (temperatura media, precipitación, humedad relativa).	46
Provincia de Salta.....	46
Provincia de Jujuy	48
Asociación entre la presencia del marchitamiento vascular y podredumbre radicular con el tipo de suelo.....	50
Provincia de Salta.....	50
Provincia de Jujuy	50
DISCUSIÓN	52
CAPÍTULO III. Identificación y análisis de la diversidad genética de los aislamientos de los complejos <i>F. o.</i> y <i>F. s.</i> empleando caracteres morfológicos, moleculares y patogénicos.	57
INTRODUCCIÓN	59
Determinación de especies morfológicas	60
Determinación de especies biológicas.....	60
Determinación de especies filogenéticas.....	61

MATERIALES Y MÉTODOS	63
Área de estudio y obtención de aislamientos	63
Determinación de patogenicidad de los aislamientos.....	64
Caracterización morfológica de los aislamientos	66
Extracción del ADN por CTAB	67
Reacciones de amplificación mediante PCR.....	67
Análisis de los datos.....	69
RESULTADOS.....	70
Determinación de la patogenicidad de los aislamientos.....	70
Caracterización morfológica	77
Análisis molecular.....	80
Determinación del tipo de apareamiento.....	83
DISCUSIÓN	84
CAPÍTULO IV. Evaluación de la tolerancia al marchitamiento vascular y a podredumbre radicular ocasionados por <i>Fusarium</i> spp. en variedades comerciales de tabaco tipo Virginia.	89
INTRODUCCIÓN	91
Modelo Logístico:	92
Modelo Gompertz:	93
Modelo Monomolecular:.....	93
Modelo Weibull	93
Selección del modelo	94
Comparación de epidemias	94
Resistencia de las variedades comerciales	94
MATERIALES Y MÉTODOS	96
Aislamientos de <i>F. o.</i> y <i>F. s.</i> y preparación de inóculo.	96
Sustrato e inoculación	96
Variedades comerciales evaluadas	97
Análisis estadístico.....	97
RESULTADOS.....	98
Análisis del Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE).....	98
Comportamiento varietal.....	103
Influencia de nivel de inóculo	104
Agresividad de los aislamientos.....	105

Peso seco	106
Largo de raíces	106
Índice de severidad de la enfermedad (IS)	107
Ajuste del modelo	108
DISCUSIÓN	110
CAPÍTULO V. CONSIDERACIONES FINALES	113
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXO	135

INDICE DE TABLAS

Capítulo II. Dinámica de la intensidad del marchitamiento vascular y de la podredumbre radicular causadas por *Fusarium* spp. en el cultivo de tabaco en el NOA.

Tabla 2.1. Estadísticos descriptivos para las variables de incidencia y severidad evaluados en los tres estadios de cultivo en las provincias de Salta, campaña 2013-14.....	31
Tabla 2.2. Estadísticos descriptivos para las variables de incidencia y severidad evaluados en los tres estadios de cultivo en la provincia de Salta, campaña 2014-15.....	33
Tabla 2.3. Estadísticos descriptivos para las variables de incidencia y severidad evaluados en los tres estadios de cultivo en la provincia de Jujuy, campaña 2013-14.....	35
Tabla 2.4. Estadísticos descriptivos para las variables de incidencia y severidad evaluados en los tres estadios de cultivo en la provincia de Jujuy, campaña 2014-15.....	37
Tabla 2.5. Prevalencia de la cantidad de plantas bajo condición de marchitamiento vascular o podredumbre radicular según la campaña agrícola y provincia.....	39
Tabla 2.6. Correlación entre variables meteorológicas y la intensidad del marchitamiento y la podredumbre radicular producida por <i>Fusarium</i> spp. según el estadio fenológico para el departamento Cerrillos.....	47
Tabla 2.7. Correlación entre variables meteorológicas y la intensidad del marchitamiento y la podredumbre radicular producida por <i>Fusarium</i> spp. según el estadio fenológico para el departamento Rosario de Lerma.	48
Tabla 2.8. Correlación entre variables meteorológicas y la intensidad del marchitamiento y la podredumbre radicular producida por <i>Fusarium</i> spp. según el estadio fenológico para el departamento El Carmen.	49
Tabla 2.9. Correlación entre variables meteorológicas y la intensidad del marchitamiento y la podredumbre radicular producida por <i>Fusarium</i> spp. según el estadio fenológico para el departamento Palpalá.	50

Capítulo III. Identificación y análisis de la diversidad genética de los aislamientos de los complejos *F. o.* y *F. s.* empleando caracteres morfológicos, moleculares y patogénicos.

Tabla 3.1. Cebadores utilizados en la amplificación del EF-1 α y genes MAT.....	69
Tabla 3.2. Número y porcentaje de aislamientos de especies de <i>Fusarium</i> obtenidos de plantas que manifestaron síntomas de marchitamiento y podredumbre radicular.....	70
Tabla 3.3. Datos de los 88 aislamientos de los complejos <i>F. o.</i> y <i>F. s.</i> analizados en el presente trabajo, indicando código, origen, año de colección, síntomas, fuente, crecimiento micelial, índice de severidad y categoría de patogenicidad.....	74

Tabla 3.4. Código de los aislamientos, origen geográfico, media de crecimiento micelial, color de colonias, forma y tamaño de macroconidios, forma de macroconidios, color de esporodooquios, de los complejo *F. o.* y *F.s.* obtenidos de Salta y Jujuy.....79

Tabla 3.5. Tipo de apareamiento para 31 aislamientos del complejo *F. o.* a partir del análisis del loci MAT.....83

Capítulo IV: Evaluación de la tolerancia al marchitamiento vascular y podredumbre radicular ocasionado por *Fusarium* spp. en variedades comerciales de tabaco tipo Virginia.

Tabla 4.1. Identificación de los aislamientos evaluados96

Tabla 4.2. Media del ABCPE registrada a los 30 días posteriores a la inoculación.....102

Tabla 4.3. Índice de severidad para las variedades y aislamientos evaluados.....108

Tabla 4.4. Parámetros estadísticos aplicados para la selección del modelo y describir a los complejos *F. o.* y *F. s.*.....108

INDICE DE FIGURAS

Capítulo I: Introducción general y objetivos. El cultivo de tabaco.

Figura 1.1. Planta de tabaco de crecimiento silvestre.....	1
Figura 1.2. Principales países productores de tabaco. (Fuente: FAO 2015).....	2
Figura 1.3. a) Provincias tabacaleras. b) Zonas productoras de Salta y Jujuy.....	3
Figura 1.4. Cultivo de tabaco de 50 días.....	4
Figura 1.5. Tipos de almácigos de tabaco. a) Flotante. b) Convencional.....	5
Figura 1.6. Triángulo de la enfermedad.....	6
Figura 1.7. Síntomas producidos por <i>F. o</i>	9
Figura 1.8. Síntomas producidos por <i>F. s</i>	10
Figura 1.9. Ciclo de las enfermedades producidas por los complejos <i>F. o.</i> y <i>F. s.</i>	15

Capítulo II. Dinámica de la intensidad del marchitamiento vascular y de la podredumbre radicular causadas por *Fusarium* spp. en el cultivo de tabaco en el NOA.

Figura 2.1: Esquema de la relación entre las poblaciones del patógeno y hospedante a través de atributos estructurales y funcionales.	24
Figura 2.2. Puntos de relevamiento y muestreo en la provincia de Salta y Jujuy.....	26
Figura 2.3. a) Planta de tabaco en estadio I manifestando disminución en crecimiento producido por <i>F. o.</i>	29
Figura 2.4. a y b) Plantas de tabaco en estadio I manifestándose síntomas de podredumbre radicular.	30
Figura 2.5. Histogramas de frecuencia absoluta según el Estadio fenológico (I, II y III) del cultivo para las variables incidencia y severidad, para la provincia de Salta, campaña 2013-14. DDT: días después del trasplante.....	32

Figura 2.6. Histogramas de frecuencia absoluta según el Estadio fenológico (I, II y III) del cultivo para las variables incidencia y severidad, para la provincia de Salta, campaña 2014-15.	34
Figura 2.7. Histogramas de frecuencia absoluta según el Estadio fenológico (I, II y III) del cultivo para las variables incidencia y severidad, para la provincia de Jujuy, campaña 2013-14.....	36
Figura 2.8. Histogramas de frecuencia absoluta según el Estadio fenológico (I, II y III) del cultivo para las variables incidencia y severidad, para la provincia de Jujuy, campaña 2014-15.....	37
Figura 2.9. Porcentaje de prevalencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular por departamento para la provincia de Salta según la campaña.....	38
Figura 2.10. Porcentaje de prevalencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular por departamento para la provincia de Jujuy para ambas campañas.....	39
Figura 2.11. Presencia del marchitamiento vascular y podredumbre radicular por <i>Fusarium</i> spp. según el tipo de almácigo en la campaña 2013-14 para la provincia de Salta.....	41
Figura 2.12. Presencia del marchitamiento vascular y podredumbre radicular por <i>Fusarium</i> spp. según el tipo de almácigo para la provincia de Jujuy.....	42
Figura 2.13. Proporciones acumuladas de lotes con presencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular ocasionada por miembros del complejo <i>F. o.</i> y <i>F. s.</i> según las variedades implantadas para la provincia de Salta.	43
Figura 2.14. Proporciones acumuladas de lotes con presencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular ocasionada por miembros del complejo <i>F. o.</i> y <i>F. s.</i> según las variedades implantadas para la provincia de Jujuy.....	44
Figura 2.15. Frecuencia de lotes con y sin rotación en relación a la presencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular producida por <i>Fusarium</i> spp. para la provincia de Salta.....	45
Figura 2.16. Frecuencia de lotes con y sin rotación en relación a la presencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular producida por <i>Fusarium</i> spp. para la provincia de Jujuy.....	46

Figura 2.17. Ubicación de los puntos relevados en cada tipo de asociación de suelo para la provincia de Salta y Jujuy.....51

Capítulo III. Identificación y análisis de la diversidad genética de los aislamientos de los complejos *F. o.* y *F. s.* empleando caracteres morfológicos, moleculares y patogénicos.

Figura 3.1. a) Técnica de desinfección superficial64

Figura 3.2. a) Plantines en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas.64

Figura 3.3. Esquema de la secuencia parcial del gen del factor de elongación (EF-1 α) en *Fusarium*.
.....68

Figura 3.4. Plantas de tabaco en las diferentes escalas de IS para el complejo *F. o.*
.....71

Figura 3.5. Plantas de tabaco en las diferentes escalas de IS para el complejo *F. s.*
.....71

Figura 3.6. Ejemplo del crecimiento observado luego del re-aislamiento de los patógenos, con posterioridad a la prueba de patogenicidad.71

Figura 3.7. a) Gradiente de patogenicidad de 53 aislamientos de *F. o.* en diferentes localidades en las provincias de Salta y Jujuy.72

Figura 3.8. a) Gradiente en la patogenicidad de 74 aislamientos de *F. s.* de diferentes localidades en las provincias de Salta y Jujuy.73

Figura 3.9. Diferenciación de los aislamientos del complejo *F. o.* en el análisis de coordenadas principales y superposición de árbol de recorrido mínimo.77

Figura 3.10. Diferenciación de los aislamientos del complejo *F. s.* en el análisis de coordenadas principales y superposición de árbol de recorrido mínimo.78

Figura 3.11. Árbol filogenético basado en 36 secuencias de EF-1 α de los aislamiento patogénicos del complejo *F. o.* y 14 secuencias de control obtenidas del GenBank.81

Figura 3.12. Árbol filogenético basado en 34 secuencias de EF-1 α obtenidas de aislamientos del complejo *F. s.* y 30 secuencias de control obtenidas del GenBank.....82

Capítulo IV: Evaluación de la tolerancia al marchitamiento vascular y podredumbre radicular ocasionado por *Fusarium* spp. en variedades comerciales de tabaco tipo Virginia.

Figura 4.1. Curva de progreso de una enfermedad y parámetros epidemiológicos que la caracterizan	92
Figura 4.2. Ensayo de inoculación con aislamientos de <i>F. o.</i>	99
Figura 4.3. Síntomas observados en el ensayo de inoculación con aislamientos de <i>F. o.</i>	100
Figura 4.4. a) Raíz de planta sana b) sistema radicular de planta inoculada con <i>F.s.</i>	101
Figura 4.5. Media del ABCPE de las variedades evaluadas	103
Figura 4.6. Media del ABCPE de los aislamientos considerados	104
Figura 4.7. Media del ABCPE para los dos niveles de inóculo evaluados.....	105
Figura 4.8. Interacción entre aislamientos y variedades de tabaco evaluadas.....	106
Figura 4.9. Media del largo radicular para a) variedades, b) aislamientos y c) concentración.....	107
Figura 4.10. Progreso de la enfermedad ajustado por el modelo correspondiente según los aislamientos del complejo <i>F.o.</i> , particionado por la concentración de inóculo.	109
Figura 4.11. Progreso de la enfermedad ajustado por el modelo correspondiente según los aislamientos del complejo <i>F.s.</i>	109

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABCPE	Área bajo la curva de progreso de la enfermedad
ANOVA	Análisis de la varianza
APG	Agar papa glucosado
CME	Cuadrado medio del error
CTAB	Cetil-trimetil-bromuro de amonio
CV	Coefficiente de variación
DCA	Diseño experimental completamente aleatorizado
DDT	Días después del trasplante
dNTP	Desoxiribonucleótido trifosfato
EF-1 α	Factor de elongación 1-alpha
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
IS	Índice de Severidad
mtSSU	Sub-unidad menor de ribosomas mitocondriales
MI	Morfotipo I
MII	Morfotipo II
MIII	Morfotipo III
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NEA	Noreste de la Argentina
NOA	Noroeste de la Argentina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TUB	β -tubulina

RESUMEN

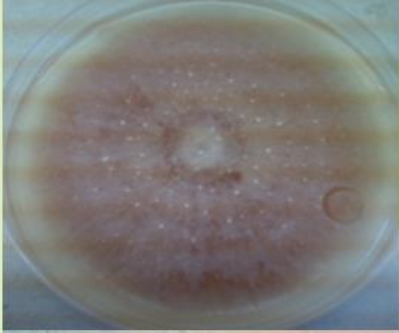
El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es uno de los cultivos regionales más importantes de la Argentina, el cual contribuye al crecimiento socio-económico de las provincias del noroeste argentino (NOA). Las pérdidas económicas ocasionadas por enfermedades radiculares constituyen uno de los principales problemas del cultivo. Entre los principales fitopatógenos se encuentran *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp y *Ralstonia solanacearum*. La importancia de estas especies se ha puesto de manifiesto debido al incremento en la prevalencia e incidencia en diversos lotes tabacaleros. Los complejos de especies *F. oxysporum* y *F. solani* provocan graves daños en el cultivo del tabaco y no es posible detectar su presencia en el estado inicial, ya que los síntomas aparecen alrededor de un mes de la infección, si se presentan las condiciones predisponentes. Este trabajo tuvo como objetivo general conocer la diversidad de especies de *Fusarium* asociadas al marchitamiento vascular y podredumbre radicular en tabaco en la región del NOA, para aportar conocimiento a los programas de mejoramiento. Se relevaron 73 lotes comerciales de tabaco Tipo Virginia en las provincias de Salta y Jujuy para medir prevalencia e incidencia del marchitamiento vascular y podredumbre radicular producido por *Fusarium* spp. durante dos campañas consecutivas (2013-14; 2014-15), lo que permitió describir los síntomas de ambas patologías y obtener aislamientos de plantas sintomáticas. En ambas provincias se manifestó una mayor prevalencia de miembros patogénicos del complejo *F. o.* en relación a *F. s.* Se encontró que la intensidad de ambas patologías fue mayor en el segundo y tercer estadio fenológico del cultivo. A su vez, se encontraron asociaciones significativas entre la intensidad del marchitamiento vascular y podredumbre radicular con variables de manejo agronómico, variables meteorológicas (temperatura media ambiente, precipitación y humedad relativa ambiente) y tipo de asociación de suelo. Se pudo expresar la dinámica del marchitamiento vascular y podredumbre radicular en el transcurso del tiempo y describirlas a nivel regional. Los resultados indicaron un aumento de estas patologías en las últimas campañas reflejando la necesidad de la implementación de herramientas de manejo más adecuadas con el fin de minimizar la presencia de estas enfermedades. En complemento, se analizó la diversidad genética, morfológica y patogénica de aislamientos pertenecientes a los complejos de *F. o.* y *F. s.* asociados al marchitamiento vascular y podredumbre radicular. Se obtuvieron 130

aislamientos de plantas de tabaco sintomáticas. Los aislamientos se caracterizaron en base a características morfológicas, moleculares (secuencia EF-1 α) y pruebas de patogenicidad. Todos los aislamientos fueron identificados como miembros del complejo *F. o.* y *F. s.*, exhibiendo una considerable variación intra-grupo. Sobre la base de caracteres morfológicos se diferenciaron tres morfotipos en cada complejo. El árbol filogenético generado con las secuencias EF-1 α confirmó la identificación de los aislamientos. Los miembros de ambos complejos exhibieron una variabilidad apreciable en las características morfológicas y en virulencia, y una parte de ellos no resultaron patógenicos para el tabaco. El 81% y el 60% de los aislamientos del complejo *F. o.* y *F. s.* fueron patógenicos, respectivamente. Bajo condiciones controladas, las variedades evaluadas exhibieron un comportamiento diferencial frente a los aislamientos y densidad de inóculo. Los aislamientos de *F. o.* mantuvieron el mismo nivel de agresividad para las dos diluciones evaluadas. Este estudio, es el primero en proporcionar información sobre la variabilidad de los complejos *F. o.* y *F. s.* asociados con el marchitamiento y podredumbre radicular del tabaco en la Argentina. Este trabajo contribuye al desarrollo de estrategias de manejo sostenible en la producción de tabaco en la región.

ABSTRACT

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is one of the most important regional crops in Argentina, and contributes to the socioeconomic growth of the provinces in the northwest region of the country (NOA). The economic losses caused by root diseases are one of the main constraints for tobacco production. *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp and *Ralstonia solanacearum* are among the main pathogens affecting tobacco. The importance of these species has been evidenced due to the increase in the prevalence and incidence in various tobacco fields. The *Fusarium oxysporum* and *F. solani* complexes cause serious damage to tobacco and it is not possible to detect their presence in the initial state of the crop, since the symptoms appear about one month after the infection under predisposing conditions. The aim of this work was to study the diversity of *Fusarium* spp. associated with vascular wilt and root rot in tobacco in the NOA region, to contribute knowledge to the breeding programs. During two consecutive campaigns (2013-14, 2014-15), 73 commercial fields of Virginia Type tobacco were surveyed in the provinces of Salta and Jujuy to measure prevalence and incidence of vascular wilt and root rot produced by *Fusarium* spp.. This allowed to describe the symptoms of both pathologies and to obtain isolates of symptomatic plants. The intensity of both pathologies was greater in the second and third phenological stage of the crop. In both provinces, there was a higher prevalence of pathogenic members of the *F. o.* complex in relation to *F. s.* Moreover, significant associations between the intensity of vascular wilt and root rot with variables of agronomic management, meteorological variables (mean temperature, precipitation and relative humidity) and type of soil association, were found. It was possible to express the dynamics of vascular wilt and root rot in the course of time and to describe them at a regional level. The results indicated an increase of these pathologies in the last campaigns reflecting the requirement of applying more suitable management tools in order to minimize the presence of these diseases. In addition, the genetic, morphological and pathogenic diversity of the *F. o.* and *F. s.* complexes associated with vascular wilt and root rot were analyzed. One hundred and thirty isolates of symptomatic tobacco plants were obtained. The isolates were characterized on the basis of morphological, molecular (EF-1 α sequence) and pathogenicity tests. All isolates were identified as members of the *F. o.* and *F. s.* complex, exhibiting considerable intra-group variation. On the basis of morphological characters three morphotypes were differentiated in each complex. The phylogenetic tree generated with the EF-1 α sequences confirmed the identification of the isolates. Significant variability in pathogenicity between isolates was observed. Members of both complexes exhibited appreciable variability in morphological characteristics and virulence, and

some of them were not pathogenic for tobacco. Eighty one percent and 60% of the isolates resulted pathogenic in the *F. o.* and *F. s.* complexes, respectively. Under controlled conditions, the evaluated varieties showed a differential behavior against the isolates and density of inoculum analyzed. The isolates of *F. o.* maintained the same level of aggressiveness for the two dilutions tested. This is the first study to provide information on the variability of pathogens associated with root wilt and root rot of tobacco in Argentina. This work contributes to the development of strategies for sustainable management of tobacco production in the region.



CAPÍTULO I

Introducción general, hipótesis de trabajo y objetivos

INTRODUCCIÓN

Origen y distribución geográfica de *Nicotiana tabacum*

Nicotiana tabacum L. es una planta herbácea perenne, de la familia de las solanáceas, de cuyas hojas se produce la mayor parte del tabaco consumido en el mundo (Figura 1.1). Su dotación cromosómica es de 24 pares de cromosomas. Se cree que esta especie es un anfidiplóide, es decir, un híbrido natural, originado entre otras dos especies ancestrales: *Nicotiana tomentosiformis* y *Nicotiana glauca* (Goodspeed 1954; Gerstel, 1960 y 1963). El híbrido entre ambas especies sería estéril y para reproducirse habría sido necesaria la duplicación de sus cromosomas. Esto pudo ocurrir de modo espontáneo en la naturaleza. La hibridación anfidiplóide (alotetraploide), es común en el género y está relacionada a la intervención humana, los tabacos comerciales son híbridos anfidiplóides (Goodspeed, 1954; Knapp *et al.*, 2004).



Figura 1.1. Planta de tabaco de crecimiento silvestre

El centro de origen del tabaco se sitúa en la zona andina entre Perú y Ecuador, donde los primeros cultivos son citados alrededor de cinco mil y tres mil años A.C. Cuando se colonizó América, su consumo ya estaba extendido por todo el continente. Las primeras semillas se llevaron

a Europa en 1559 y fueron sembradas en España, desde allí se extendió su cultivo por el mundo entero.

Importancia económica mundial, nacional y regional

En la actualidad el cultivo de tabaco se produce en más de 125 países con una producción total de 6.2 millones de toneladas sobre una superficie implantada anualmente de aproximadamente 4 millones de hectáreas, de las cuales un tercio pertenece solamente a China (Figura 1.2.). Debido a ello, este país es el principal productor mundial con el 37% del volumen total mundial. Le siguen India (10%), Brasil (9%), EE.UU (6%), Indonesia (2,5%) y Turquía (2,5%). La participación de la Argentina en la producción mundial es del 2% (FAO, 2015). De este total, el 75,9% corresponde a la producción de tabaco tipo Virginia, el 16,4% a Burley y 7,7% al criollo.

La producción total en nuestro país se ubica en más de 150 millones de kilos de tabaco anuales, sobre una superficie de más de 90 mil hectáreas implantadas. El 80 % del tabaco argentino se exporta, pero se encuentra sujeto a una alta tasa de retención (del 10%) no adecuada a las características de un producto pre industrializado. (Cámara del tabaco de Jujuy, 2018).

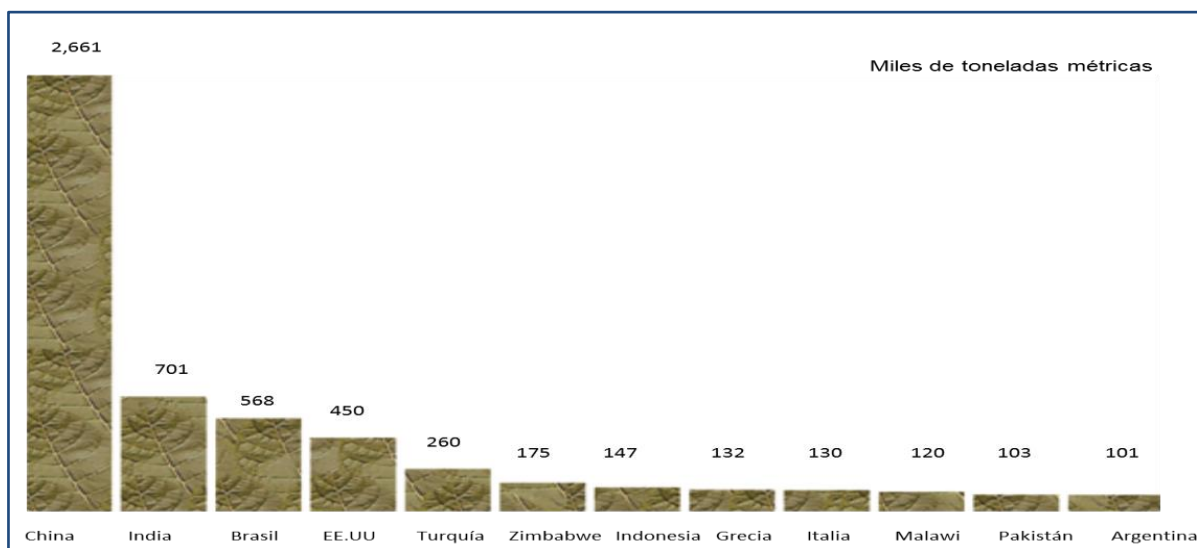


Figura 1.2. Principales países productores de tabaco. (Fuente: FAO 2015)

En la Argentina, este cultivo se desarrolla en las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Chaco, Catamarca, Misiones y Corrientes, donde se realizaron grandes inversiones para mantener esta actividad en la que participan más de 17 mil productores. Tiene una gran relevancia socio-económica en lo referido a la mano de obra que requiere durante todo su ciclo productivo, principalmente en las provincias de Salta, Jujuy y Misiones que concentran el 93% de la

producción del país. Por ser una actividad de mano de obra intensiva, es de gran importancia para la generación de empleo en la mayoría de las provincias productoras y esta relevancia es aún mayor a nivel de localidades o departamentos, donde se aprecia con mayor claridad la importancia económica en la generación de puestos de trabajo. En promedio este cultivo requiere de unos 130 jornales por hectárea. Otros cultivos intensivos requieren un número muy inferior de mano de obra por ejemplo, el algodón demanda 28 jornales/ha; vid 85 jornales/ha y caña de azúcar 65 jornales/ha (Toncovich y Piccolo, 2008; Piccolo, 2004).

Las regiones productoras en la Argentina se ubican en el noroeste -NOA- (Salta, Jujuy, Tucumán y Catamarca), y en el noreste -NEA- (Misiones, Corrientes y Chaco). Las variedades más utilizadas son del tipo Virginia, que representó históricamente el 67% de tabacos rubios cultivados en Salta (33,1%) y Jujuy (33,9%). El tipo Burley con el 31% del volumen que se localiza principalmente en Misiones (26,6%) y en menor medida en Tucumán y Catamarca (6,4%). Las variedades de tabaco criollo se producen en Misiones, Tucumán y Catamarca, como también en Salta se produce la totalidad de Criollo. (Figura 1.3.) (MINIAGRI, 2014).

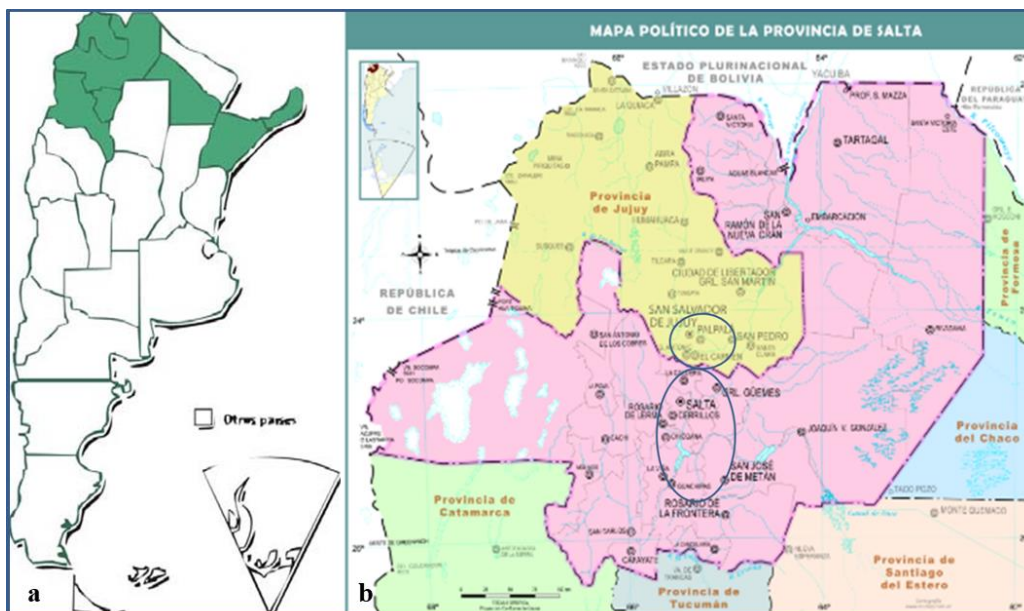


Figura 1.3. a) Provincias tabacaleras y b) zonas productoras de Salta y Jujuy.

Ecología del cultivo

El tabaco es una de las especies más susceptibles a ser influenciada por los factores ambientales donde se desarrolla, tanto en el aspecto cuantitativo como cualitativo (Figura 1.4). La temperatura

óptima para el cultivo varía entre 18 a 30 °C. Los tabacos obtenidos en años secos son más ricos en alcaloides, siendo más aromáticos. En función de la cantidad de radiación que la planta reciba dependerá la textura, el grosor y el contenido de nicotina presente en las hojas. Los requerimientos hídricos no son elevados, aun así los excesos o deficiencias hídricas repercuten en la calidad final de la hoja y en el rendimiento del cultivo. El agua de riego debe tener poco contenido de sales, especialmente de cloro, ya que en altas concentraciones afecta la combustibilidad del tabaco. Los suelos requeridos para lograr un desarrollo óptimo son los de textura franca arenosa, con buena fertilidad y muy buen drenaje interno, con alrededor de 3% de materia orgánica y un pH entre 5.2 y 6.2 (Hawks y Collins, 1986).



Figura 1.4. Cultivo de tabaco de 50 días

Producción de tabaco

El cultivo de tabaco se realiza en forma intensiva, desarrollándose en varias etapas. La primera es la realización de **almácigos** que pueden ser bajo dos sistemas: convencional o de bandeja flotante (Figura 1.5). Cuando se reduce el riesgo de heladas se realiza el **trasplante**, en esta etapa y en las

siguientes es imprescindible el agua de riego (canon o agua subterránea) ya que coincide con el período de menores precipitaciones en la región. La siguiente etapa es de **conducción** (50 y 70 días del trasplante) donde es importante el plan de fertilización, control de malezas y la sanidad del cultivo, ya que de ello depende la calidad del producto final. Durante esta etapa se desarrollan tareas como el aporque, para el control de malezas, desflorado y eliminación de brotes. Las hojas se cosechan a los 90-100 días del trasplante. La última etapa incluye el **curado** de las hojas en estufas, la **clasificación** y el **enfardado** y acondicionamiento hasta su posterior comercialización (Fernández de Ullivarri, 1990).



Figura 1.5. Tipos de almácigos de tabaco. a) Flotante y b) convencional.

Importancia de las enfermedades en tabaco

El sistema de cultivo de almácigo-plantación, presenta durante su ciclo vegetativo diferentes problemas sanitarios causados por hongos, bacterias y virus. En la etapa de almácigo las enfermedades comúnmente registradas son: Mal de los almácigos o *Damping-off* (*Rhizoctonia solani*, *Pythium*), Mancha por *Rhizoctonia* o *Target Spot* y Moho azul (*Peronospora tabacina*). En la etapa de plantación se presentan daños en hoja: Mancha castaña (*Alternaria alternata*), Viruela u ojo de rana (*Cercospora nicotianae*), Mancha rasgada (*Ascochyta nicotianae*), Mancha por *Phyllosticta* (*Phyllosticta nicotiana*), Mosaico del tabaco (*Tobacco Mosaic Virus*, TMV), Polvillo (*Potato Virus Y*, PVY) y Corcovo (*Ground nut Ring Spot Virus*, GRSV). En raíces y tallo las

enfermedades más comunes son: Podredumbre del tallo (*Pythium* spp.), Podredumbre radicular o *Sore Shine* (*Rhizoctonia solani*), Canilla negra o *Black Shank* (*Phytophthora nicotianae*), Marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*) y Marchitamiento bacteriano (*Ralstonia solanacearum*) (Shew y Lucas,1991).

En las últimas campañas el sector tabacalero afrontó una gran caída de la productividad con un incremento de los costos de producción. La incidencia de enfermedades aumentó ocasionando pérdidas anuales del 20% (Giménez Monge *et al.*, 2009). Las condiciones climáticas son un factor predisponente para el desarrollo de las enfermedades mencionadas.

Interacción hospedante-patógeno-ambiente

Los cultivos presentan una enfermedad cuando una o varias de sus funciones son alteradas, lo cual se lleva a cabo mediante una serie de eventos sucesivos que propician el desarrollo y la prevalencia de la enfermedad en el tiempo (Agrios, 2005). Para que se manifieste la enfermedad deben coincidir en un determinado momento (tiempo) un hospedante susceptible, un patógeno virulento y las condiciones ambientales predisponentes. A su vez el hombre actúa como modificador del ambiente a través de sus prácticas agrícolas (Figura 1.6).

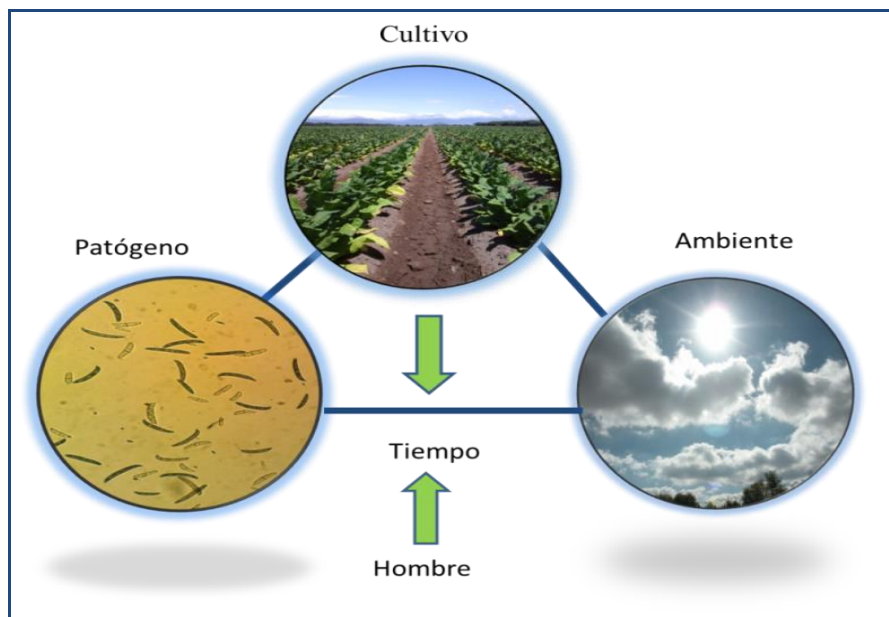


Figura 1.6. Triángulo de la enfermedad.

El principal problema fitosanitario que se manifestó en la región del NOA en los últimos años es el “amarillamiento”, desencadenado por un conjunto de factores bióticos y abióticos y acciones que tienden a un manejo poco sustentable del cultivo. La constante degradación de los suelos, por el empleo inadecuado de tecnologías, exceso de labores, falta de rotaciones y de sistematización para riego, llevaron a la pérdida de materia orgánica y de estructura produciendo el planchado, presencia de capas densificadas y compactadas a 20 y 30 cm de profundidad y erosión hídrica (Pérez *et al.*, 2009). Además, se identificó en toda la región del NOA un complejo de agentes causales de amarillamiento: *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani* y *Ralstonia solanacearum* (Mercado Cárdenas *et al.*, 2008). La importancia de las especies de *Fusarium* como patógeno se ha puesto de manifiesto debido su incremento en prevalencia e incidencia en diversos lotes tabacaleros en la provincia de Salta y Jujuy .

Enfermedades causadas por *Fusarium spp.*

El marchitamiento vascular (*Fusarium wilt*) producido por miembros del complejo *Fusarium oxysporum* (*F. o.*) y la podredumbre radicular (Root rot) ocasionada por miembros del complejo *Fusarium solani* (*F. s.*) son enfermedades ampliamente distribuidas a nivel mundial generando pérdidas importantes en numerosos cultivos (Gordon y Martyn, 1997; Summerell *et al.*, 2011). En la Argentina, en los últimos años se estudiaron en diferentes patosistemas describiendo a los complejos *F. o.* y *F. s.* como agentes causales que afectan a *Dianthus caryophyllus* L., *Glycine max*, *Citrus limón* y *Latuca sativa*, entre otros (Lori *et al.*, 2004; Scandiani *et al.*, 2012; Fogliata *et al.*, 2013; Malbrán *et al.*, 2016).

El marchitamiento vascular del tabaco, causado por *F. o.* Schlechtend.:Fr. f. sp. *nicotianae* es una enfermedad generalizada que ocurre en muchos países y típicamente da lugar a daños severos en áreas localizadas (Lucas, 1975). La enfermedad fue reportada por primera vez en los Estados Unidos en 1916 en Maryland (Johnson, 1921). En los años ochenta y comienzos de los noventa, se convirtió en una de las enfermedades más importante y perjudicial en el cultivo de tabaco en Connecticut y Massachusetts, afectando aproximadamente el 20% de los campos con una elevada severidad y provocando la remoción total de los campos más infestados. Miembros del complejo *F. o.* se estudiaron principalmente debido a su capacidad de causar enfermedades en hospedantes de plantas económicamente importantes, sin embargo su distribución y actividad ecológica reflejan un rango mucho más diverso.

Miembros del complejo *Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder y Hansen. presentan una distribución cosmopolita, pueden ser encontrados frecuentemente en los suelos y son clasificados como patógenos en un diverso rango de hospedantes, tales como *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Citrus limón* y *Solanum tuberosum*.

Sintomatología

Las especies de *Fusarium* pueden provocar graves daños en el cultivo de tabaco, ya que puede infectarlo en todas las etapas y no es posible detectar su presencia en su estado inicial debido a que los síntomas aparecen al mes de la infección (Ochoa *et al.*, 2004).

Las patologías producidas por miembros de los complejos *F. o.* y *F. s.* se pueden desarrollar en todos los estadios de crecimiento vegetativo, si se presentan las condiciones predisponentes para el desarrollo de la enfermedad.

- Marchitamiento vascular por *F. o.*

El síntoma más pronunciado de *F. o.* es que la hoja afectada presenta clorosis unilateral y detención de crecimiento provocando el encorvamiento de la misma. Este fitopatógeno puede ingresar en una sola raíz y extenderse por solo un lado de la planta (Figura 1.7). Sin embargo, puede infectar también todo el sistema radicular dando como resultado un marchitamiento y retraso del crecimiento generalizado, ocasionando la muerte de la planta (Lucas, 1975; Shew y Lucas, 1991). Puede ingresar al hospedante a través de heridas autogénicas propias del crecimiento radicular pero también la penetración puede verse favorecida por heridas radiculares realizadas por prácticas de labranza o presencia de nemátodos fitófagos (LaMondia, 2015). Una vez dentro de la planta, el patógeno se mueve hacia el tejido vascular por colonización intercelular de los vasos del xilema y los invade cuando están maduros, o si la penetración es por herida se sitúa en ellos. Coloniza los vasos del xilema por crecimiento del micelio o por medio del transporte pasivo de los microconidios producidos en dichos vasos, lo cual ocasiona una colonización rápida y discontinua. (Shew y Lucas, 1991).

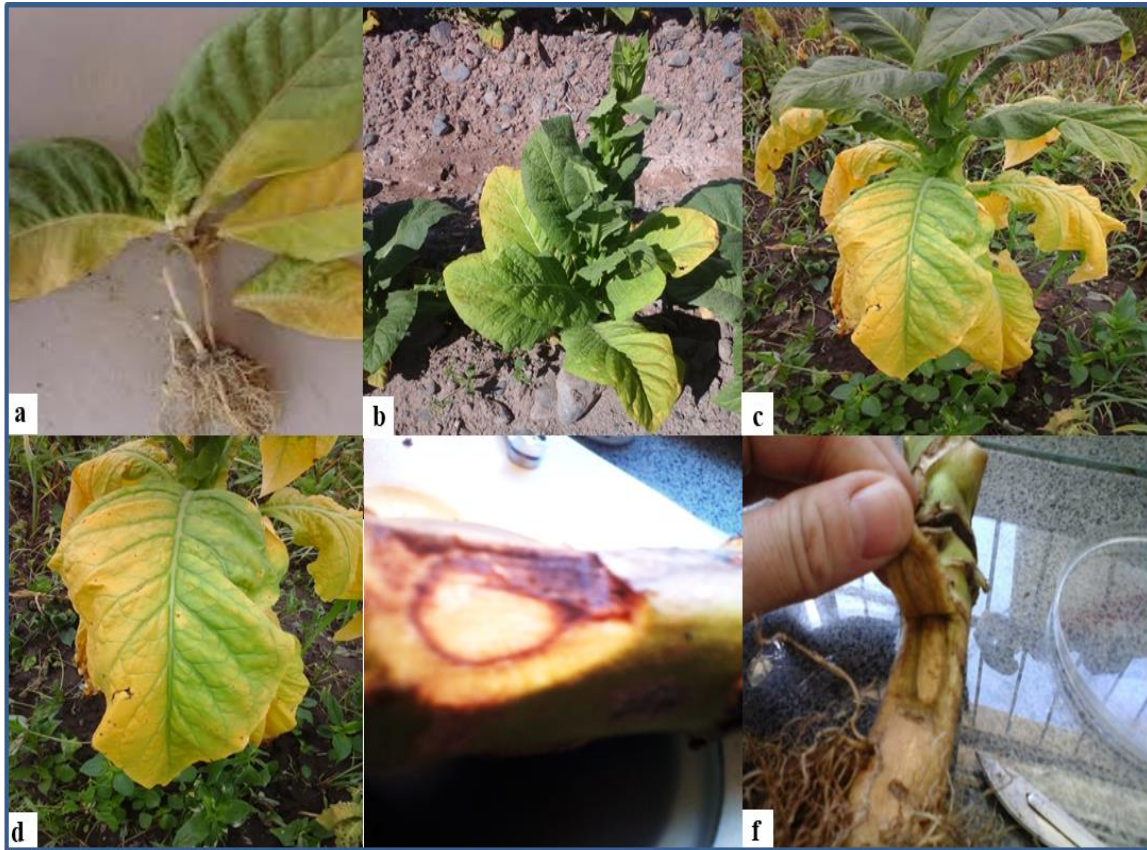


Figura 1.7. Síntomas producidos por *F. o.* a) Planta enferma; b) planta de treinta días después del trasplante (DDT) con la manifestación de los primeros síntomas; c y d) planta de 70 DDT manifestando un estado avanzado de la enfermedad; e y f) necrosis de haces vasculares en plantas de 70 DDT.

- Podredumbre radicular por *Fusarium solani*

Los síntomas producidos por *F. s.* son marchitamiento con clorosis y necrosis de las hojas más bajas que posteriormente va progresando hacia las hojas superiores, la raíz principal manifiesta decoloración y necrosis (Figura 1.8). Al cortarse la base del cuello y a lo largo de la raíz principal, se observa que el tejido leñoso muestra una coloración marrón. A causa de estos ataques se obstruye el libre paso de sustancias nutritivas desde la raíz y la planta muere (Lucas, 1975). Los mecanismos que desencadenan la aparición de los síntomas en ambos casos pueden deberse a la obstrucción del sistema vascular de la planta o bien a la producción de toxinas por parte del patógeno.



Figura 1.8. Síntomas producidos por *F. s.* a) Planta de 15 DDT observándose podredumbre radicular por *F. s.*; b) planta con clorosis y c) micelio de *F. s.* desarrollado en cámara húmeda.

Taxonomía de *Fusarium*

Según Leslie y Summerell (2006), la clasificación del género *Fusarium* se ubica en la División Ascomycota, Subdivisión Pezizomycota, Clase Sordariomycetes, Subclase Hypocreomycetidae, Orden Hypocreales y Familia Hypocreaceae.

La taxonomía de *Fusarium* ha sufrido una serie de cambios en los últimos 100 años y en consecuencia, el concepto de especie dentro del género ha variado mucho. La base para todo sistema taxonómico moderno en *Fusarium* es el trabajo de Wollenweber y Reinking (1935) donde establecieron 16 secciones dentro del género, 65 especies y 77 variantes subespecíficas.

En las décadas de 1940 y 1950, Snyder y Hansen (1940) redujeron el número de especies dentro del género a nueve y demostraron que sólo mediante el uso de cultivos derivados de una sola espora podrían hacerse identificaciones confiables de especies.

El siguiente desarrollo significativo en la taxonomía de *Fusarium* fue realizado por Booth durante los años sesenta y setenta, este incluyó claves para las secciones y especies de *Fusarium* en un sistema taxonómico más completo que tomó como base el enfoque de Wollenweber y Reinking. Este incluyó una mayor percepción de las células conidiógenas, especialmente las que producen los microconidios.

En los años setenta y ochenta, Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson *et al.* (1983), tomaron la base de Wollenweber y Reinking, Snyder, Hansen y Booth y desarrollaron un sistema taxonómico más robusto, el cual es utilizado hasta la actualidad. Sin embargo, en los últimos años

las técnicas moleculares se tornaron ampliamente disponibles y demostraron ser herramientas de gran importancia para resolver problemas taxonómicos.

- **Concepto de especies y poblaciones en *Fusarium***

Para la clasificación taxonómica dentro del género *Fusarium*, se utiliza más de un concepto para definir especie.

- Especie biológica: Mayr (1963) considera “como grupos de poblaciones con potencial de entrecruzarse con otras”. El concepto biológico se basa en la reproducción sexual dentro de la especie. Sin embargo, en el caso de algunos hongos, el intercambio genético solo es posible de manera asexual cuando existe compatibilidad vegetativa. Es aún, más complicada la clasificación de especies mediante ésta metodología para el caso de hongos como *F. o.*, o los deuteromicetes, los cuales no presentan reproducción sexual conocida.

- Especie morfológica: Se basa en los caracteres morfológicos que van a definir una especie, es decir se fundamenta sobre la idea de que un "tipo" morfológico o un individuo puede representar la variación dentro de una especie entera. Para ello, es necesario iniciar la identificación con cultivos monospóricos, condiciones específicas y medios selectivos. Es una herramienta útil para la clasificación inicial de la diversidad de especies. La especie es caracterizada según rasgos morfológicos, como forma, color y tamaño de la colonia, caracterización de macro, meso y microconidios, formación de clamidosporas, coloración de las hifas, etc. Actualmente, especies muy relacionadas entre sí morfológicamente han vuelto a ser clasificadas filogenéticamente a través de métodos moleculares más certeros (Leslie *et al.*, 2006).

- Especie filogenética: El análisis filogenético, consiste en una clasificación de especies a partir de la secuenciación de uno o dos *loci* y comparación de las secuencias obtenidas. Para la determinación de especies del género *Fusarium* se emplean amplificación, secuenciación y posterior análisis de regiones conservadas del ADN, que a su vez son lo suficientemente variables para ser utilizadas en estudios de poblaciones. Ejemplo de ello son, el factor de elongación 1-alpha (EF-1 α), la sub-unidad menor de ribosomas mitocondriales (mtSSU) y la β -tubulina (TUB), (O'Donnell *et al.*, 1998; Stenglein *et al.*, 2010) etc. Estas regiones están altamente conservadas en una especie y son variables entre especies. Sin embargo hay casos donde se dan reacciones cruzadas, debido probablemente a las mutaciones y cambios constantes que sufren las especies. Es por ello, que el mejor método de identificación de una especie en *Fusarium*, es a través de una combinación de los conceptos de especies.

Taxonomía de los complejos *F. oxysporum* y *F. solani*.

El complejo *F. o.* fue considerado en la sección *Elegans* donde Snyder y Hansen (1940) lo propusieron. A su vez, el enfoque taxonómico de *Haemanectria haematococca* (anamorph – *F. s.*), se basa en el desarrollado también por Snyder & Hansen y utilizado por Nelson *et al.*, (1983) proponiendo a *F. s.* dentro de la sección *Martiella-Ventricosum*. Actualmente, se considera que estas especies están conformadas por un complejo de varias especies por lo mencionado anteriormente (de ahora en más complejo *F. o.* y *F. s.*).

Rango de hospedante y forma especial del complejo *F. o* y *F. s*

Fusarium oxysporum es una especie anamórfica que incluye cepas patogénicas y no patogénicas, comprende numerosos miembros patógenos de plantas que causan la marchitez vascular, pudriciones de corona y raíz en más de 100 especies de plantas, entre las cuales se encuentran varios cultivos económicamente importantes como en *Musa paradisiaca*, *Phoenix dactylifera*, *Cucumis melo*, *Solanum lycopersicum*, *Cicer arietinum*, *Nicotiana tabacum*, *Allium cepa*, entre otros. Las cepas individuales suelen infectar sólo una o pocas especies de plantas, por lo tanto, se han asignado formas especiales (f. sp.) basadas en la especificidad del hospedante, existen más de 120 f. sp. descritas hasta el momento. Por ejemplo, *F. o.* f. sp. *cucumerinum* y *F. o.* f. sp. *lycopersici* sólo causan enfermedad en el pepino y el tomate, respectivamente. Algunas formas especiales tienen rangos de hospedantes más amplios, como *F. o.* f. sp. *radicis-cucumerinum* y *F. o.* f. sp. *radicis-lycopersici* que, aparte de infectar el pepino y el tomate, pueden causar la podredumbre de raíces y tallos en múltiples hospedantes de diferentes familias. Varias formas especiales se han subdividido en razas en base a la especificidad del patógeno por el cultivar del hospedante como por ejemplo, *F. o.* f. sp. *lactucae* (Fujinaga *et al.*, 2005), *F. o.* f. sp. *cubense* (Sutherland *et al.*, 2013), entre otros. Armstrong y Armstrong (1958) en su lista de formas especiales incluyeron aislamientos de *F. o.* f. sp. *nicotianae* dentro de *F. o.* f. sp. *batatas*, de modo que esta forma especial incluye cepas patogénicas para ambos cultivos (batata y tabaco).

Fusarium solani tiene una distribución cosmopolita, se puede encontrar en una amplia variedad de suelos como habitante natural, es una de las pocas especies de *Fusarium* que puede habitar en suelos de la selva tropical, pero son más escasos en zonas templadas. Se registra como patógeno en una amplia y diversa gama de plantas hospedantes. Además, pueden ser serios patógenos humanos y animales (Booth, 1971; O'Donnell *et al.*, 2008). Basado en características morfológicas, *F. s.* ha demostrado ser una especie politípica. Por lo tanto, la taxonomía del complejo entró en una nueva serie de estudios sistemáticos y filogenéticos (O'Donnell, 2000). Las

cepas de *F. s. f. sp. glycine* eran conocidas como agente causales de la muerte súbita en soja (SMS), estudios moleculares, morfológicos y patogénicos realizados desde 2003 demostraron que el SMS es causado por 4 especies de *Fusarium*, habitantes del suelo, muy relacionadas entre sí de la sección Martiella y con crecimiento lento (< de 2 cm de diámetro/4 días). Las especies morfológica y filogenéticamente diferentes son: *F. virguliforme*, *F. tucumaniae*, *F. brasiliense*, y una especie nueva *Fusarium crassistipitatum*. nov. Adicionalmente, otras dos especies de *Fusarium*, muy cercanas a las mencionadas, causantes de podredumbre de raíces en poroto (*Phaseolus* spp.), podrían causar síntomas del SMS en soja (Aoki *et al.*, 2005). Dentro de las formas especiales VanEtten (1978) comprobó que *F. s. f. sp. pisi* además de ser patógenos de arveja también son patógenos en otros hospedantes. O'Donnell *et al.* (2000) en base a los problemas asociados con la clasificación de formas especiales en el complejo *F. s.* concluyeron que la clasificación es incierta y engañosa. En la Argentina, existen antecedentes en el estudio de este complejo en *Origanum vulgare* (Gaetán, 2005), *Olea europea* (Perez *et al.*, 2011) y *Glycine max* (Scandiani *et al.*, 2012).

Biología y ecología

Las especies de *Fusarium* pueden infectar el cultivo de tabaco en todas las etapas y no es posible detectar su presencia en su estado inicial ya que los síntomas aparecen al mes de la infección (Ochoa *et al.*, 2004). En ausencia de tejidos hospedantes vivos, el patógeno es capaz de sobrevivir como clamidosporas en tejidos previamente colonizados y en suelo donde puede persistir por largos períodos, latente o como endófito en hospedantes alternativos (Figura 1.9). Estas estructuras de resistencia pueden sobrevivir en el suelo durante más de 10 años, pero hay evidencia de que este período podría ser aún más largo. En la proximidad de las raíces de tabaco se induce la germinación de las clamidosporas. La infección se produce como repuesta a exudados de raíces primarias y secundarias. Después de la germinación, las hifas se adhieren y penetran directamente en la epidermis. Las especies patógenas de *Fusarium* poseen la capacidad de penetrar al igual que otros fitopatógenos por heridas autógenas, antrópicas o por nemátodos. *F. o.* una vez dentro de la planta se mueve hacia el tejido vascular por colonización intercelular de los vasos del xilema y los invade cuando están maduros y se sitúa en ellos. Coloniza los vasos del xilema por crecimiento del micelio o por medio del transporte pasivo de los microconidios producidas en dichos vasos, lo cual ocasiona una colonización rápida y discontinua. Este patógeno a menudo penetra en una sola raíz y se extiende por toda la planta. Puede atacar solamente una parte o todo el sistema radicular

provocando la muerte del hospedante (Shew y Lucas, 1991). Como se mencionó anteriormente, además de los síntomas ocasionados por *F. o.*, al cortarse la base del cuello y a lo largo de la raíz principal, se observa que el tejido leñoso muestra una coloración marrón. A causa de estos ataques se obstruye el libre paso de sustancias nutritivas hacia las raíces y la planta muere (Lucas, 1975). La germinación de esporas de *F. s.* se ve favorecida por los exudados radiculares; algunos ácidos grasos (Harman *et al.*, 1980) y flavonoides (Ruan *et al.*, 1995; Bagga y Straney, 2000). En contraposición, los macroconidios pueden ser inhibidos por concentraciones elevadas de amoníaco y pH bajo. Posee gran facilidad para crecer bajo condiciones microaeróbicas. La infección se inicia por la secreción de cutinasas y varias enzimas involucradas en la degradación de fitoalexinas que facilitan la penetración en las raíces y la colonización del tejido cortical (Jones y Epstein, 1990).

Entre las condiciones del medio que predisponen, regulan las interacciones o facilitan el desarrollo de la enfermedad, se encuentra la temperatura del suelo que influye notablemente en la producción, sobrevivencia y producción de clamidosporas. La temperatura óptima para el desarrollo de *F. o* y *F. s.* es de 25-28 °C aunque algunas cepas del complejo *F. s.* tienen la capacidad de desarrollo a temperaturas superiores. A su vez la cantidad de agua en el suelo influye sobre la germinación de las clamidosporas ya que con ella se difunden los exudados radiculares y permite la posterior germinación de hifas (Cook, 1980). Por lo general, las especies de *Fusarium* son más activas y sobreviven eficazmente en hábitats con limitaciones de agua. Sin embargo *F. s.* puede desarrollarse en suelos con escasa disponibilidad de oxígeno, mientras que *F. o.* es favorecido por condiciones de sequías donde tiene un menor efecto antagónico. La enfermedad es más grave en condiciones cálidas y en suelos de textura gruesa (LaMondia, 2015).

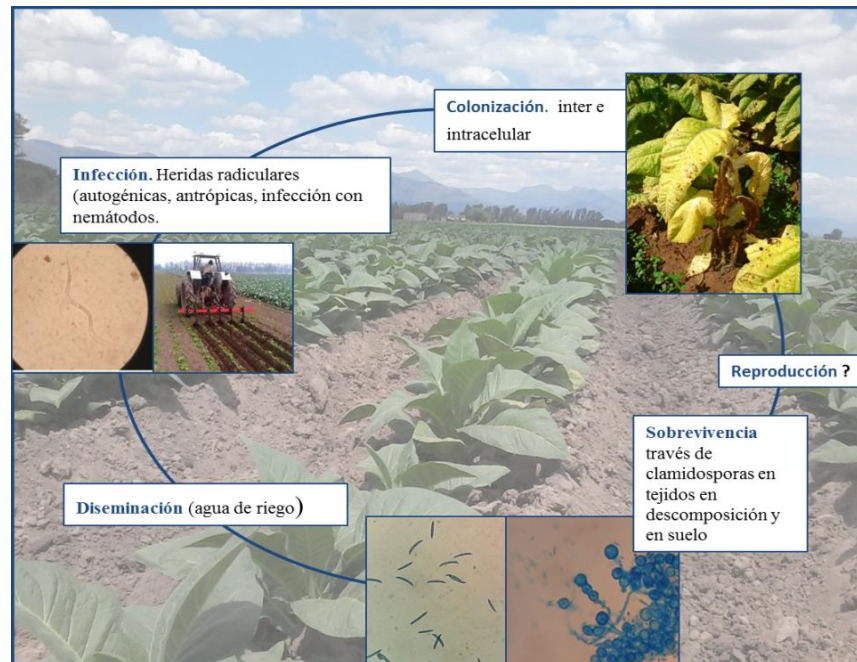


Figura 1.9. Ciclo de las enfermedades producidas por los complejos *F. o.* y *F. s.*

Manejo de la enfermedad

El manejo de las enfermedades causadas por fitopatógenos habitantes del suelo es compleja y requiere el uso de diferentes estrategias de manejo para un control eficaz. El manejo de *Fusarium* en tabaco puede ser a través de diferentes estrategias que incluyen la resistencia del material utilizado, prácticas culturales, rotación, fertilización balanceada, manejo de nemátodos y control químico o biológico. No todas las estrategias de manejo son igualmente efectivas, sin embargo no hay controles químicos completamente seguros o eficaces (LaMondia, 2015).

- Manejo genético

La resistencia genética es un pilar fundamental en el manejo de enfermedades. El control más eficaz del marchitamiento por *Fusarium* fue logrado mediante el desarrollo y uso de variedades resistentes (Lucas, 1975). En Connecticut (EEUU), se liberaron variedades de tabaco como 'C9' y 'B2' con resistencia al patógeno (LaMondia y Taylor, 1992). Esta resistencia es considerada como poligénica y los genes con efecto aditivo se acumulan para lograr una resistencia eficaz (Gritton *et al.*, 1965, Jones y Woltz, 1972). La resistencia al marchitamiento se asoció con la localización y el movimiento más lento del patógeno en los tejidos vasculares. Se observaron repuestas de plantas

tales como oclusiones tipo vesícula, deposición callosa en el xilema y secreciones de material lipoideo para prevenir la extensión lateral (Mueller y Morgham, 1996).

- Manejo cultural

Las labores que se realizan durante y posteriores al ciclo de cultivo son claves para disminuir el efecto de estas enfermedades ya que se puede evadir o minimizar el contacto entre el hospedante y el patógeno evitando así que la enfermedad se extienda. Las prácticas culturales a tener en cuenta son:

Evitar las heridas radiculares

Reducir la incidencia de las heridas radiculares que se producen al realizar las tareas de cultivo demasiado cerca de las plantas, o bien cuando se efectúa la práctica de “azadoneo” y se generan puertas de entrada o sitios de infección que resultará en un aumento de la enfermedades producidas por *Fusarium* spp. u otras especies (Lucas, 1975). También se ha demostrado que nemátodos *Meloidogyne hapla* y *Globodera tabacum*, aumentan la gravedad del marchitamiento vascular probablemente debido a que aumentan los sitios de infección por el incremento de las heridas (Powell, 1971; Taylor, 1987; LaMondia, 1992). En ensayos realizados con nemátodos, las plantas parasitadas antes de la inoculación con *F. o.* presentaron mayor incidencia y severidad de marchitamiento que las inoculadas simultáneamente, y la infección por *Globodera tabacum* fue más severa que en el tratamiento con *Meloidogyne hapla* (LaMondia, 1992). En el patosistema estudiado, se comprobó una correlación positiva entre los dos complejos de *Fusarium* y *Meloidogyne* en diferentes localidades tabacalera de la provincia de Salta, indicando que la presencia de *Meloidogyne* favoreció la incidencia de estas enfermedades radiculares (Avila *et al.*, 2017).

Control de la propagación del patógeno

La propagación de *Fusarium* puede ser bastante fácil por la práctica de incorporación de los tallos de tabaco una vez finalizada la cosecha dejando en el suelo clamidosporas, restos de micelios y conidios que serán una fuente de inóculo para la próxima campaña.

Fertilización balanceada

Varias enfermedades vasculares producidas por *Fusarium* han sido manejadas manipulando el pH del suelo y la nutrición de macro y micro elementos (Engelhard y Woltz, 1973, Jones y Epstein, 1989). La fuente de nitrógeno, la disponibilidad de calcio y el pH del suelo se han asociado con la incidencia y gravedad de la marchitez en tomate y crisantemo (Woltz y Jones, 1973). LaMondia y Rathier (1995) determinaron que el calcio resultó uno de los factores nutricionales esenciales para

el manejo del marchitamiento por *Fusarium* en tabaco. La mala nutrición del calcio ha sido implicada como un factor en el desarrollo del marchitamiento vascular (Edgington y Walker, 1958, Corden, 1965, Jones y Woltz, 1969), ya que el calcio regula la biosíntesis de calosa (Kauss, 1985). La deposición de calosa en los vasos vasculares puede ser una de las primeras repuestas de defensa a la invasión del patógeno (Mueller y Morgham, 1996). El calcio también puede ser el nutriente más susceptible a la manipulación en la producción de tabaco. El marchitamiento por *Fusarium* puede ocurrir en suelos ácidos, neutros o alcalinos (Johnson, 1921; Lucas, 1975), y el pH del suelo debe tener niveles superiores a 6.4 para tener un efecto apreciable de la enfermedad.

Implementación de rotación de cultivos

El patógeno una vez presente en un campo persiste durante años en ausencia del hospedante susceptible. El uso de la rotación de cultivos como una estrategia para reducir la densidad de patógeno en el suelo varía ampliamente y depende mucho de la supervivencia de las clamidosporas (Nelson, 1981) y de la capacidad del patógeno para colonizar las raíces de variedades resistentes y restos de otras especies de planta. En campos infestados con *F. o. f. sp. nicotianae*, el tabaco no debe cultivarse en rotación con batata o cultivos pertenecientes a la misma familia ya que ambos son susceptibles a la infección por los mismos patógenos de marchitamiento (LaMondia, 2015).

El tabaco resistente a *Fusarium* spp. ha permitido con éxito la producción en campos infestados con *F. o.* y *Globodera tabacum* (LaMondia, 1995). Sin embargo, existen informes de una nueva especie, *Fusarium kyushuense*, descrita por primera vez en Japón (Aoki y O'Donnell 1998), que puede causar marchitamiento en tabaco en China (Wang *et al.*, 2013), desconociendo si los genes de resistencia actuales en tabaco son eficaces contra éste patógeno. De manera que, el desarrollo y la utilización de variedades de tabaco resistentes o con un elevado grado de tolerancia al marchitamiento vascular deben continuar.

- **Manejo biológico**

Diversos microorganismos no patógenos o antagonistas accionan de manera positiva en la relación hospedante-patógeno-ambiente, ya que poseen el potencial para limitar la actividad del patógeno o aumentar la resistencia al hospedante (Cook y Baker, 1983). Los microorganismos capaces de controlar a los fitopatógenos, habitantes naturales de los suelos son diversos e inclusive algunas cepas de *F. o* son consideradas agentes de biocontrol (Weideman y Wehner, 1993). De forma similar, la cepa no patógena *F. o.* (Fo47) imprime repuestas de defensas en plantas de tomate en el control de *F. o. f. sp. lycopersici* (Aimé *et al.*, 2013).

Sin embargo, los estudios sobre suelos supresores, es decir, suelos con baja incidencia de enfermedad a pesar de la presencia del patógeno, enfatizan la existencia de microorganismos antagónicos en el suelo (Stotzky y Martin, 1963). A partir de allí se han desarrollado diferentes estrategias para identificar potenciales agentes de control biológico que actúan directa o indirectamente contra *Fusarium* spp. y por lo tanto reducen su desarrollo. Estas acciones incluyen micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes o nicho ecológico y la inducción de reacciones de defensa de las plantas (Baker y Cook, 1974). Algunas cepas de *Trichoderma* son conocidas por su capacidad micoparasitaria en *F. o.* (John *et al.*, 2010). A su vez, *Bacillus thermoglucosidasius* produce antibióticos, y existen reportes de que favoreció la inhibición del crecimiento y control de *F. o. f. sp. lili* (Chung *et al.*, 2011). La competencia por recursos es otro tipo de interacción entre los microorganismos. Algunos microorganismos han desarrollaron estrategias beneficiosas para estar delante de otras cuando compiten por un mismo nicho ecológico o para una misma fuente de nutriente (John *et al.*, 2010).

- Manejo químico

Los productos fitosanitarios más efectivos contra *F. o.* y *F. s.* fueron el bromuro de metilo o la cloropicrina (Bennett *et al.*, 2011), pero el uso de bromuro de metilo se ha eliminado actualmente. La fumigación del suelo con metam sodio se utiliza en almacigos de tabaco y hortícolas para la desinfección inicial del suelo. Sin embargo, este producto no fue eficaz para reducir el marchitamiento del algodón causado por *F. o. f. sp. vasinfectum* (Bennett *et al.*, 2011). La fumigación del suelo puede controlar indirectamente la expresión de la enfermedad mediante el control de nemátodos parasitarios de las plantas (LaMondia, 2015).

La necesidad de encontrar fungicidas contra *Fusarium* es un paso clave en la protección química, como así también el uso de los agentes químicos apropiados. Los tres fungicidas comerciales para el control de *Fusarium* son los que contienen los siguientes principios activos: Triazoles (tebuconazol), bencimidazoles (carbendazim) y estrobilurinas (azoxistrobina). En ensayos realizados por Frac *et al.*, (2016) los tratamientos que consistieron en diferentes concentraciones de estos fungicidas demostraron que la toxicidad de los mismos depende del tipo y la concentración y de los aislamientos de *Fusarium*. Tebuconazol resultó ser el más potente, proporcionando una mayor eficiencia en la inhibición. En complemento, carbendazim también causó la inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp., pero algunos aislamientos se mostraron resistentes al fungicida a base de azoxistrobina.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

1-La prevalencia del marchitamiento vascular y podredumbre radicular producido por *Fusarium* spp. está influenciada las prácticas de manejo del cultivo y las condiciones edafoclimáticas.

2-Los síntomas de marchitamiento vascular y pudrición de raíz observados a campo en el cultivo de tabaco en la región del NOA están asociados con especies de los complejos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, respectivamente.

3-Diferentes variedades de tabaco presentan susceptibilidad diferencial al marchitamiento vascular causado por especies de *Fusarium*.

OBJETIVOS

Objetivo general: Conocer la diversidad de *Fusarium* spp. asociadas al marchitamiento vascular y podredumbre radicular en *Nicotiana tabacum* L. en la región del NOA, para aportar conocimiento a los programas de mejoramiento.

Objetivos específicos:

1. Realizar el relevamiento de lotes comerciales de tabaco en las provincias de Salta y Jujuy para observar síntomas y daño producido por especies de *Fusarium* y determinar su relación con variables de manejo y edafoclimáticas.
2. Aislar e identificar especies del género *Fusarium* presentes en cultivos de tabaco en Salta y Jujuy mediante técnicas convencionales y marcadores moleculares.
3. Evaluar los niveles de patogenicidad de los aislamientos en diferentes variedades de tabaco Tipo Virginia.



CAPÍTULO II

Dinámica de la intensidad del marchitamiento vascular y de la podredumbre radicular causadas por *Fusarium* spp. en el cultivo de tabaco en el NOA.

INTRODUCCIÓN

En el estudio de una epidemia, se utiliza en gran medida observaciones, mediciones, fórmulas matemáticas y análisis estadísticos, que permiten representar la compleja dinámica que se presenta en un patosistema determinado. Su descripción cuantitativa, proporciona abundante y valiosa información relacionada con la cantidad y eficiencia del inóculo inicial, los efectos del ambiente, la resistencia del hospedante, el tiempo de interacción entre la planta y el patógeno, los sistemas de predicción y la efectividad de las estrategias de manejo de la enfermedad. La Epidemiología Agrícola, es una ciencia que estudia los diversos factores que afectan el proceso y diseminación de las enfermedades en las plantas cultivadas (Achicanoy López, 2000). Esta se divide en descriptiva, que caracteriza los procesos epidemiológicos mediante la exploración gráfica y parámetros obtenidos por medio de análisis cuantitativo y cualitativo, e inferencial que permite realizar inferencia probabilística sobre cambios en la intensidad de la enfermedad. En ambas, los estudios pueden realizarse a nivel espacial y temporal (Mora Aguilera, 2008). De esta manera, para expresar la dinámica que presenta una enfermedad en el transcurso del tiempo, las enfermedades se clasifican como monocíclicas o policíclicas. Las enfermedades ocasionadas por miembros de los complejos *F. o.* y *F. s.* son clasificadas como enfermedades monocíclicas (Días, 2013), debido a las características de estos patógenos que, además de ser necrotróficos (parásitos facultativos) y altamente eficientes en la infección de su hospedante, tienen la capacidad de generar estructuras de resistencia. Por otro lado, el progreso de estas enfermedades es lento y su manejo es muy difícil (LaMondia, 2015).

Unos de los aspectos más importantes de una enfermedad es observar y cuantificar su comportamiento a campo, en donde importan las poblaciones biológicas del hospedante y del patógeno, pero ambas interaccionando y condicionadas en su interacción con el medio (Figura 2.1.). Por lo tanto un patosistema debe abordarse como parte de una complejidad biológica intrínseca a la sanidad (Mora Aguilera *et al.*, 2012). Dentro de un agroecosistema la organización como base de la estructura sanitaria es definida como un atributo intrínseco de las especies involucradas, plantas sanas, plantas sintomáticas, proceso de incubación de la enfermedad también lo relacionado a la estructura del hospedante, que incluye variedad y estadio fenológico. La función es el resultado o tipo de organización poblacional del hospedante y del patógeno y su interacción con el medio (Mora Aguilera, 2008). Los parámetros básicos para describir la intensidad de una enfermedad son: la incidencia, que es la cantidad de plantas bajo condición de enfermedad en

relación a la población disponible en espacio y tiempo; y la severidad comprendida como una medida que estima la cantidad relativa del área con un determinado síntoma por unidad de observación. Estos dos parámetros son vitales para el estudio de una enfermedad en una región. (Mora Aguilera, 2008).

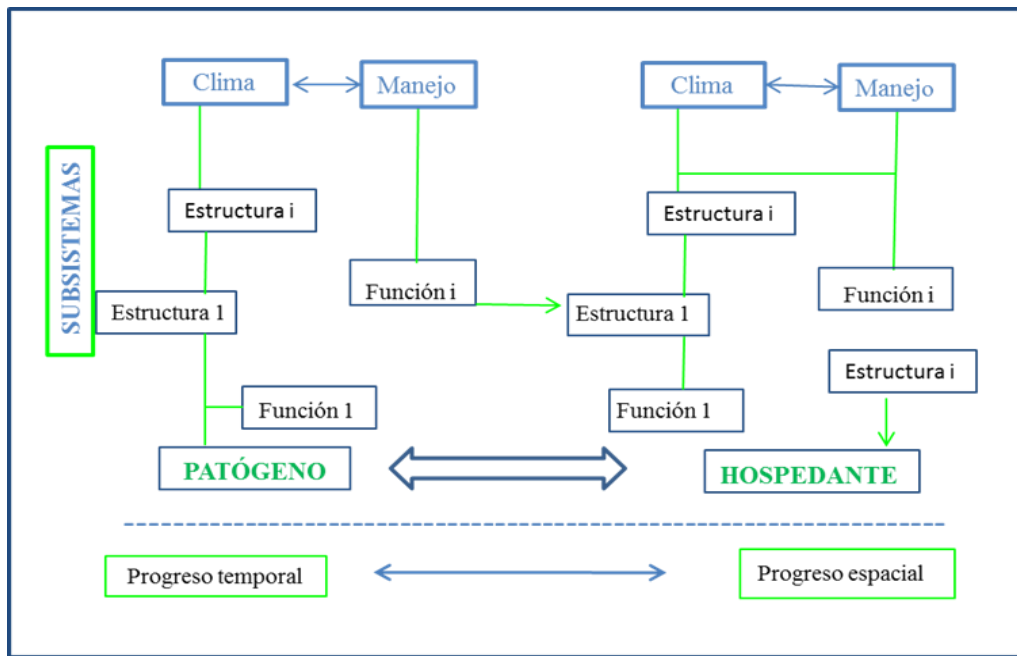


Figura 2.1. Esquema de la relación entre las poblaciones del patógeno y hospedante a través de atributos estructurales y funcionales influenciados por el clima y el manejo agronómico (Mora Aguilera, 2008).

En los suelos donde son abundantes las comunidades de *Fusarium* spp., la diversidad de las especies depende de varios factores tales como el tipo de cultivo, de las características físico químicas del suelo, condiciones climáticas y de las prácticas agronómicas llevadas a cabo por el hombre (Bateman y Murray 2001; Steinkellner y Langer, 2004; Summerell *et al.*, 2011). Silvestro *et al.*, (2013) estudiaron en trigo la ocurrencia y distribución de *Fusarium* spp. a diferentes profundidades del suelo bajo cinco sistemas de labranzas, y encontraron que la especie más prevalente en todos los casos fue *F. o.*, que a su vez registró una mayor frecuencia bajo sistemas intensivos de cultivo. Sin embargo, no ocurre lo mismo con miembros del complejo *F.s.* ya que son menos frecuentes. Según Saremi *et al.*, (1999) la variación de temperatura en un agroecosistema puede producir cambios en la estructura poblacional de *F.o.* y *F.s.*. Además, las poblaciones patógenas y no patógenas de estos complejos puede fluctuar mucho dentro y entre las temporadas de cultivo según las condiciones edafoclimáticas regionales (Bateman y Murray 2001).

Los patógenos que ocasionan enfermedades radiculares frecuentemente aparecen como un complejo de organismos, en el cultivo de tabaco en la provincia de Salta y Jujuy se determinó la presencia de un complejo de agentes causales de amarillamiento: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. y *Ralstonia solanacearum* (Mercado Cárdenas *et al.*, 2008), donde su comportamiento está influenciado por factores ambientales, edáficos y de manejo. Dentro del agrosistema estudiado se estableció en relación a la podredumbre radicular producida por *Rhizoctonia solani* asociaciones significativas entre las variables agronómicas y meteorológicas en el cultivo del tabaco en la región del NOA (Mercado Cárdenas, 2016). Pero no existen estudios referentes al comportamiento de los complejos *F. o.* y *F. s.* en el cultivo de tabaco Tipo Virginia en la provincia de Salta y Jujuy. Por ello, desde el punto de vista metodológico se necesitan estudios que integren la unidad de producción, lote o parcela en el contexto regional dentro de este patosistema.

El presente capítulo se realizó bajo la hipótesis de que la prevalencia del marchitamiento vascular y de la podredumbre radicular producida por los miembros de los complejos *F. o.* y *F. solani* está influenciada por las prácticas de manejo del cultivo y condiciones edafoclimáticas.

Objetivos

1. Realizar el relevamiento de lotes comerciales de tabaco en las provincias de Salta y Jujuy para observar síntomas y daño producido por especies de *Fusarium*.
2. Analizar la dinámica de la incidencia de *Fusarium* spp. en base al estadio fenológico del cultivo
3. Relacionar la intensidad de la enfermedad con variables de manejo (tipo de almacigo, rotación, variedades empleadas), variables meteorológicas (temperatura media ambiente, precipitación y humedad relativa ambiente) y tipo de asociación de suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área y diseño de muestreo

Durante la campaña agrícola 2013-14 se relevaron 73 lotes comerciales de tabaco Tipo Virginia, 33 en la provincia de Salta y 40 en la provincia de Jujuy (Figura 2.2). De los mismos, 35 lotes se relevaron en la siguiente campaña (2014-15), 15 en la provincia de Salta y 21 en la provincia de Jujuy.

El relevamiento se llevó a cabo en tres etapas o estadios fenológicos del cultivo; 30 a 45 días después del trasplante (Estadio I), 50 a 65 días después del trasplante (Estadio II) y 90 a 115 días después del trasplante (Estadio III). En la campaña 2013-14, en la provincia de Salta, se monitorearon 33 lotes distribuidos en los departamentos de Cerrillos, Rosario de Lerma, Chicoana y La Caldera. En la provincia de Jujuy se relevaron 40 lotes, en los departamentos de El Carmen y Palpalá. En la campaña 2014-15 se relevó un total de 15 lotes para la provincia de Salta, realizando muestreos periódicos en los tres estadios fenológicos del cultivo. Mientras que en la provincia de Jujuy, se monitorearon 21 lotes, realizando un solo relevamiento a comienzos del tercer estadio fenológico. El diseño de muestreo en cada lote se realizó según March *et al.* (2007), relevando 10 estaciones de muestreo de 10 plantas por surco en 10 puntos de los lotes muestreados.

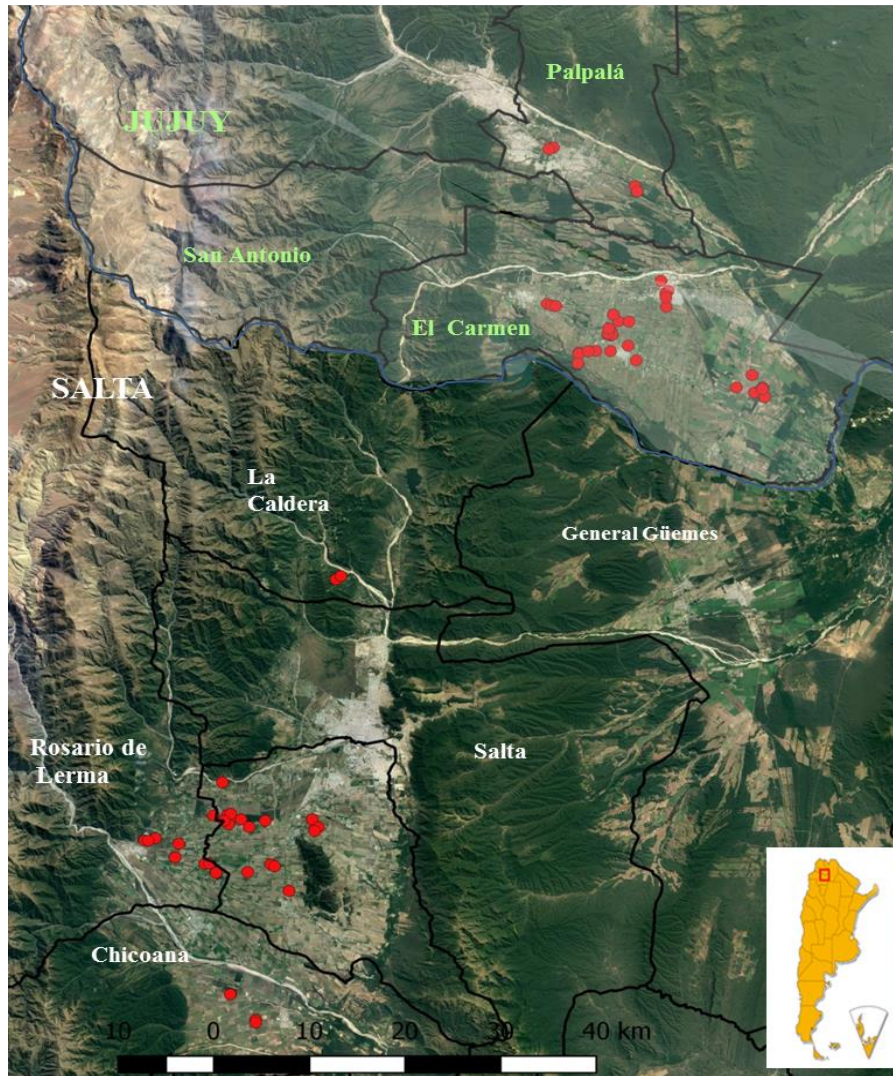


Figura 2.2. Puntos de relevamiento y muestreo en la provincia de Salta y Jujuy.

Variables analizadas

Las variables medidas fueron prevalencia (N° de lotes afectados del total relevado), incidencia (N° de plantas enfermas del total relevado) y severidad (% de tejido afectado por planta). Para ésta última se empleó una escala de 0 a 3 (0=sin síntomas; 1=0,1 a 33,33%; 2=33,34 a 66,66% y 3=66,67 a 100% del área afectada). Todos los lotes monitoreados fueron georeferenciados, a su vez cada uno de ellos cuenta con información complementaria brindada por el productor relacionada con variables de manejo agronómico tales como; variedad, tipo de almácigo (convencional o flotante), rotación y cultivo antecesor. A su vez se consideraron variables meteorológicas (temperatura, precipitación y humedad relativa) registradas en las diferentes estaciones meteorológicas cercanas a los puntos de relevamiento de las provincias de Salta y Jujuy y el tipo de asociación de suelo presentado para cada localidad.

Análisis estadístico

Para determinar la dinámica de la intensidad de la enfermedad ocasionada por *Fusarium* spp. en base al estadio fenológico del cultivo, el conjunto de datos fue analizado en un primer momento a través de estadística descriptiva; Media; desvío estándar (D.E.); varianza; mínimos (Mín); máximos (Máx); asimetría; Kurtosis y tablas de frecuencias absolutas. Se determinó la prevalencia de la enfermedad para cada provincia mediante tablas de frecuencias absolutas y se realizaron gráficos descriptivos. Se elaboraron tablas de contingencia para establecer la asociación entre la intensidad de la enfermedad y de las variables agronómicas, construidas para representar la distribución de los lotes por departamento para cada provincia. A su vez se determinó la prevalencia de ambas patologías por complejos para cada campaña y provincia. Para establecer si existen diferencias en relación a cantidad de plantas bajo condición de marchitamiento vascular o podredumbre radicular se realizó la prueba no paramétrica de Friedman (Friedman, 1937 y 1940). Por otro lado, se realizaron análisis de correlación entre la intensidad de la enfermedad y las variables meteorológicas. Para determinar si existió relación entre la intensidad de enfermedad frente a variables meteorológicas (temperatura media, precipitación y humedad relativa) se empleó el coeficiente de correlación de Spearman. Las variables meteorológicas fueron registradas en los tres momentos correspondientes a las etapas del muestreo, en los diferentes departamentos de las provincias de Salta y Jujuy. Los datos diarios de las estaciones fueron procesados para cada estadio fenológico, en el caso de la temperatura y humedad, se calculó el promedio y para la precipitación se tomó lo acumulado. Para determinar la asociación de la enfermedad frente al tipo de suelo de

cada localidad muestreada se emplearon tablas de contingencia. Se utilizó la clasificación suelos según el tipo de asociación propuesta por Nadir y Chafatinos (1990).

RESLTADOS

Descripción de síntomas del complejos *F. o.* y *F. s.*

Los relevamientos realizados durante las campañas (2013-14) y (2014-15) cubrieron la mayor parte de las zonas productoras de tabaco Tipo Virginia en la provincia de Salta y Jujuy. Los síntomas ocasionados por miembros del complejo *F. o.* se asociaron con los descriptos por Johnson (1921) y Lucas (1975). En el patosistema estudiado, se observó que las plantas sintomáticas mostraban una o varias hojas con clorosis, la misma comenzaba desde la parte basal y en algunas ocasiones de un lado de la planta. Las hojas afectadas manifestaron amarillamiento y detención de crecimiento en hojas jóvenes. Los haces vasculares toman una coloración marrón homogénea lo que permitió distinguirlo con el marchitamiento vascular producido por *Ralstonia solanacearum*, que produce estrías necróticas. En plantas donde se registró una mayor severidad del marchitamiento vascular por *F. o.* se observó que el sistema radicular presentaba necrosis y podredumbre radicular avanzada (Figura 2.3).

A su vez, los síntomas causados por miembros del complejo *F. s.* con respecto a la parte aérea, fueron marchitamiento con clorosis y necrosis de las hojas bajas que progresa lentamente hacia las hojas superiores. Las plantas sintomáticas manifestaron una reducción del crecimiento causando una clorosis generalizada en etapas avanzadas de la enfermedad. Las plantas manifestaron pérdida de vigor, flacidez, y detención de desarrollo. Esto se correlaciona con los síntomas presentes en el sistema radicular, donde se observó en la zona cercana al cuello de la planta lesiones necróticas manifestando una decoloración y podredumbre seca de la raíz principal y de las secundarias en etapas avanzadas de la enfermedad (Figura 2.4).



Figura 2.3. a) Planta de tabaco en Estadio I manifestando disminución en crecimiento producido por *F. o.*; b) hojas con síntomas de amarillamiento y detención de crecimiento lateral; c) planta de tabaco en Estadio II con clorosis; d) haces vasculares presentando una coloración marrón homogénea; e) planta de tabaco en Estadio III presentando un avanzado desarrollo de la enfermedad y f) corte transversal exponiendo la necrosis de los haces vasculares.



Figura 2.4. a y b) Plantas de tabaco en Estadio I manifestándose síntomas de podredumbre radicular. c) Plantas de tabaco en Estadio II con presencia de clorosis por *F. s.*; d) plantas de tabaco en Estadio III con presencia de clorosis por *F. s.*; e y f) observación de raíces de plantas sintomáticas con presencia de micelio de *F. s.*

Estadística descriptiva de los datos**Dinámica de la incidencia y severidad de *Fusarium* spp. en base al estadio fenológico del cultivo en la provincia de Salta.**

En la campaña agrícola 2013-14, se relevaron 33 lotes de Tabaco tipo Virginia en los departamentos Cerrillos, Rosario de Lerma, Chicoana y La Caldera. Para el primer Estadio fenológico el 21% de los lotes presentaron de incidencia entre 1 y 3%, el 79% restante tuvieron una incidencia del 0%. En el segundo estadio se incrementaron los lotes enfermos a 24% obteniendo valores de incidencia entre 1-3%, el 76% de los lotes se mantuvieron sin la presencia de la enfermedad. Para el último estadio monitoreado, se registró un 36% de lotes afectados, donde se manifestó la enfermedad con niveles de incidencia entre 1-10%. En el caso de la severidad, el total de plantas enfermas presentó grado 1 en la escala para el primer estadio de muestreo. El 99% de los lotes enfermos manifestó una severidad de 2 y 3 el resto fue en grado 1 para el segundo estadio de muestreo. Finalmente en el último estadio se observó una severidad en los tres grados siendo en mayor porcentaje de plantas entre los grados 2 y 3 (Tabla 2.1 y Figura 2.5.).

Tabla 2.1. Estadísticos descriptivos para las variables de incidencia y severidad evaluados en los tres estadios de cultivo en las provincias de Salta, campaña 2013-14.

Estadio fenológico	Intensidad de la enfermedad	Media						
		Media	D.E.	Var(n-1)	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis
Estadio I	Incendencia	0,3	0,53	0,28	0	2	1,55	1,26
	Severidad	0,27	0,45	0,2	0	1	1,07	-0,96
Estadio II	Incendencia	0,42	0,83	0,69	0	3	1,83	1,73
	Severidad	0,52	0,91	0,82	0	3	1,43	0,31
Estadio III	Incendencia	0,79	1,08	1,17	0	4	1,24	0,58
	Severidad	0,79	1,14	1,3	0	3	0,98	-0,76

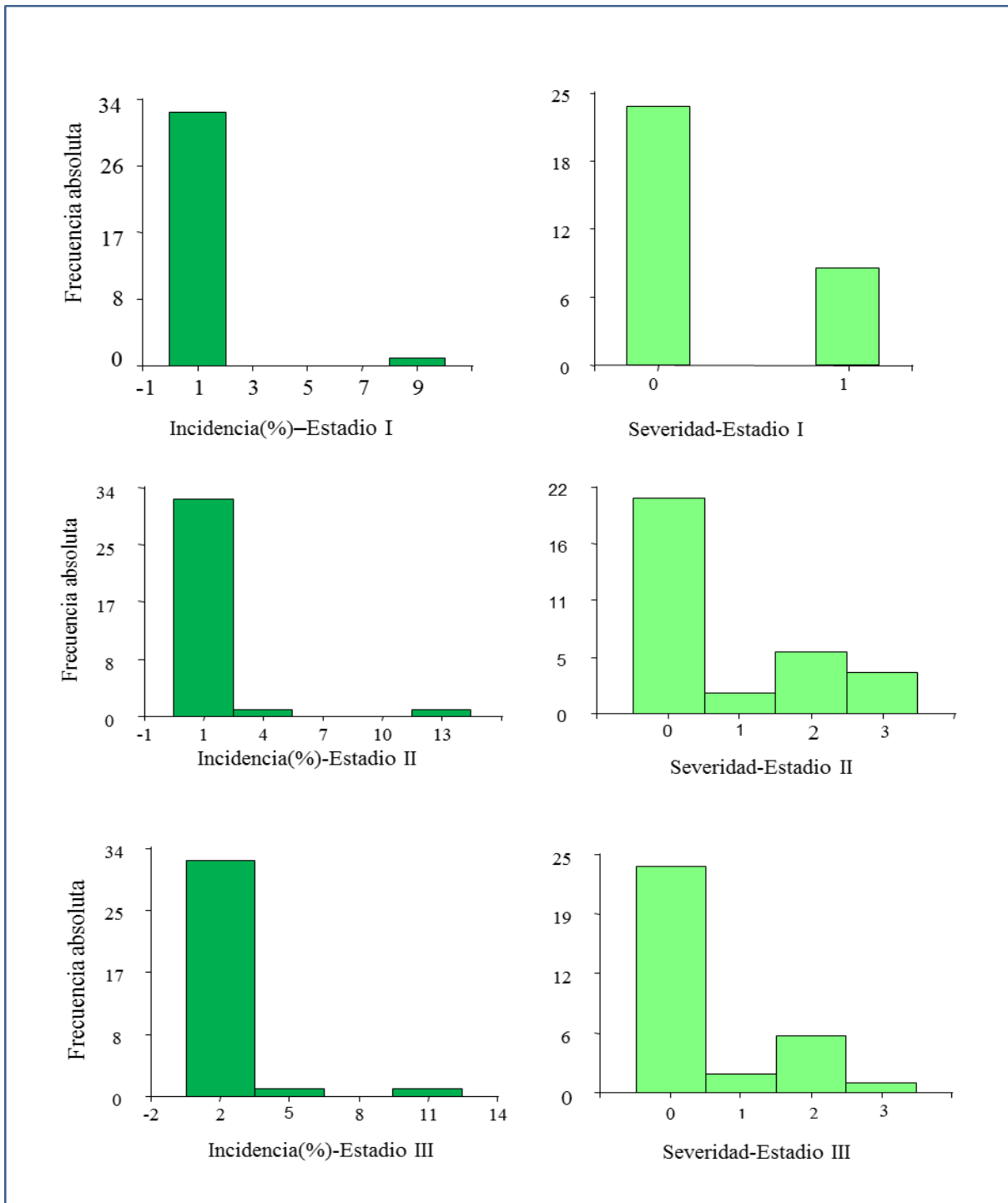


Figura 2.5. Histogramas de frecuencia absoluta según el Estadio fenológico (I, II y III) del cultivo para las variables incidencia y severidad, para la provincia de Salta, campaña 2013-14. DDT: días después del trasplante.

En la campaña agrícola 2014-15, se relevó un total de 15 lotes en la provincia de Salta. Para el primer estadio fenológico el 19% de los lotes presentaron niveles de incidencia entre 1-10%, mientras que el 81% no manifestó la presencia de la enfermedad. El 31% de los lotes exhibió niveles de 1-10% entre los 50-65 días después del trasplante. Finalmente entre los 90-115 días después del trasplante se registró 37 % de los lotes con niveles de incidencia entre 1-10%. En el caso de la severidad, el 19% presentó grado 1 en la escala para el primer estadio de muestreo. El 31% de los lotes manifestó una severidad de 2 para el segundo estadio de muestreo. Finalmente en el último estadio se observó una severidad de 37% entre 2 y 3 (Tabla 2.2 y Figura 2.6).

Tabla 2.2. Estadísticos descriptivos para las variables de incidencia y severidad evaluados en los tres Estadios de cultivo en la provincia de Salta, campaña 2014-15.

Estadio fenológico	Intensidad de la enfermedad							
	Media	D.E.	Var(n-1)	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis	
Estadio I	Incidencia	0,2	0,41	0,17	0	1	1,67	0,25
	Severidad	0,2	0,41	0,17	0	1	1,67	0,25
Estadio II	Incidencia	0,4	0,63	0,4	0	2	1,41	0,51
	Severidad	0,67	0,98	0,95	0	2	0,79	-1,5
Estadio III	Incidencia	1,07	1,71	2,92	0	6	1,96	2,55
	Severidad	1,07	1,39	1,92	0	3	0,61	-1,57

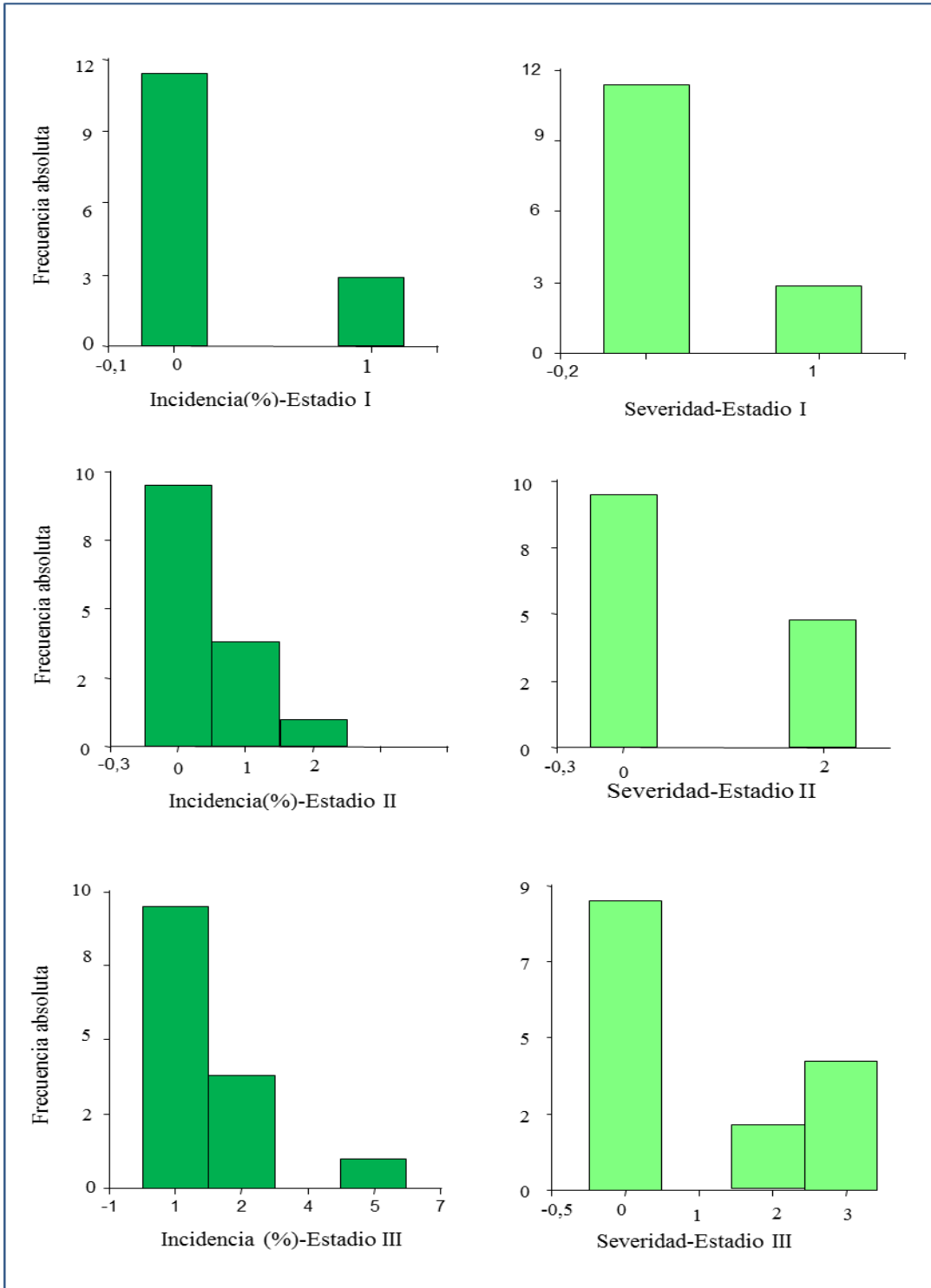


Figura 2.6. Histogramas de frecuencia absoluta según el Estadio fenológico (I, II y III) del cultivo para las variables incidencia y severidad, para la provincia de Salta, campaña 2014-15.

A su vez, se tuvo en cuenta el coeficiente de variación (C.V) que es el cociente entre el desvío estándar y la media, representando una medida adimensional de la dispersión relativa a la media. En los tres estadios el CV no fue superior a 200 por lo tanto efectos causados por los valores extremos de los datos son tolerables, manifestando que el comportamiento de las variables evaluadas no fue demasiado homogéneo.

Dinámica de la incidencia y severidad de *Fusarium* spp. en base al estadio fenológico del cultivo en la provincia de Jujuy.

En la campaña agrícola 2013-14 se relevaron 40 lotes en el departamento El Carmen y Palpalá, donde el 17,5% de los lotes presentó niveles de incidencia entre 1-10%, mientras que el 82,5% no manifestó la presencia de la enfermedad en el primer Estadio fenológico. El 27,5% de los lotes exhibió niveles de 1-10% entre los 50-65 días después del trasplante. Finalmente entre los 90-115 días después del trasplante se registró 45% de los lotes con niveles de incidencia entre 1-10%. Para el caso de la severidad, el 71% presentó de lotes donde se registró la enfermedad presentó grado 1 y 29% grado 2 de la escala para el primer Estadio de muestreo. El 36% de los lotes manifestó una severidad de 1 y de 63,63% en grado 2 para el segundo Estadio de muestreo. Finalmente en el último estadio se observó una severidad de 94,5% entre 2 y 3 y 5,5% en grado 1 (Tabla 2.3 y Figura 2.7).

Tabla 2.3. Estadísticos descriptivos para las variables de incidencia y severidad evaluados en los tres Estadios de cultivo en la provincia de Jujuy, campaña 2013-14.

Estadio fenológico	Intensidad de la enfermedad	Media	D.E.	Var(n-1)	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis
Estadio I	Incidencia	0,23	0,53	0,28	0	2	2,38	4,22
	Severidad	0,2	0,52	0,27	0	2	2,63	5,39
Estadio II	Incidencia	0,38	0,63	0,39	0	2	1,48	0,87
	Severidad	0,45	0,78	0,61	0	2	1,36	-0,06
Estadio III	Incidencia	0,78	0,95	0,9	0	3	0,67	-1,13
	Severidad	1,13	1,32	1,75	0	3	0,46	-1,61

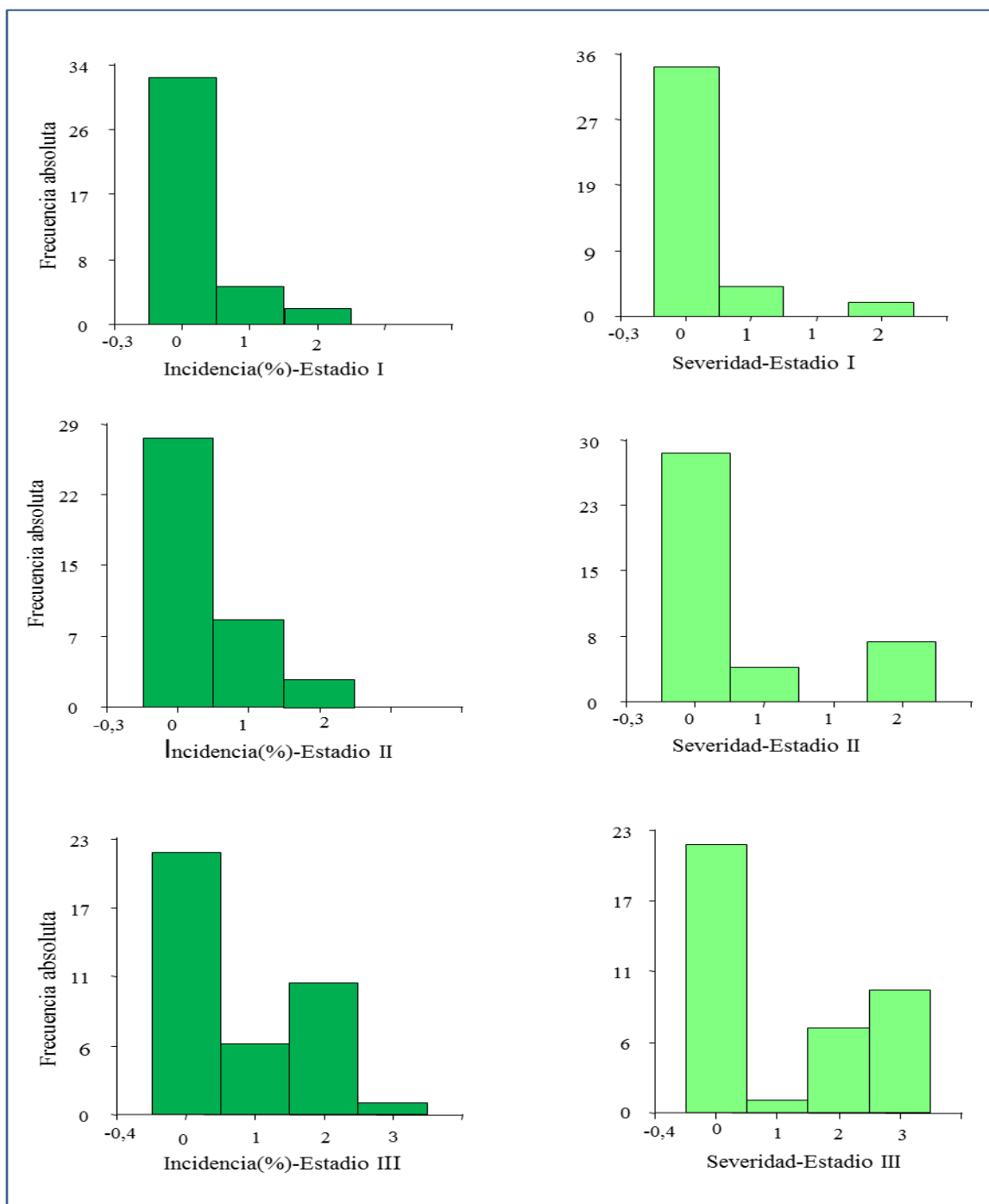


Figura 2.7. Histogramas de frecuencia absoluta según el Estadio fenológico (I, II y III) del cultivo para las variables incidencia y severidad, para la provincia de Jujuy, campaña 2013-14.

En la campaña agrícola 2014-15, se realizó solo un muestreo comprendido en el tercer Estadio donde el 42,87% de los lotes exhibieron una incidencia entre 1-10%. Correspondiendo a una severidad de 44,7% en grado 3, 33,3% en grado 2 y 2% en grado 1 (Figura 2.8).

Tabla 2.4. Estadísticos descriptivos para las variables de incidencia y severidad evaluados en el tercer Estadio fenológico del cultivo en la provincia de Jujuy, campaña 2014-15.

Estadio fenológico	Intensidad de la enfermedad	Media	D.E.	Var(n-1)	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis
Estadio III	Incidencia	0,62	0,86	0,75	0	3	1,39	0,88
	Severidad	0,95	1,24	1,55	0	3	0,79	-1,16

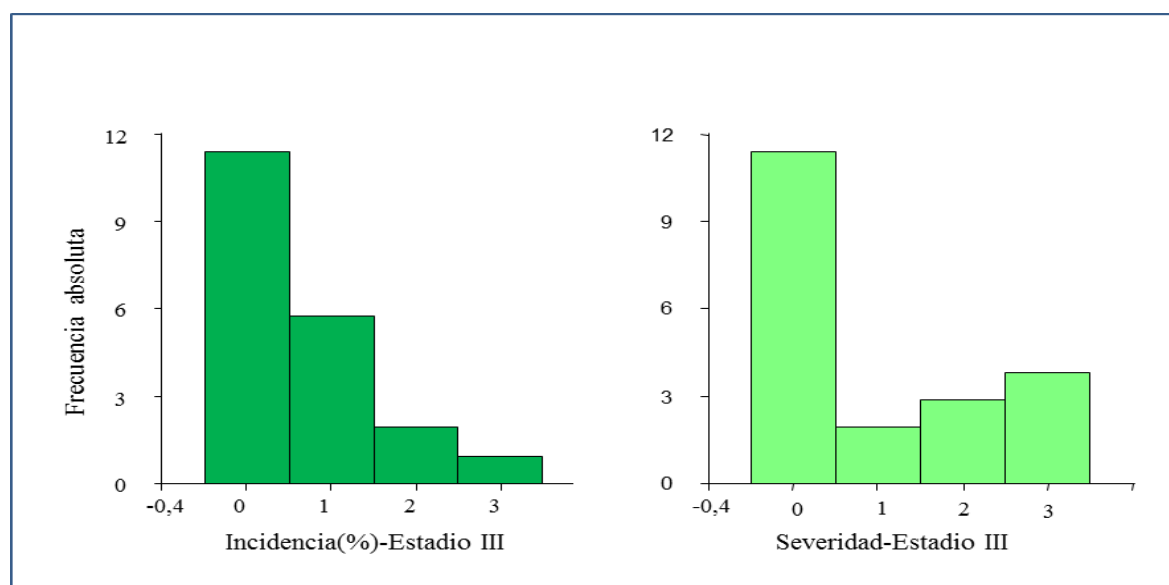


Figura 2.8. Histogramas de frecuencia absoluta según el Estadio fenológico del cultivo para las variables incidencia y severidad, para la provincia de Jujuy, campaña 2014-15.

Prevalencia del marchitamiento vascular y podredumbre radicular por provincias y por departamento.

Provincia de Salta

En la campaña 2013-14, el departamento Cerrillos fue el que presentó una mayor prevalencia (63%), mientras que para la siguiente campaña solo registró una prevalencia de 25%. Rosario de Lerma y La Caldera registraron un aumento en la campaña 2014-15 con respecto a la anterior, a su vez el departamento Chicoana presentó 0% de prevalencia para ambas campañas (Figura 2.9).

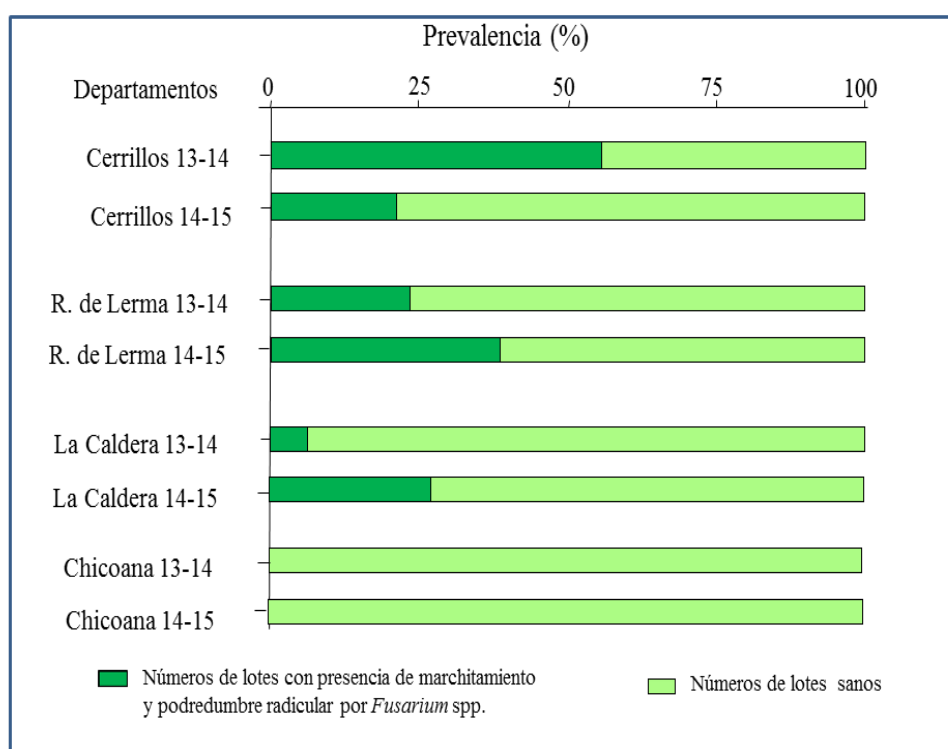


Figura 2.9. Porcentaje de prevalencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular por departamento para la provincia de Salta según la campaña.

Provincia de Jujuy

En ambas campañas el departamento El Carmen presentó valores de porcentaje de prevalencia más elevados que el departamento de Palpalá. Este último, registró un aumento en la prevalencia en la última campaña de relevamiento (Figura 2.10).

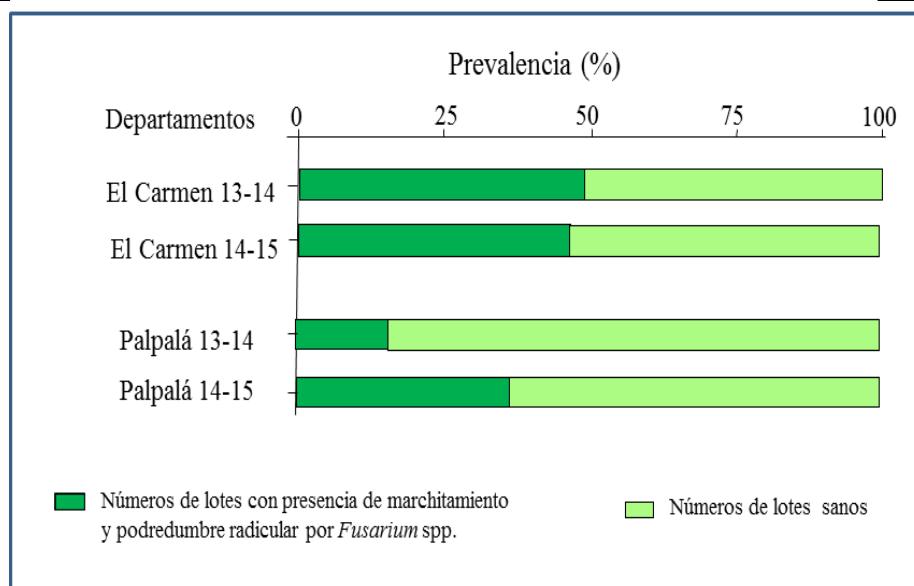


Figura 2.10. Porcentaje de prevalencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular por departamento para la provincia de Jujuy para ambas campañas.

Prevalencia por provincia según el complejo por campaña agrícola.

Para las provincias de Salta y Jujuy se encontró una mayor prevalencia del complejo *F. o.* en ambas campañas agrícolas (Tabla 2.5). Sin embargo la provincia de Salta registró una mayor prevalencia de complejo *F. s.* para ambas campañas (27%-20%) en relación a la provincia de Jujuy, que registró un porcentaje inferior (12%-9%).

Tabla 2.5. Prevalencia de la cantidad de plantas bajo condición de marchitamiento vascular o podredumbre radicular según la campaña agrícola y provincia.

Porcentaje de Prevalencia	Complejo <i>F. o.</i>	Complejo <i>F. s.</i>
Salta		
Campaña 2013-14	45	27
Campaña 2013-14	33	20
Jujuy		
Campaña 2013-14	40	12
Campaña 2013-14	28	9

En el análisis de la varianza no paramétrico de Friedman, se observó para la provincia de Salta diferencias significativas ($p < 0,05$) en relación a cantidad de plantas bajo condición de

marchitamiento vascular con respecto a podredumbre radicular para la campaña 2013-14, mientras que para la segunda campaña de relevamiento no hubo diferencias significativas. Para la provincia de Jujuy se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos complejos solo para la campaña 2013-14, mientras que para la campaña 2014-15 no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en la provincia de Salta del total de plantas donde se detectó la presencia de *Fusarium* spp. el 62,5% (campaña 2013-14) y el 60% (campaña 2014-15) correspondió a plantas que se asociaron con síntomas de marchitamiento vascular. Mientras que para podredumbre radicular en la campaña 2013-14 se registró el 37,5% y para la campaña 2014-15 el 40%. En la provincia de Jujuy se registró el 76% (campaña 2013-14) y el 74% (campaña 2014-15) de plantas con marchitamiento vascular. Para podredumbre radicular se observó el 24% y 26% correspondientes a ambas campañas de muestreo.

Asociación entre intensidad del marchitamiento vascular y podredumbre radicular por los complejos *F. o.* y *F. s.* y las variables agronómicas.

Análisis de asociación de la enfermedad con el tipo de almácigo

Provincia de Salta

En la campaña agrícola 2013-14, de los 18 lotes correspondientes a almácigos convencionales en el 72,22% se manifestó la presencia de ambas patologías, confirmando su presencia en laboratorio. En 15 lotes provenientes de almácigos flotantes se manifestó la enfermedad sólo en el 33,33%. Se encontró una asociación significativa ($p < 0,05$) entre el tipo de almácigo y la presencia de *Fusarium* spp. En la campaña agrícola 2014-15, de los 7 lotes relevados se observó que el 71,42% procedente de almácigos convencionales presentó estas patologías mientras que, en los 8 lotes relevados correspondiente a almácigos flotantes el 50% de ellos manifestó la presencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular por *Fusarium* spp. (Figura 2.11). En esta campaña no se encontró asociación entre la incidencia de la enfermedad y el tipo de almácigo.

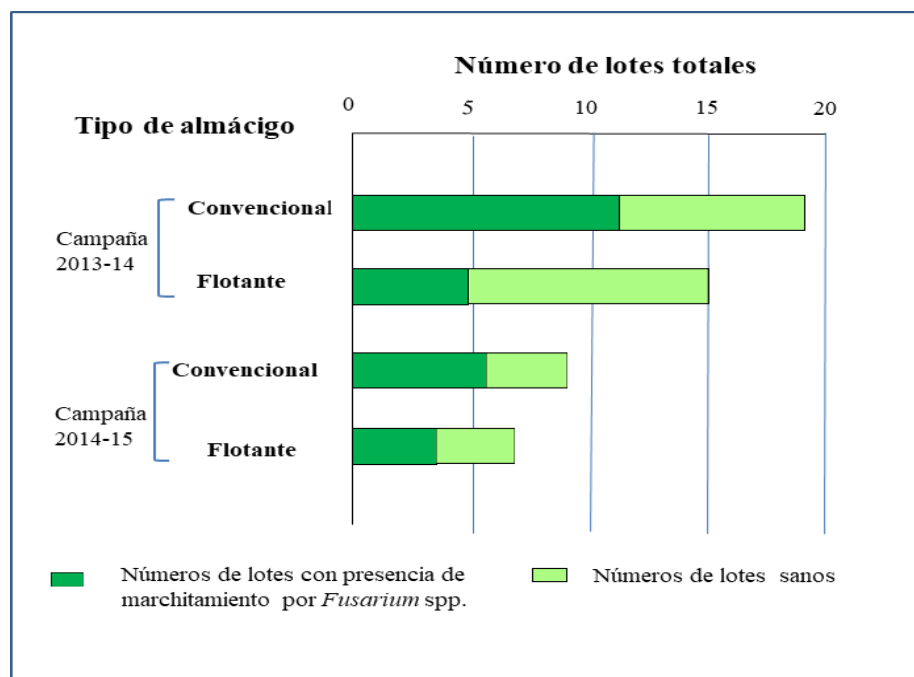


Figura 2.11. Presencia del marchitamiento vascular y podredumbre radicular por *Fusarium* spp. según el tipo de almácigo en las campañas 2013-14 y 2014-15 para la provincia de Salta.

Provincia de Jujuy

En la campaña agrícola 2013-14, de los 38 lotes provenientes de almácigos convencionales sólo en 15 se presentaron plantas sintomáticas, correspondiendo al 39,4% de los lotes relevados. De los 40 lotes relevados en esta provincia sólo dos provenían de almácigos flotantes, obteniendo solamente una muestra que presentó a *Fusarium* spp. En la campaña agrícola 2014-15 se relevó 21 lotes, de los cuales 20 provenían de almácigos convencionales y 1 lote de almácigo flotante. Se registró la presencia de la enfermedad en el 42,8% de los lotes (Figura 2.12). No se encontró asociación significativa entre la incidencia de la enfermedad y el tipo de almácigo en ambas campañas.

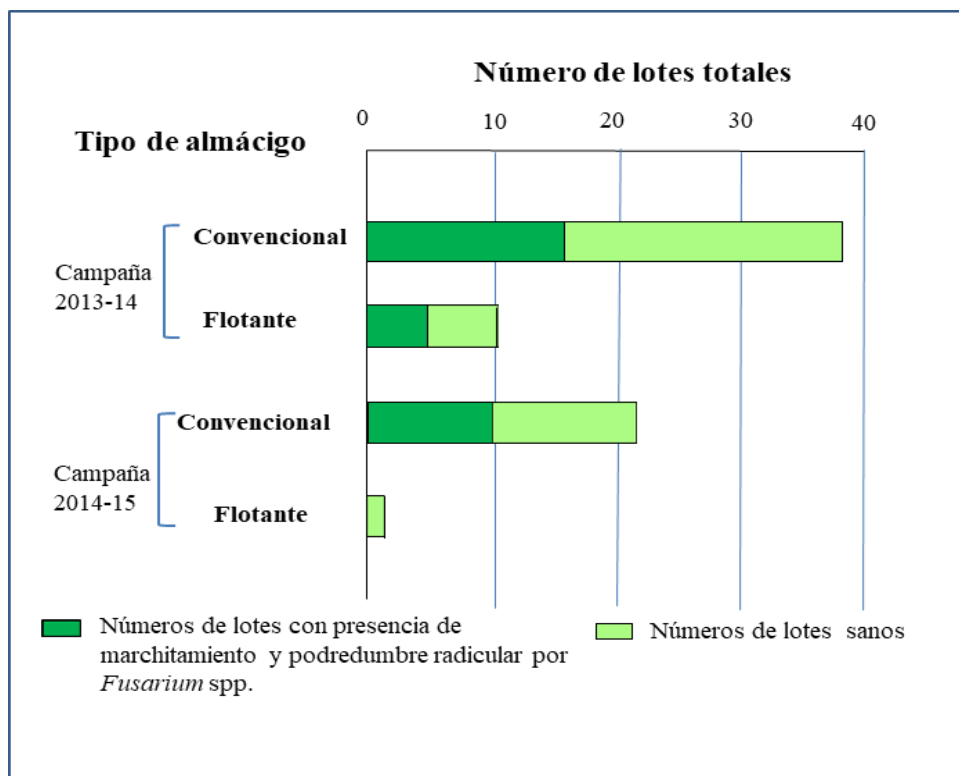


Figura 2.12. Presencia del marchitamiento vascular y podredumbre radicular por *Fusarium* spp. según el tipo de almácigo en las campañas 2013-14 y 2014-15 para la provincia de Jujuy.

Asociación entre la enfermedad y variedades cultivadas.

Provincia de Salta

Los lotes relevados en ambas campañas estuvieron implantados con las variedades más utilizadas en la región tabacalera del NOA. Las mismas fueron: K394, K326, MB47, Coker, FV, PVH2291, K399. No se encontró asociación significativa entre la incidencia de la enfermedad y las variedades utilizadas ambas campañas. Sin embargo se observó que las variedades que presentaron mayor susceptibilidad fueron K394 y K326 evidenciando un mayor número de lotes con la presencia de ambas enfermedades (Figura 2.13) mientras que los lotes implantados con la variedad FV, no manifestaron la presencia de las enfermedades estudiadas.

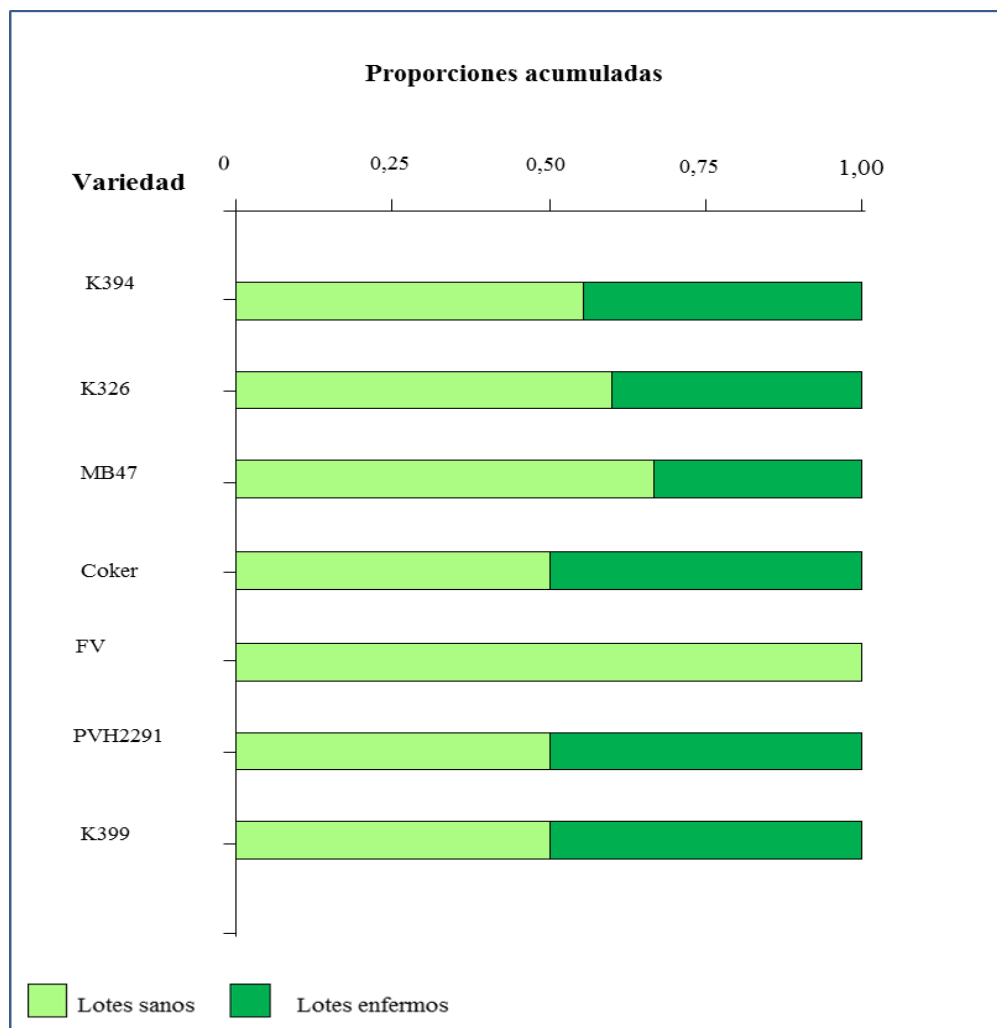


Figura 2.13. Proporciones acumuladas de lotes con presencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular ocasionada por miembros del complejo *F.o.* y *F.s.* según las variedades implantadas para la provincia de Salta.

Provincia de Jujuy

Las variedades presentes en los lotes de los dos departamentos relevados de Jujuy fueron: K394, K394 La Posta, K493, K399, MB37, MB47, L12, PVH2291 (Figura 2.14). De igual manera que en la provincia de Salta, no se manifestó una asociación significativa entre la incidencia la enfermedad y las variedades utilizadas para ambas campañas. A pesar de ello, se observó que la variedad K394

fue la que presentó un mayor número de lotes enfermos en ambas campañas. Mientras que las variedades que no registraron la presencia de la enfermedad fueron PVH2291 y K493.

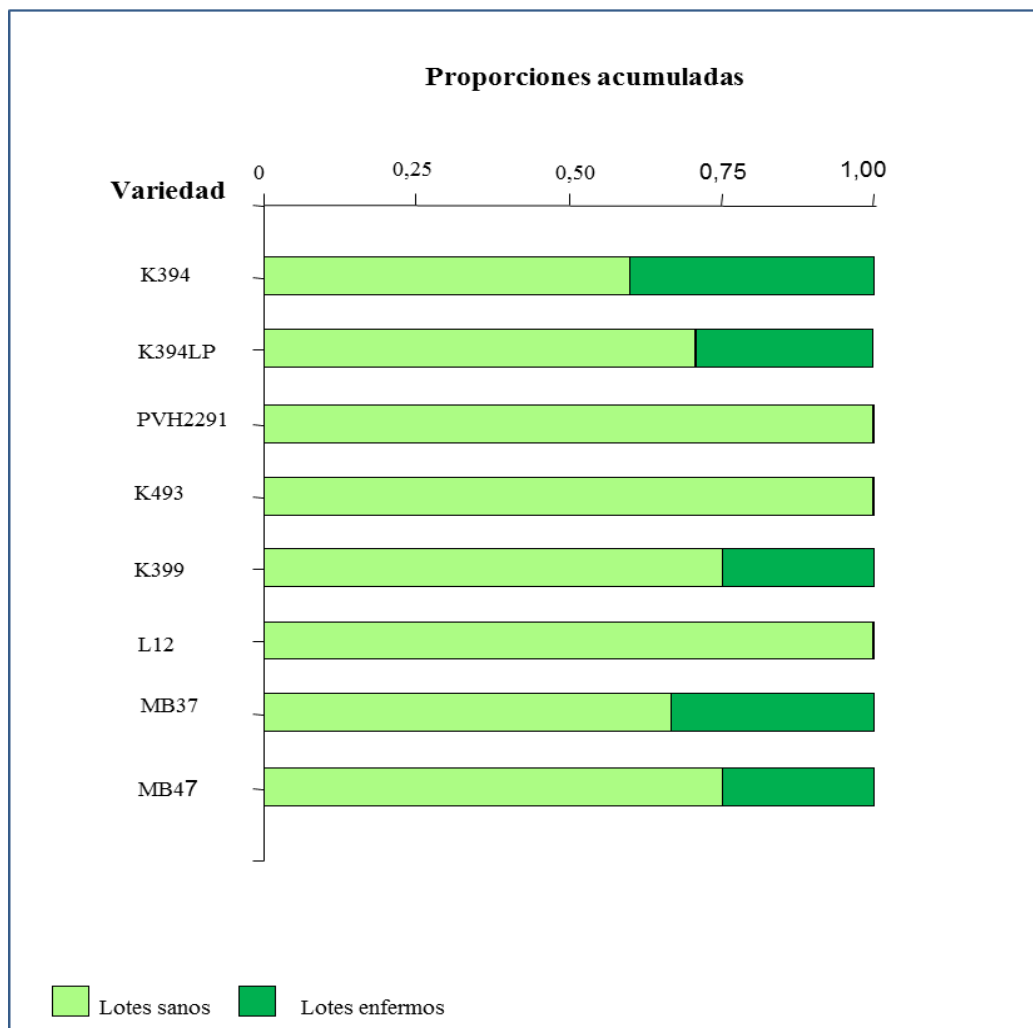


Figura 2.14. Proporciones acumuladas de lotes con presencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular ocasionada por miembros del complejo *F.o.* y *F. s.* según las variedades implantadas para la provincia de Jujuy.

Asociación de la incidencia con la rotación de cultivo

Provincia de Salta

En la campaña 2013-14 y 2014-15 se encontró una asociación significativa ($p < 0,05$) entre los lotes que presentaron rotación de cultivo con los que no y el marchitamiento vascular y podredumbre radicular producida por *Fusarium* spp. (Figura 2.15).

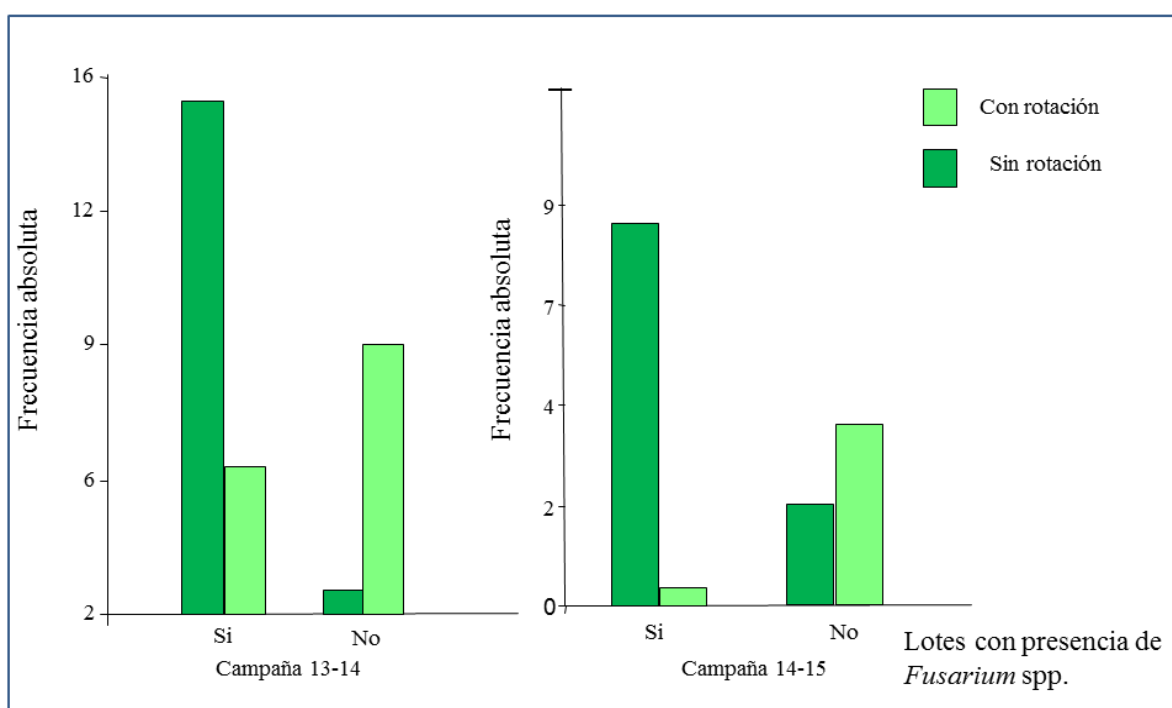


Figura 2.15. Frecuencia de lotes con y sin rotación en relación a la presencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular producida por *Fusarium* spp. para la provincia de Salta.

Provincia de Jujuy

Para ambas campañas no se presentó una asociación significativa entre los lotes bajo rotación de cultivo o sin rotación y la presencia del marchitamiento vascular. En la última campaña de relevamiento el 100% de los lotes no se encontraban bajo rotación de cultivo (Figura 2.16).

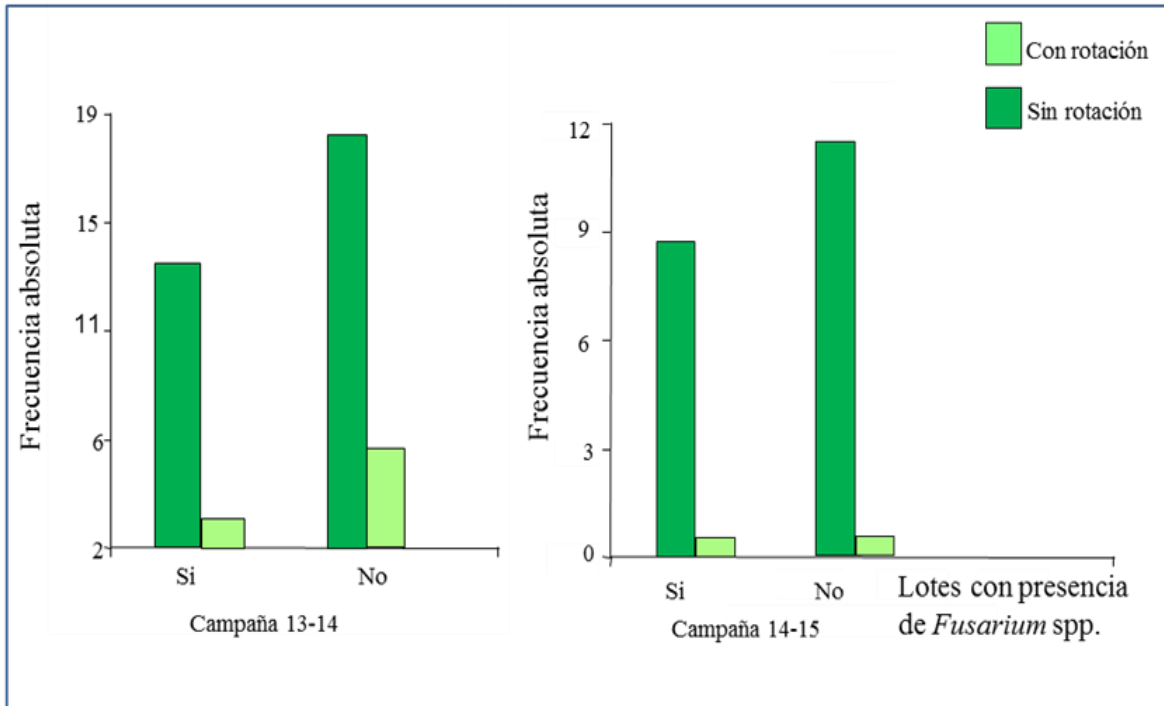


Figura 2.16. Frecuencia de lotes con y sin rotación en relación a la presencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular producida por *Fusarium* spp. para la provincia de Jujuy.

Análisis estadísticos entre intensidad de enfermedad y variables meteorológicas (temperatura media, precipitación, humedad relativa).

Provincia de Salta

Para ambas campañas, en el departamento Cerrillos se determinó correlación positiva y significativa entre incidencia y severidad y las variables meteorológicas únicamente para el tercer estadio fenológico, manifestando una mayor intensidad del marchitamiento y podredumbre radicular por *Fusarium* spp. El resto de los estadios mostró una correlación positiva pero no significativa entre las variables evaluadas (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Correlación entre variables meteorológicas y la intensidad del marchitamiento y la podredumbre radicular producida por *Fusarium* spp. según el estadio fenológico para el departamento Cerrillos. (I: incidencia, S: severidad, T: temperatura media, P: precipitación y HR: humedad relativa).

Cerrillos	Estadio I	Estadio II	Estadio III
	T=15,3-P=5-HR=57	T=22,7-P=117,8-HR=63	T=20,7-P=98,8-HR=78
Campaña 13-14			
I	r=0,66 p=0,002	r=0,43 p=0,0686	r=0,83 p=0,00001
S	r=0,64 p=0,0031	r=0,36 p=0,133	r=0,6 p=0,0006
I	r=0,51 p=0,0266	r=0,56 p=0,0124	r=0,58 p=0,0088
S	r=0,50 p=0,0286	r=0,65 p=0,0028	r=0,4 p=0,0925
I	r=0,67 p=0,0018	r=0,41 p=0,0806	r=0,72 p=0,0005
S	r=0,65 p=0,0015	r=0,28 p=0,2545	r=0,77 p=0,0001
Campaña 14-15			
	T=18,4-P=8-HR=60	T=19,6-P=120-HR=60	T=21,1-P=170,7-HR=80
I	r=0,31 p=0,2685	r=0,64 p=0,00096	r=0,7 p=0,00003
S	r=0,33 p=0,29	r=0,60 p=0,0165	r=0,83 p=0,0001
I	r=0,58 p=0,0232	r=0,89 p=0,0001	r=0,76 p=0,001
S	r=0,58 p=0,032	r=0,83 p=0,00001	r=0,8 p=0,0003
I	r=0,57 p=0,0266	r=0,29 p=0,2945	r=0,8 p=0,0001
S	r=0,57 p=0,0266	r=0,34 p=0,2148	r=0,77 p=0,0001

De igual forma para el departamento Rosario de Lerma se manifestó una correlación positiva y significativa en el tercer estadio fenológico del cultivo. (Tabla 2.7). En el caso del departamento La Caldera y Chicoana no se obtuvieron datos ya que las estaciones meteorológicas no funcionaron durante el periodo evaluado.

Tabla 2.7. Correlación entre variables meteorológicas y la intensidad del marchitamiento y la podredumbre radicular producida por *Fusarium* spp. según el estadio fenológico para el departamento Rosario de Lerma. (I: incidencia, S: severidad, T: temperatura media, P: precipitación, HR: humedad relativa, s.d: sin datos).

Rosario de Lerma	Estadio I	Estadio II	Estadio III
	T=15,02-P= 4,13 HR=49,5	T=20,7-P=64,5-HR=63	T=19,8-P=138,5-HR=78
Campaña 13-14			
I	r=0,21 p=0,5832	r=0,60 p=0,0552	r=0,78 p=0,00001
S	r=0,32 p=0,632	r=0,66 p=0,005	r=0,74 p=0,0001
I	r=0,53 p=0,1434	r=0,61 p=0,0807	r=0,79 p=0,00108
S	r=0,45 p=0,0134	r=0,57 p=0,1055	r=0,75 p=0,00108
I	r=0,63 p=0,0709	r=0,77 p=0,0160	r=0,73 p=0,0260
S	r=0,63 p=0,0709	r=0,74 p=0,022	r=0,75 p=0,003
Campaña 14-15			
	T=16,0-P=9,5-HR=57	T=20,3-P=61,5-HR=63,3	T=21,1-P=170,7-HR=80
I	s.d.	r=0,74 p=0,0182	s.d.
S	s.d.	r=0,78 p=0,038	s.d.
I	s.d.	r=0,64 p=0,1233	s.d.
S	s.d.	r=0,66 p=0,1056	s.d.
I	s.d.	r=0,65 p=0,1	s.d.
S	s.d.	r=0,59 p=0,165	s.d.

Provincia de Jujuy

En el departamento El Carmen se obtuvo una correlación positiva y significativa para los tres Estadios fenológicos entre la temperatura media y la intensidad de la enfermedad. Para el caso de la precipitación se presentó una correlación positiva y significativa para el segundo y tercer estadio fenológico mientras que para que para humedad relativa se correlacionó positivamente para todos

los Estadios fenológicos pero solo fue significativa para el caso de la severidad en el segundo y tercer estadio (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Correlación entre variables meteorológicas y la intensidad del marchitamiento y la podredumbre radicular producida por *Fusarium* spp. según el estadio fenológico para el departamento El Carmen. (I: incidencia, S: severidad, T: temperatura media, P: precipitación y HR: humedad relativa).

	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio III
El Carmen	T=18,8	T=23,3	T=21,3	T=22,5
	P= 7,6	P=51,2	P=100,6	P=106,6
	HR=43	HR=61	HR=72	HR=72
Campaña 13-14				Campaña 14-15
I	r=0,67 p=0,0001	r=0,57 p=0,0001	r=0,75 p=0,00001	r=0,65 p=0,00083
S	r=0,56 p=0,00002	r=0,50 p=0,0001	r=0,70 p=0,0001	r=0,59 p=0,00197
I	r=0,67 p=0,001	r=0,11 p=0,511	r=0,62 p=0,0001	r=0,70 p=0,0004
S	r=0,53 p=0,004	r=0,10 p=0,55	r=0,46 p=0,0025	r=0,78 p=0,0001
I	r=0,25 p=0,1125	r=0,21 p=0,1939	r=0,44 p=0,0049	r=0,53 p=0,0399
S	r=0,19 p=0,229	r=0,13 p=0,4143	r=0,5 p=0,0009	r=0,53 p=0,00423

En cuanto al departamento Palpalá en los dos primeros estadios no se registraron plantas enfermas mientras que en el tercer estadio fenológico se obtuvo una correlación positiva pero no significativa entre la intensidad de la enfermedad y las variables meteorológicas evaluadas (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Correlación entre variables meteorológicas y la intensidad del marchitamiento y la podredumbre radicular producida por *Fusarium* spp. según el estadio fenológico para el departamento Palpalá. . (I: incidencia, S: severidad, T: temperatura media, P: precipitación, HR: humedad relativa, s.d.: sin datos)

Palpalá	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio III
	T=17,3-P= 17.66- HR=54	T=20,47-P=132- HR=74	T=17,3-P=148- HR=79	T=19,5-P=120- HR=79
Campaña 13-14				Campaña 14-15
I	s.d.	s.d.	r=0,65 p=0,11	r=0,65 p=0,1653
S	s.d.	s.d.	r=0,65 p=0,11	r=0,66 p=0,1538
I	s.d.	s.d.	r=0,8 p=0,022	r=0,70 p=0,0004
S	s.d.	s.d.	r=0,79 p=0,016	r=0,78 p=0,0001
I	s.d.	s.d.	r=0,66 p=0,1561	r=0,53 p=0,0399
S	s.d.	s.d.	r=0,67 p=0,1447	r=0,53 p=0,00423

Asociación entre la presencia del marchitamiento vascular y podredumbre radicular con el tipo de suelo.

Provincia de Salta

Los puntos relevados en la provincia de Salta se relacionaron con cuatro tipos de asociaciones. El departamento Cerrillos presentó dos asociaciones de suelo (La Merced y Cerrillos), el departamento La Caldera presentó a la asociación Vaqueros y el departamento Chicoana a la asociación Ampascachi (Figura 2.17). Se observó una asociación significativa ($p < 0,05$) con respecto al marchitamiento vascular y tipo de suelo. Mientras que para la podredumbre radicular la asociación también fue significativa ($p < 0,05$). La asociación La Merced fue la que presentó un mayor número de plantas enfermas de ambos complejos (Tabla A1-Anexo).

Provincia de Jujuy

Dentro de los puntos relevados el departamento El Carmen presentó cuatro asociaciones de suelo (Perico, Monterrico, El Milagro y El Zapallar) mientras que el departamento Palpalá sólo a una asociación (Figura 2.15). Se observó una asociación significativa ($p < 0,05$) con respecto al

Dinámica de la intensidad del marchitamiento vascular y de la podredumbre radicular
marchitamiento vascular y tipo de suelo. Mientras que para la podredumbre radicular no se
manifestó asociación significativa. Los tipos de suelos que presentaron un mayor número de lotes
afectados con ambos complejos fueron Perico y Monterrico, cuyas características más concordantes
son: ligera erosión, contenido de materia orgánica muy bajo y textura media (Tabla A2-Anexo).

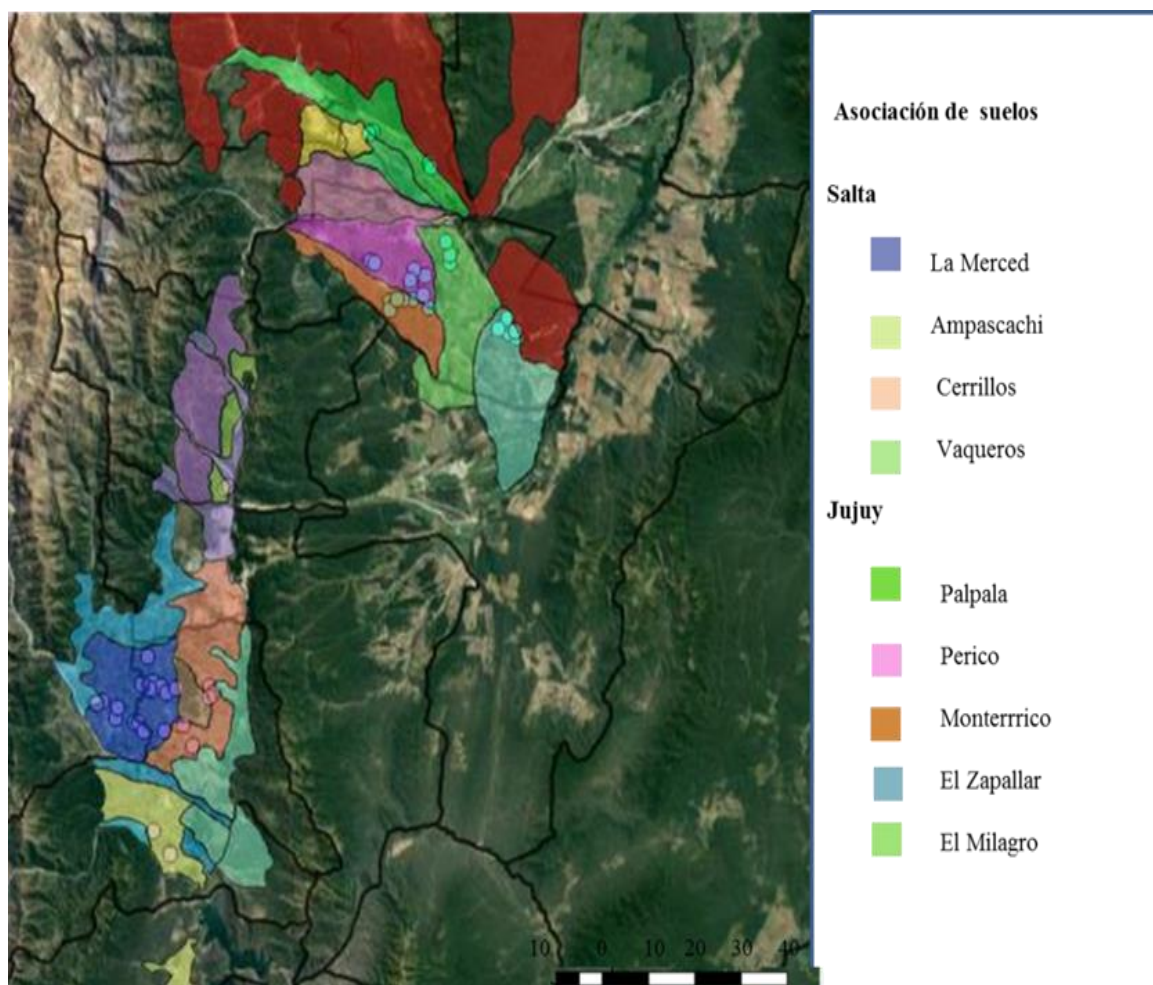


Figura 2.17. Ubicación de los puntos relevados en cada tipo de asociación de suelo para la provincia de Salta y Jujuy.

DISCUSIÓN

El presente capítulo proporciona una descripción cuantitativa de dos patologías producidas por miembros de los complejos *F. o.* y *F. s.*, permitiendo expresar la dinámica del marchitamiento vascular y podredumbre radicular en el transcurso del tiempo y cuantificar su comportamiento a campo y a nivel regional.

El marchitamiento vascular causado por *F. o.* en tabaco ha sido reportado como una enfermedad generalizada en diferentes regiones productoras de tabaco en el mundo ocasionando pérdidas en rendimiento y calidad (Alves Santo *et al.*, 2007; Rodríguez Molina *et al.*, 2013). El complejo *F. o.* en el cultivo de tabaco posee un comportamiento bastante variable manifestando diferentes niveles de patogenicidad y rangos de hospedantes asociados con las formas especiales (LaMondia, 2015).

Dentro del agroecosistema estudiado, en lo relacionado a la estructura sanitaria se pudo establecer el comportamiento del marchitamiento vascular y podredumbre radicular producido por *Fusarium* spp. en función del estadio fenológico. Como se mencionó anteriormente, las especies de *Fusarium* provocan graves daños en el cultivo del tabaco, y además pueden infectarlo en todas las etapas de su desarrollo y no es posible detectar su presencia en estados iniciales, ya que los síntomas aparecen al mes de la infección (Ochoa *et al.*, 2004). Esto además sugiere la existencia de factores edafoclimáticos o de manejo agronómico que pueden favorecer el desarrollo de ambas patologías, siendo mayor la susceptibilidad de las plantas bajo condiciones de estrés (Tu, 1994). En relación a ello, en la provincia de Salta se encontró una mayor intensidad de ambas patologías para el segundo y tercer estadio fenológico del cultivo, siendo el último estadio el que presentó grados de severidad más altos. La dinámica de la intensidad de *Fusarium* spp. registró para la provincia de Jujuy mayores niveles en el tercer estadio, comprendiendo en la mayoría de los casos grados de severidad más altos. A su vez, se encontró una mayor prevalencia del complejo *F. o.* en ambas provincias y campañas agrícolas. En estudios realizados en marchitamiento vascular en lechuga, ocasionado por *F. o. f. sp. lactucae* se observó que la temperatura influye directamente en la severidad de la enfermedad (Scott *et al.*, 2012). Si bien, se estableció que el marchitamiento vascular y la podredumbre radicular en tabaco pueden afectarlo en cualquier estadio fenológico del cultivo (Lucas, 1975; LaMondia, 2015), en ambas patologías se observó una mayor prevalencia en los estadios de desarrollo más avanzado. En el caso del marchitamiento vascular en garbanzo la presencia de síntomas producidos por *F. o. f. sp. ciceris* depende fuertemente de los grados de tolerancia que presenten las variedades empleadas, visualizando los primeros síntomas al mes de producida la infección pero son más severos en la etapa reproductiva (Jiménez Díaz *et al.*, 2015). A través del análisis descriptivo se pudo comprobar que el comportamiento de las variables

incidencia y severidad fue heterogéneo, no manifestándose de igual manera en todos los puntos relevados. Se debe destacar que la intensidad de ambas patologías fue mayor para el segundo y tercer estadio fenológico del cultivo.

En relación a la asociación de las variables agronómicas y ambas patologías se observó una asociación significativa para la provincia de Salta entre el tipo de almácigo y la presencia de *Fusarium* spp. para la campaña 2013-2014. Mientras que para la provincia de Jujuy no se encontró una asociación significativa para el tipo de almácigo, sin embargo se debe considerar que en esta provincia el 95% de los lotes provenían de almácigos convencionales y solo una pequeña proporción a almácigos flotantes. Diversos autores mencionan las ventajas del empleo de sistemas de almácigos flotantes, entre ellas, la reducción de posibles heridas en el sistema radicular en el momento de realizar el trasplante (Thiessen, 2016). Más allá de ello, no hay reportes previos sobre la asociación de ambas patologías con el tipo de almácigo. Sin embargo, en la región del NOA se encontró asociaciones significativas en la presencia de *Rhizoctonia solani* en tabaco y el tipo de almácigo con el que se produjo el plantín (Mercado Cárdenas, 2016).

En lo referido a la asociación entre las variedades implantadas y la presencia de marchitamiento vascular y podredumbre radicular si bien no se encontró una asociación significativa, se observaron variedades más susceptibles a la enfermedad tales como K394 y K326. Esta tendencia se mantuvo para las dos provincias y para las dos campañas productivas. El control más eficaz de las enfermedades ocasionadas por miembros de los complejos *F. o.* y *F. s.* ha sido logrado mediante el desarrollo y el uso generalizado de variedades de tabaco (Lucas, 1975). Existen reportes sobre variedades consideradas resistentes a la infección por *Fusarium*, pero que desarrollaron síntomas de enfermedad a campo bajo muy alto potencial de inóculo en el suelo y condiciones ambientales propicias (LaMondia y Taylor, 1987). Por ello la resistencia o los grados de susceptibilidad que pueda manifestar un hospedante es un factor crítico que determina el desarrollo de una epidemia (Cook y Yarham, 2006). Sin embargo, la provincia de Jujuy cuenta con un mayor número de variedades o materiales genéticos multiplicados localmente que presentaron un comportamiento aparentemente superior frente a estos patógenos.

El uso de rotación de cultivos es una de las prácticas más utilizadas para reducir la densidad de patógenos asociados al marchitamiento vascular y podredumbre radicular y el éxito de la misma va a depender en gran medida de la supervivencia de las clamidosporas en el suelo (Nelson, 1981). La asociación entre rotación o no de cultivo y la presencia de plantas sintomáticas con ambas patologías fue significativa para la provincia de Salta en la campaña 2013-14, que presentó un mayor número en lotes provenientes de rotaciones en años anteriores. En contraste, la

provincia de Jujuy presentó un mayor número de lotes sin rotación y sin presencia de plantas sintomáticas, causa que puede ser atribuida a la utilización de variedades con mayor grado de tolerancia que llegan a manifestar un comportamiento diferencial. La importancia de la rotación con diferentes cultivos para reducir el inóculo potencial del patógeno y la incidencia final de estas enfermedades ha sido reportada en varios agroecosistemas (Saremi *et al.*, 1999; Vargas Gil *et al.*, 2008; Toledo Souza *et al.*, 2012). En condiciones de barbecho se estima que la vida media de *F. o. f. sp. lactucae* en el suelo es de $5,9 \pm 0,7$ meses (Scott *et al.*, 2012), lo que sugiere que el 25% de la población inicial puede permanecer después de un año de que la enfermedad ocurra en un cultivar de lechuga susceptible. Estudios realizados en maní lograron disminuir la incidencia de podredumbre radicular ocasionada por *F. s.* con rotaciones de dos años con maíz / soja (Oddino *et al.*, 2008). Por tal motivo, es de importancia que la rotación de cultivo disponga de un periodo de tiempo considerable y que en ella se contemple el cultivo antecesor, ya que estos patógenos pueden permanecer en el suelo aún en ausencia de un hospedante susceptible (LaMondia, 2015),

Estudios realizados en los complejos *F. o.* y *F. s.* sugieren que las variables climáticas y/o edáficas están asociada con la distribución y dinámica de estos complejos en el perfil del suelo (Nelson, 1981; Belete *et al.*, 2013; Silvestro *et al.*, 2013). Para las variables meteorológicas se encontró una correlación positiva y significativa para la provincia de Salta en el tercer estadio fenológico. Mientras que para Jujuy, el departamento El Carmen presentó una correlación positiva y significativa para los tres estadios fenológicos (Temperatura media y precipitación acumulada). Diferenciándose por presentar temperaturas medias mayores que la provincia de Salta debido a ello, se observó que las temperaturas más elevadas están correlacionadas positivamente con la incidencia y más aun con el aumento en el grado de severidad del marchitamiento vascular. Según Shew y Lucas (1991), la temperatura óptima de crecimiento de *F. o.* es de 28-30 °C pero puede crecer sin impedimentos en un rango más amplio de 18-31 °C donde la intensidad de la enfermedad es mayor durante períodos de altas temperaturas, aproximadamente a 28 °C o más.

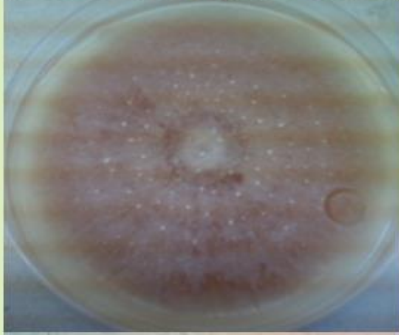
A su vez se encontró que *F. o.* estuvo asociado significativamente al tipo de suelo para ambas provincias. LaMondia (2015) asocia a este complejo con suelos de texturas gruesas y temperaturas superiores a 28 °C. Se ha establecido que *F. o. f. sp. cubense* y *F. o. f. sp. ciceris* son patógenos fuertemente aeróbicos y sus poblaciones pueden reducirse manteniendo el suelo saturado de agua temporalmente. En suelos no estériles a 25% de saturación (capacidad de campo) fue óptima para el crecimiento y sobrevivencia de los mismos (Wang *et al.*, 2004). Mientras que el complejo *F. s.* solo manifestó una asociación significativa para la provincia de Salta. Estudios realizados en *Vicia faba* señalan que la incidencia y severidad de la podredumbre radicular varía en función del tipo de suelo, prácticas de manejo y la temporada de cultivo (Belete *et al.*, 2013).

Diversos factores edafoclimáticos se encuentran relacionados con enfermedades producidas por miembros del complejo *F. s.* como por ejemplo, compactación de los suelos, elevados contenidos de humedad por periodos prolongados y temperatura del suelo. En *Pisum sativum* se encontró que un aumento en la compactación del suelo aumentaba progresivamente incidencia y severidad de la podredumbre radicular (Tu *et al.*, 1994). En estudios realizados sobre *F. s.* afirman que es más dependiente de la disponibilidad de agua en el suelo que de la temperatura (Tu, 1994; Avilés *et al.*, 2003 y Belete *et al.*, 2013).

El presente estudio proporciona descripciones cuantitativas de dos regiones agroecológicas productoras de tabaco tipo Virginia que mantienen su identidad y características propias. Las variables consideradas en este trabajo lograron describir los factores que promueven el desarrollo de ambas patologías producidas por miembros de los complejos *F. o.* y *F. s.*

Conclusión

Las variables meteorológicas y edáficas dadas en la región poseen un efecto directo sobre el progreso del marchitamiento vascular y podredumbre radicular producidas por miembros de los complejo estudiados. A su vez, se encontraron asociaciones significativas entre el tipo de almácigo y la práctica de rotación de cultivo con la presencia de *Fusarium* spp.. Estos resultados nos permitieron aceptar la hipótesis propuesta de que “la prevalencia del marchitamiento vascular y de la podredumbre radicular producida por los miembros de los complejos *F. o.* y *F. s.* está influenciada por las prácticas de manejo del cultivo y condiciones edafoclimáticas”.



CAPÍTULO III

Identificación y análisis de la diversidad genética de los aislamientos de los complejos *F. oxysporum* y *F. solani* empleando caracteres morfológicos, moleculares y patogénicos.

INTRODUCCIÓN

Fusarium es un gran género de hongos filamentosos abundantes en todos los tipos de suelos (Backhouse *et al.*, 2001). Contiene algunos de los patógenos más importantes responsables de graves enfermedades en una variedad de plantas de relevancia agronómica (cultivos industriales, leguminosas, hortícolas, forestales, etc.). También contiene una serie de especies que son productoras de micotoxinas y algunas que son cada vez más reconocidas como patógenos en seres humanos. El género es un complejo grupo polifilético cuya taxonomía siempre ha sido controversial ya que agrupa especies muy diversas con características morfológicas, fisiológicas y ecológicas diferenciables (Summerell *et al.*, 2011).

Como ocurre con muchos hongos fitopatógenos, actualmente la clasificación del género *Fusarium* se basa en tres conceptos para definir una especie: morfológico, biológico y filogenético (Leslie y Summerell, 2006), los cuales fueron descriptos en el capítulo I. Históricamente la morfología ha sido clave para la determinación de una especie, pero actualmente el concepto biológico (Leslie, 1991) y filogenético (O'Donnell *et al.* 1998a, 2000) se han convertido en criterios importantes ya que proporcionan un enfoque diferente y nuevos conocimientos sobre la taxonomía de *Fusarium*. Debido a que una sola especie morfológica puede contener varias especies biológicas o filogenéticas, las cepas de *Fusarium* spp. no pueden identificarse solamente con caracteres morfológicos como único criterio de clasificación. Diversos análisis moleculares y estudios filogenéticos han identificado varios *loci* informativos que resuelven las relaciones entre y dentro de las especies de *Fusarium* (O'Donnell *et al.*, 2004, 2008, 2009). Estos han revelado un alto nivel de diversidad filogenética en varias especies morfológicas dentro de ellas *F. o.* y *F. s.*, donde actualmente son reconocidas como complejos de especies (Zhang *et al.*, 2006b; Laurence *et al.*, 2014).

La diversidad de especies de *Fusarium* depende del cultivo al cual está asociado, de las características fisicoquímicas del suelo, de las condiciones climáticas y de las actividades humanas realizadas en el agroecosistema (Bateman y Murray, 2001; Steinkellner y Langer, 2004). Las cepas patogénicas de los complejos *F. o.* y *F. s.* pueden causar marchitamiento vascular o pudrición de raíces en más de 100 especies vegetales. En su hábita natural se pueden encontrar cepas patogénicas y no patogénicas morfológicamente indistinguibles entre sí (Lievens *et al.*, 2008). Ambos complejos contienen un número considerable de subespecies / *formas especiales*. La determinación de una forma especial, entre dos patógenos que son indistinguibles morfológicamente, se realiza

generalmente probando su patogenicidad en varias especies cultivadas. Estudios previos establecieron que las diferencias en patogenicidad en el complejo *F. o.* son muy importantes ya que podrían involucrar varias *formas especiales* (Clark *et al.*, 1998). El marchitamiento vascular en tabaco se atribuyó a *F. o.* (Schlecht.) Snyd. & Hans. f. sp. *nicotianae* (Johnson 1921). Sin embargo, Armstrong y Armstrong (1968) más tarde lo excluyeron de la lista de *formas especiales* ya que no obtuvieron evidencia de que fueran aislamientos específicos al tabaco. El marchitamiento vascular en tabaco ha sido atribuido a *F. o.* f. sp. *batatas* (Wr.) Snyd. & Hans y a *F. o.* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyd. y Hans (Armstrong y Armstrong, 1968; LaMondia, 1990; Alves Santos *et al.*, 2007; Rodríguez Molina *et al.*, 2013). Sin embargo, Clark *et al.*, (1998) y Tjamos *et al.*, (2006) hacen referencia a que el marchitamiento vascular severo en tabaco es causado por *F. o.* f. sp. *nicotianae* en contraposición con Armstrong y Armstrong (1968). El complejo *F. s.* contiene más de 50 especies filogenéticas, muchas de las cuales pueden ser distintas especies (Nalim *et al.*, 2011). El agente etiológico responsable de varias enfermedades radiculares es *Fusarium solani* (Mart.) Appel. Y Wollenw. Snyd. y Hans. Miembros de complejo *F. s.* fueron recientemente asociados con plantas de tabaco que manifestaron sintomáticas de podredumbre radicular (Chehri *et al.*, 2015).

Determinación de especies morfológicas

Los caracteres morfológicos son comúnmente utilizados para identificar las especies de *Fusarium*. Para una determinación correcta es necesario que las cepas se cultiven bajo condiciones controladas, en medios específicos y que sean cultivos derivados de una sola espora (Leslie y Summerell, 2006). Los caracteres descriptivos de una especie morfológica de tipo macroscópico son: color, pigmentación y crecimiento micelial de las colonias, mientras que los de tipo microscópico son: forma y tamaño de macroconidios (de importancia la forma de células apicales, de pie y número de septos), a su vez la forma y tamaño de microconidios, presencia y disposición de clamidosporas, tipo de fiálide y color de esporoquios (Leslie y Summerell, 2006).

Las características morfológicas distintivas de *F. o.* incluyen la producción de microconidios en cabezas falsas cortas, producción de clamidosporas y forma de los macroconidios y los microconidios. Los aislados de *F. o.* son los más difíciles de distinguir que los de *F. s.* ya que la formación de microconidios en este último es en falsas cabezas en monofiálides largas, de forma ovalada y paredes más gruesas (Leslie y Summerell, 2006).

Determinación de especies biológicas

La fertilidad sexual es un parámetro importante cuando se aplica el concepto de especie biológica. Este suele requerir alguna evidencia de fertilidad cruzada antes de que dos cepas se asignen a una misma especie biológica (Leslie y Summerell, 2006).

Las especies de hongos en base a sus estrategias reproductivas pueden ser heterotálicos, homotálicos, o pseudohomotálicos. En la actualidad hay métodos moleculares para determinar el tipo apareamiento, sin necesidad de recurrir a técnicas de fertilización o bien reduciendo los pasos a seguir en un protocolo de determinación. Los individuos homotálicos (auto-fértil) poseen toda la maquinaria genética para iniciar la reproducción sexual, llevar a cabo meiosis y producir una progenie viable. Mientras que los heterotálicos son aquellos que no poseen toda la maquinaria genética para iniciar la reproducción sexual, es decir son auto- estériles (Ramírez, 2014).

A partir del estudio sobre las bases genéticas de los mecanismos que controlan los fenómenos de reproducción sexual en los Ascomycetes, se reveló que la reproducción sexual se encuentra regulada por los productos de los genes que determinan el tipo de apareamiento (*mating type*, MT), que consisten en un locus con dos alelos funcionales, designados como *MAT-1* y *MAT-2* (Yoder *et al.*, 1986; Glass *et al.*, 1990; Kerenyi *et al.*, 2004; Hornok *et al.*, 2007; Keszthelyi *et al.*, 2007). Estos genes determinan la habilidad de dos cepas para fusionar sus núcleos y formar una célula diploide.

Teniendo en cuenta que dos individuos son considerados miembros de una misma especie biológica si entre ellos pueden cruzarse y producir una progenie fértil, el estudio de los genes del tipo de apareamiento (MAT) es importante para determinar las combinaciones compatibles dentro de una especie. El análisis de los alelos MAT es de gran utilidad en estudios sobre la evolución de los Ascomycetes (Poggeler y Kuch, 2001, Barve *et al.*, 2001), incluyendo las formas especiales *F. o.* (Kawabe *et al.*, 2005, 2007), *F. o. f. sp. lycopersici* y *F. o. f. sp. radialis-lycopersici* (Lievens *et al.*, 2009).

Determinación de especies filogenéticas

En la actualidad se emplean diferentes técnicas moleculares para complementar las pruebas de patogenicidad y caracterización morfológica para la identificación de especies de *Fusarium* (Lievens *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2014; Pinaria *et al.*, 2015; Chehri, 2016; Koyyappurath *et al.*, 2016). Los genes codificantes de proteínas, con numerosas porciones intrónicas, se consideran potenciales marcadores en estudios taxonómicos a nivel de especie en hongos, dado que estos

poseen altas tasas de variación en comparación con los marcadores utilizados comúnmente como el ITS y las regiones del ARN ribosomal nuclear (Harrow *et al.*, 2010). Entre los marcadores utilizados en el género *Fusarium* se pueden mencionar: regiones espaciadoras intergénicas del ADN ribosomal (Intergenic Spacer Region: IGS), factor de elongación de la traducción (Elongation Factor 1- α : EF-1 α), segunda subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB2), mtSSU y β -tubulina (TUB), entre otros. Aunque la mayoría de estos genes son útiles para la detección e identificación del género, normalmente no contienen suficiente polimorfismo para distinguir entre especies dentro de complejos de especies de *Fusarium*. Sólo los genes EF-1 α y RPB2, han demostrado un alto grado de concordancia en sus resultados al ser usados de forma individual y conjunta (Jiménez-Gasco y Jiménez-Díaz, 2003; Stenglein *et al.*, 2006).

Entre los *loci* más utilizados se ha demostrado que la secuencia del gen EF-1 α es un poderoso marcador filogenético dentro de *Fusarium*. (O'Donnell *et al.*, 1998), el cual permitió diferenciar especies de *Fusarium* estrechamente relacionadas y revelar el polimorfismo a nivel intraspecífico (O'Donnell *et al.*, 2009; Edel-Hermann *et al.*, 2012). En base al análisis de dichas secuencias, se observó una alta variabilidad genética dentro de los miembros de los complejos *F. o.* y *F. s.* dividiendo las especies en tres clados (Nalim *et al.*, 2011; Chitrampalam y Nelson, 2016). Además, a partir del análisis de secuencias de EF-1 α y RPB2 se describió una nueva especie, *Fusarium paranaense*, causante de la pudrición de la raíz en soja (Costa *et al.*, 2015).

En la Argentina, existen estudios que describen a los complejo *F. o.* y *F. s.* afectando a *Dianthus caryophyllus* L., *Glycine max*, *Citrus limon* y *Latuca sativa* (Lori *et al.*, 2004; Fogliata *et al.*, 2013; Malbrán *et al.*, 2016). Sin embargo, no hay informes sobre la asociación entre estos complejos y el cultivo de tabaco en el NOA. Por ello, es de suma importancia la caracterización genotípica y fenotípica de aislamientos de ambos complejos en asociación con este cultivo para el desarrollo de estrategias de manejo eficientes. Por lo tanto, en este capítulo, se caracterizó los aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de campos de tabaco en el noroeste de la Argentina, en base a características morfológicas, moleculares y de patogenicidad, bajo la hipótesis de que los síntomas de marchitamiento vascular y pudrición de raíz observados en el cultivo de tabaco a campo en la región están asociados con ambos complejos, respectivamente.

Objetivos

1. Identificar los complejos de especies de *Fusarium* spp. asociados con el marchitamiento vascular y pudrición de raíz del tabaco en el noroeste de la Argentina mediante las bases de atributos morfológicos y marcadores moleculares

2. Caracterizar los aislamientos de cada complejo de acuerdo a su agresividad hacia el cultivo de tabaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y obtención de aislamientos

A partir del relevamiento mencionado en el capítulo II, en el que se evaluaron 73 lotes comerciales de tabaco durante dos campañas consecutivas (2013-14, 2014-15) en las provincias de Salta y Jujuy, se tomaron muestras durante todo el ciclo del cultivo, desde almácigos hasta cosecha de aquellas plantas que presentaban síntomas de marchitamiento vascular y pudrición de raíz. Como se mencionó anteriormente, se realizó un muestreo en "W" en cada lote, incluyendo 10 puntos y evaluando 100 plantas por campo. Se obtuvieron 130 aislamientos de *Fusarium* spp. a partir del tallo, tejido de raíz y rizósfera. Los aislamientos de tejidos (base del tallo y de raíz) se cortaron en trozos de 1,5 cm y se realizó la técnica de desinfección superficial. La misma consistió en desinfectar los trozos de tejido con hipoclorito de sodio al 0,5% durante 1 o 2 minutos, luego se colocaron en alcohol 70% por 1 minuto y se lavaron con agua destilada estéril (Figura. 3.1). Posteriormente se colocaron en agar peptona PCNB (PPA) y medio de agar de papa dextrosado al 2% (PDA), acidificado hasta pH 5 con ácido láctico al 10%. Se obtuvieron cultivos puros utilizando el proceso de subcultivo de una sola espora descrito por Leslie y Summerell (2006). Los aislados fueron conservados en suspensión de esporas con glicerol (50%) y leche (7%) en crioviales a -4 °C y en Spezialeller Nährstoffarmer (SNA) a 4 °C. Todos los aislamientos estudiados se encuentran conservados en la colección microbiana del Laboratorio de Sanidad Vegetal del INTA-EEA-Salta, Argentina.

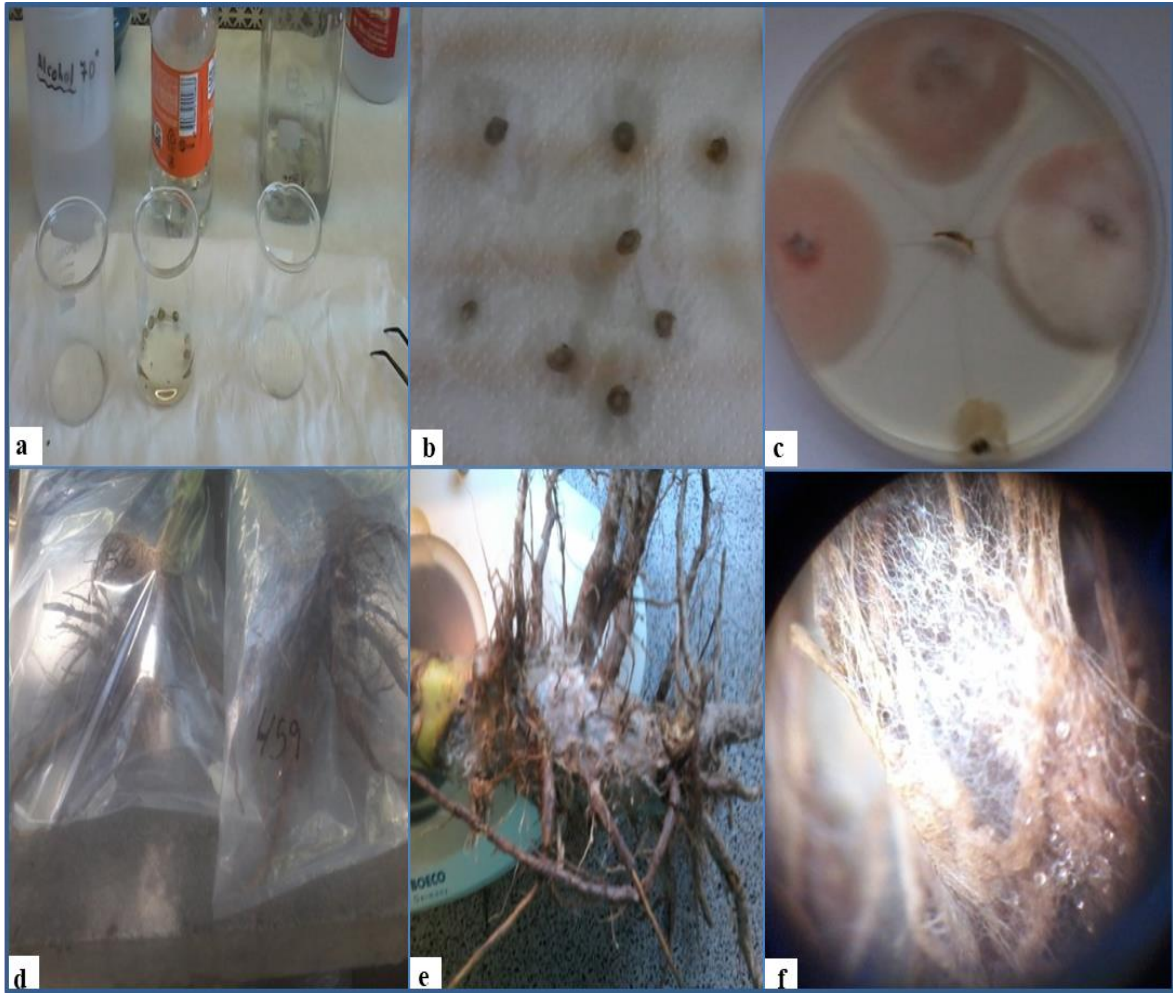


Figura 3.1. a) Técnica de desinfección superficial; b) post desinfección y secado de tejidos; c) crecimiento en APG de *Fusarium* spp.; d) cámara húmeda realizada para la obtención de aislamientos y e y f) crecimiento micelial luego de 24 hs post cámara húmeda.

Determinación de patogenicidad de los aislamientos

Se realizó una prueba de patogenicidad para los 130 aislamientos empleando plantas de tabaco del cultivar K326, susceptible a la mayoría de las enfermedades radiculares, y que fue evaluado en estudios previos (Mercado Cárdenas *et al.*, 2015). Las semillas de tabaco se sembraron en almácigos en sustrato estéril (autoclavado durante 30 minutos a 120 °C). Las plántulas se cultivaron en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 12 h. Cuando alcanzaron cuatro hojas verdaderas, se realizó el trasplante a macetas plásticas con un volumen de 350 cc de sustrato estéril. Se inocularon ocho plantas por aislamiento con la deposición de 1 ml de una suspensión de esporas (1×10^6 Conidias / ml) cerca de la base del tallo. Las plantas se mantuvieron durante 20 días

en cámara de crecimiento bajo las condiciones mencionadas anteriormente (Rodríguez-Molina *et al.*, 2013) (Figura 3.2). Se realizó un ensayo completo al azar con 8 repeticiones de cada tratamiento los cuales fueron las plantas inoculadas con los aislamientos obtenidos y el testigo correspondiendo a plantas no inoculadas.



Figura 3.2. a) Plantines en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas; b) disposición de plantas en cámara de crecimiento previa inoculación; c) inoculación de plantas.

Los datos de severidad se tomaron semanalmente siguiendo una escala de 0-4. Para evaluar los aislamientos del complejo *F. o.*, se utilizó la escala propuesta por LaMondia y Taylor (1987) (0 = plantas sanas, 1 = plantas con escaso desarrollo, 2 = plantas con una hoja sintomática, 3 = plantas con más de una sintomática hoja, 4 = plantas muertas). Para evaluar los aislamientos del complejo *F. s.* se utilizó la siguiente escala de clasificación: 0 = sin lesiones, 1 = lesiones pequeña en raíces, 2 = lesiones de raíz central, 3 = lesiones grandes en la raíz, 4 = planta muerta. Las plantas se cortaron en el tallo para valorar la decoloración vascular, se colocaron en PDA y se incubaron durante 10 días y los aislamientos se re-aislaron y se examinaron morfológicamente.

En base a los datos de severidad se calculó para cada aislamiento un Índice de Severidad (IS) utilizando la fórmula: $(n_1) + (n_2 \times 2) + (n_3 \times 3) + (n_4 \times 4) / n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4$, donde n_0 es el número de plantas de la categoría 0 en la escala de severidad, n_1 es el número de plantas de la categoría 1, n_2 el número de plantas de la categoría 2, n_3 el número de plantas de la categoría 3 y n_4 el número de plantas de la categoría 4 (Fujinaga *et al.*, 2005). Basándose en el IS, los aislamientos se clasificaron en tres categorías de patogenicidad: altamente patogénicos ($IS \geq 2,5$), moderadamente patogénicos ($2,5 > IS > 1,5$) y ligeramente patogénicos ($IS \leq 1,5$).

Caracterización morfológica de los aislamientos

Los 130 aislamientos obtenidos fueron evaluados en cuanto a la pigmentación y el crecimiento micelial (cm). Para ello, se cultivaron en placas de PDA bajo un ciclo alterno de 12 h de luz / 12 h de oscuridad a 25 ± 2 °C durante 10 días. Después de tres días de incubación se midió el diámetro de las colonias para cada aislamiento (tres repeticiones) (Leslie y Summerell 2006). Las características morfológicas de los aislamientos se describieron basándose en observaciones macro y microscópicas. Para las observaciones microscópicas (características conidiales, células conidiogénicas y esporodooquios), todos los aislamientos se transfirieron a placas con medio agar hoja de clavel (CLA) y SNA y se cultivaron bajo un ciclo alterno de 12 h de luz / 12 h de oscuridad a 25 ± 2 °C durante dos semanas. Se midieron quince conidios seleccionados aleatoriamente de cada clase de septación (macro-microconidios). La caracterización morfológica se realizó con base en las descripciones de Leslie y Summerell (2006) y Koyyappurath *et al.*, (2016) para *F. o.* y descripciones de Nalim *et al.*, (2011) y Chehri *et al.*, (2015) sin la observación de estructuras sexuales para *F. s.*

Extracción del ADN por CTAB

Los cultivos monospóricos de los 71 aislamientos que resultaron patógenos para tabaco se colocaron en 50 ml de medio completo (CM) (Leslie y Summerell, 2006) y se incubaron durante 3 días en un agitador rotatorio (100 rpm) a 25°C. Los micelios se recogieron por filtración y se almacenaron a -20 °C. La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de CTAB (Cetil-trimetil-bromuro de amonio) descrito por Doyle y Doyle (1990), modificado. Los filtrados se colocaron en morteros estériles (250 mg), en los cuales por muestra se adicionó 700 µl de buffer (100 mM Tris-HCl + 20 mM EDTA + 1.4 M NaCl + 0.2% de β-mercaptoetanol) y 200 µl de CTAB 10%. Las muestras se molieron y el producto se transfirió a microtubos de 1,5 ml que se llevaron a freezer a -20 °C durante 20 minutos y luego se incubaron a 65 °C durante 10 min. Se agregó a cada muestra 250 µl de acetato de potasio (5M) y se agitó brevemente, para luego incubarlo en hielo durante 20 min. Seguidamente se retiraron los microtubos del hielo y se centrifugaron 30 min a 4 °C a 10.000 rpm. 500 µl del sobrenadante se transfirieron a nuevos microtubos de 1,5 ml a los cuales se les agregó 500 µl de isopropanol y se mezcló suavemente para precipitar los ácidos nucleicos. Luego se centrifugaron 15 min a 10000 rpm a T° ambiente y se descartó el pellet. El mismo fue lavado con 250 µl de etanol 70% y los tubos se centrifugaron 10 min a 10000 rpm a temperatura ambiente. Se repitió el lavado y se volvió a centrifugar 15 min a 10000 rpm a temperatura ambiente y posteriormente se dejó secar por aproximadamente 20 min. Finalmente se resuspendió el pellet en 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8 + 1 mM EDTA pH 8) y se guardó en freezer a -20 °C.

Reacciones de amplificación mediante PCR

La amplificación del gen EF-1α se realizó con los cebadores EF-1H y EF-2T (O'Donnell *et al.*, 2000) (Figura 3.3, Tabla 3.2). En cada reacción de PCR se realizó en una mezcla de 50 µl que contenía 20-30 ng de ADN genómico, 100 mM de cada dNTP, tampón de PCR 10X (Tris-HCl 100 mM [pH 9,0], KCl 500 mM, Triton X-100 al 1%), 25 mM Cl₂Mg, 100 nM de cada cebador (Genbiotech SRL, Argentina) y 0,8 U de *Taq* ADN polimerasa (Inbio, Tandil, Argentina). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburgo, Alemania) programado con un paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 45 s y con una extensión final a 72 °C durante 2 min. Las amplificaciones fueron visualizadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Los fragmentos se purificaron con el kit QIAquick®PCR (Qiagen) y fueron secuenciados en ambas direcciones utilizando un secuenciador de análisis 3500xLGenetic (Applied

Biosystems, Fost Er City, CA, USA) en el Instituto de Biotecnología de INTA Castelar (Buenos Aires, Argentina). Los fragmentos secuenciados fueron alineados usando Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), incluyéndose para el análisis secuencias adicionales disponibles en la base de datos de secuencias genéticas GenBank en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

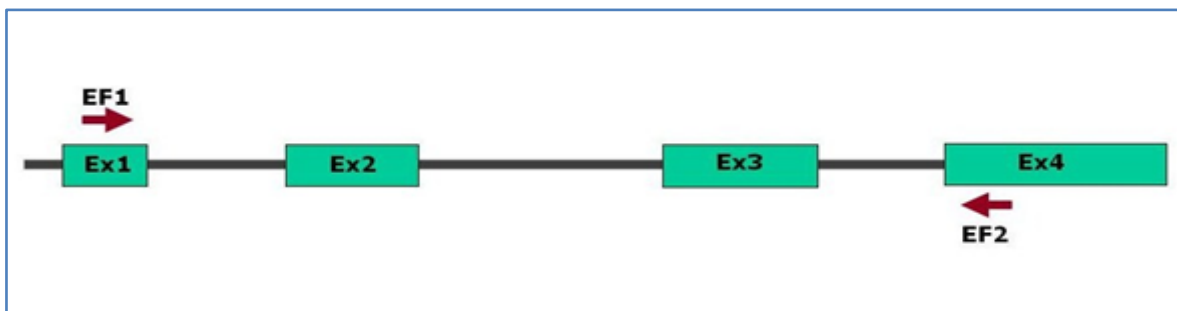


Figura 3.3. Esquema de la secuencia parcial del gen del factor de elongación (EF-1 α) en *Fusarium*. Adaptado O'Donnell *et al.*, (1998). (Ex: exón, EF1: primer forward EF-1H, EF2: primer reverse EF-2T).

La determinación del tipo de apareamiento de las cepas obtenidas (homotálico o heterotálico), se realizó a partir del análisis del *loci* MAT mediante amplificación por PCR, utilizando los cebadores FMAT1-2p1, FoMAT1-2p2, FMATp1, FoMAT2p2, FoMAT2p10, FMATp2 (Tabla 3.1), según lo descrito por Arie *et al.* (2000). En cada reacción de PCR se realizó una mezcla de 25 μ l conteniendo 20-30 ng de ADN genómico, 100 mM de cada dNTP, tampón de PCR 10X (Tris-HCl 100 mM [pH 9,0], KCl 500 mM, Triton X-100 al 1%), 25 mM Cl_2Mg , 100 nM de cada cebador (Genbiotech SRL, Argentina) y 0,4 U de *Taq* ADN polimerasa (Inbio, Tandil, Argentina). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Eppendorf Master Cycler Gradient, Hamburgo, Alemania) programado con un paso de desnaturalización inicial a 94 $^{\circ}C$ durante 1 min, 35 ciclos a 94 $^{\circ}C$ durante 30 s, 65 $^{\circ}C$ durante 45 s y 72 $^{\circ}C$ durante 30 s, con una extensión final a 72 $^{\circ}C$ durante 5 min. Las amplificaciones fueron visualizadas en gel de electroforesis según lo descrito anteriormente.

Tabla 3.1. Cebadores utilizados en la amplificación del EF-1 α y genes MAT.

Código de la secuencia	Secuencia (5'-3') ^a	Denominación	pb ^b	Referencia
EF-1H	ATGGGTAAGGAAGACAAGAC	EF-1 α	700	O'Donnell <i>et al.</i> (2000)
EF-2T	GGAAGTACCAGTGATCATGTT			
FoMAT1-2p1	CGTTTGTCTGCTGAGGATTATGCT	MAT1-1	800	Arie <i>et al.</i> (2000)
FoMAT1-2p2	GTTGAGCCTTGATCGACTGGTGAC			
FoMAT2p2	CTACACAACACCCACACTTCTCATCAT	MAT1-2	200	Arie <i>et al.</i> (2000)
FoMAT2p10	GAATAGGGAAATGCAAAAATCTGA			
FMATp1	KACCTAGTGCAACAAGAAACAAAGCGAGTG	MAT1-2	600	Arie <i>et al.</i> (2000)
FMATp2	AACCCTGTGTCCTTTAACSTGAGCAT			

^a K: G o T; ^b pb: pares de bases del fragmento amplificado.

Análisis de los datos

En la determinación de la patogenicidad de los aislamientos, el análisis de datos fue llevado a cabo mediante modelos mixtos lineales generalizados con prueba de comparaciones múltiple (DGC).

Para la diferenciación de morfotipos se realizó el análisis de coordenadas principales (ACoP) aplicando la distancia de Gower sobre la base de 11 caracteres morfológicos. Se agregó un árbol de recorrido mínimo (MST) a partir de la matriz de distancia correspondiente, lo que contribuyó a la interpretación de la similitud entre grupos de aislamientos.

A su vez, se estableció una correlación entre las matrices de distancias fenotípicas y genotípicas utilizando el test de Mantel (Mantel, 1967). Todos los análisis estadísticos fueron realizados empleando el software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2017).

Los alineamientos de secuencias de ADN se realizaron utilizando CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) y se ajustaron manualmente. En el conjunto de datos se incluyeron 709 y 720 nucleótidos para los complejos *F. o.* y *F. s.*, respectivamente. Se utilizó el software J-MODELTEST v.2 (Guindon y Gascuel 2003, Darriba *et al.*, 2012) para inferir el modelo de evolución molecular más apropiado. Posteriormente se procedió a la elaboración de árboles consenso independientes para cada conjunto de secuencias mediante métodos bayesianos. Los análisis filogenéticos bayesianos se realizaron utilizando el algoritmo 'metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo' implementado en el programa MRBAYES versión 3.2.6 (Ronquist y Huelsenbeck 2003; Ronquist *et al.*, 2012), permitiendo observar los nodos que tuvieran una probabilidad posterior de clado $\geq 70\%$.

RESULTADOS

Determinación de la patogenicidad de los aislamientos

Entre los 130 aislamientos obtenidos (Tabla 3.2), el 67% resultaron patogénicos a las plántulas de tabaco (cv. 326). La agresividad de los aislamientos patógenos varió entre aislamientos de ambos complejos. Se utilizó un Índice de Severidad de la enfermedad (IS) de 1 a 4 para agrupar los aislamientos en tres categorías de patogenicidad: altamente patógenos (AP), moderadamente patógenos (MP) y ligeramente patógenos (LP), en forma independiente para cada complejo (Figuras 3.4 y 3.5). Los patógenos fueron re-aislados con éxito del tejido de las plantas sintomáticas, cumpliendo con los postulados de Koch (Figura 3.6.). De los 53 aislamientos patogénicos del complejo *F. o.*, el 81% fueron patógenos al tabaco con diferencias significativas en la patogenicidad (Figura 3.7). El 47% de los aislamientos del complejo *F. o.* fueron AP, el 30% MP y el 17% LP. Por el contrario, de los 74 aislamientos patogénicos del complejo *F. s.*, el 61% resultaron patógenos al tabaco en las condiciones del ensayo, mostrando diferencias significativas en la agresividad entre los aislamientos (Figura 3.8). El 32% de los aislamientos del complejo fueron AP, el 40% MP y el 23% LP. Los aislamientos del complejo *F. o.* resultaron ser más patogénicos que los del complejo *F. s.* observándose índices de severidad más altos.

Tabla 3.2. Número y porcentaje de aislamientos de especies de *Fusarium* obtenidos de plantas que manifestaron síntomas de marchitamiento y podredumbre radicular.

Fuente	Complejo <i>F. o.</i>	Complejo <i>F. s.</i>	Otras Especies	N° total de aislamientos	Porcentaje de aislamientos
Tejido de tallo	25/58*	2/15*	0	27	21%
Tejido de raíz	4/9*	33/73*	3	39	30%
Rizósfera	24/56*	40/89*	0	64	49%
Patogénicos	43	45	0	88	67%
No patogénicos	10	29	3	43	33%
N° total de aislamientos	53	74	3	130	100%

*Número/porcentaje de aislamientos

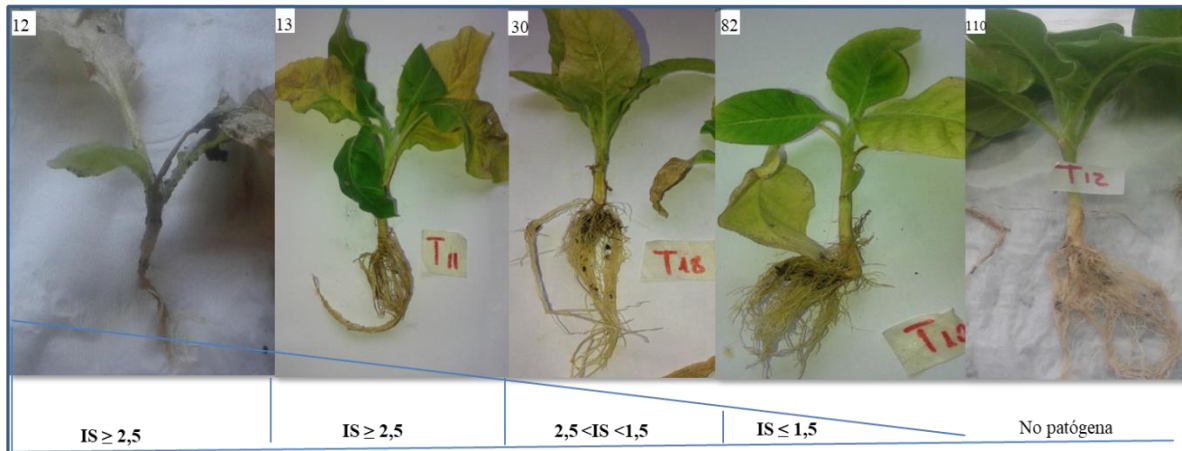


Figura 3.4. Plantas de tabaco en las diferentes escalas de IS para el complejo *F.o.* Números de la parte superior indican la identificación de los aislamientos.

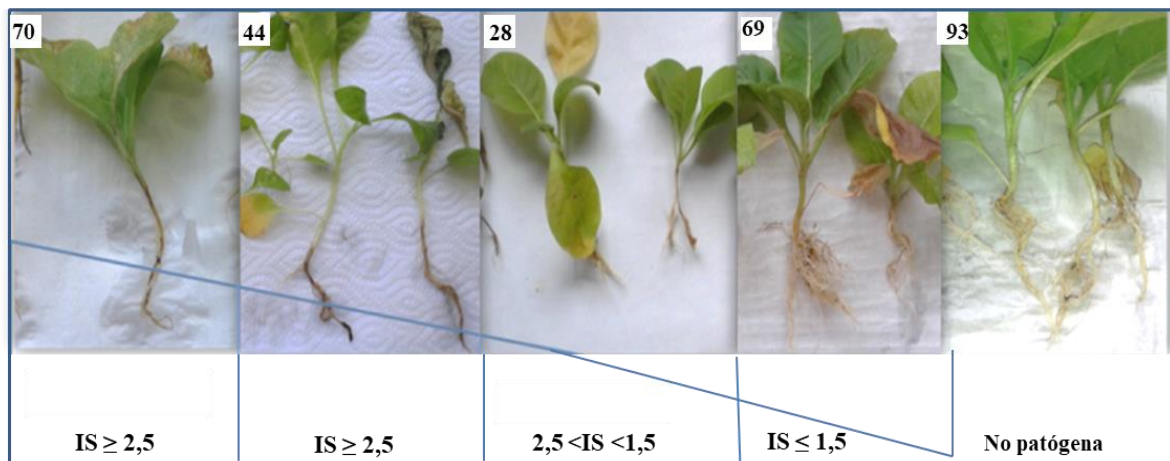


Figura 3.5. Plantas de tabaco en las diferentes escalas de IS para el complejo *F.s.* Números de la parte superior indican la identificación de los aislamientos.

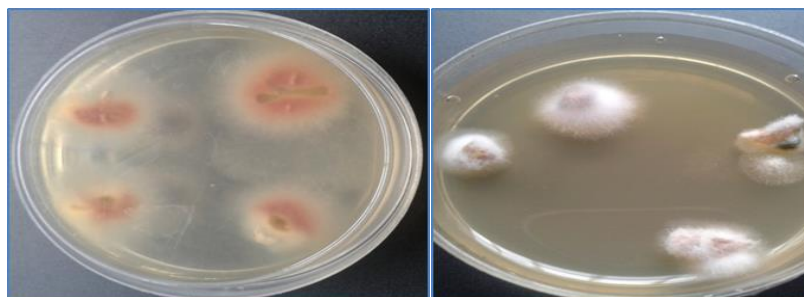


Figura 3.6. Ejemplo del crecimiento observado luego del re-aislamiento de los patógenos, con posterioridad a la prueba de patogenicidad.

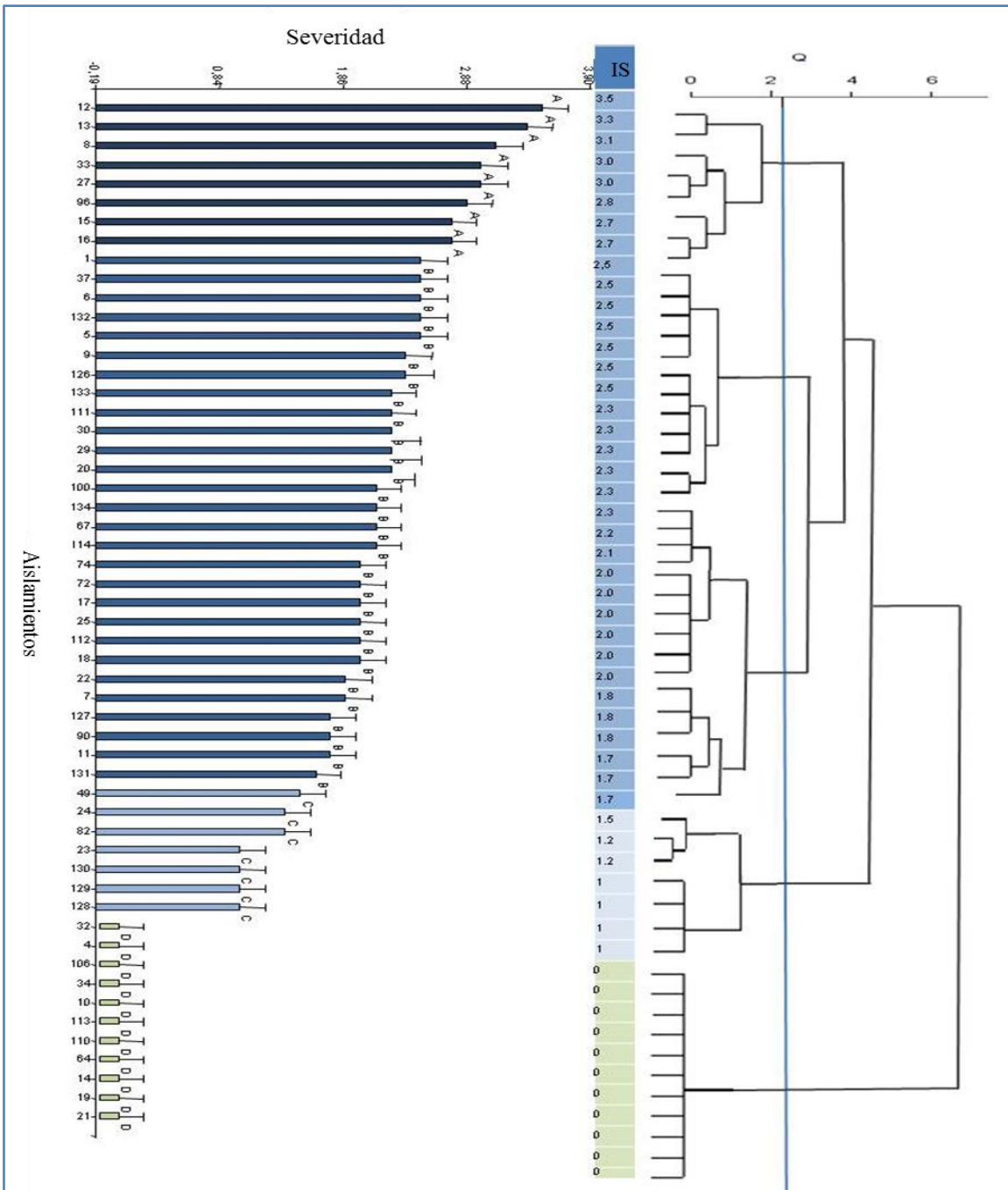


Figura 3.7. a) Gradiente de patogenicidad de 53 aislamientos de *F. o.* en diferentes localidades en las provincias de Salta y Jujuy. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,001$) entre aislamientos; b) Dendrograma generado de acuerdo con el índice de severidad de la enfermedad (IS). En azul se marcan los aislamientos altamente patógenos (AP), en celeste los moderadamente patógenos (MP) y en verde los ligeramente patógenos (LP).

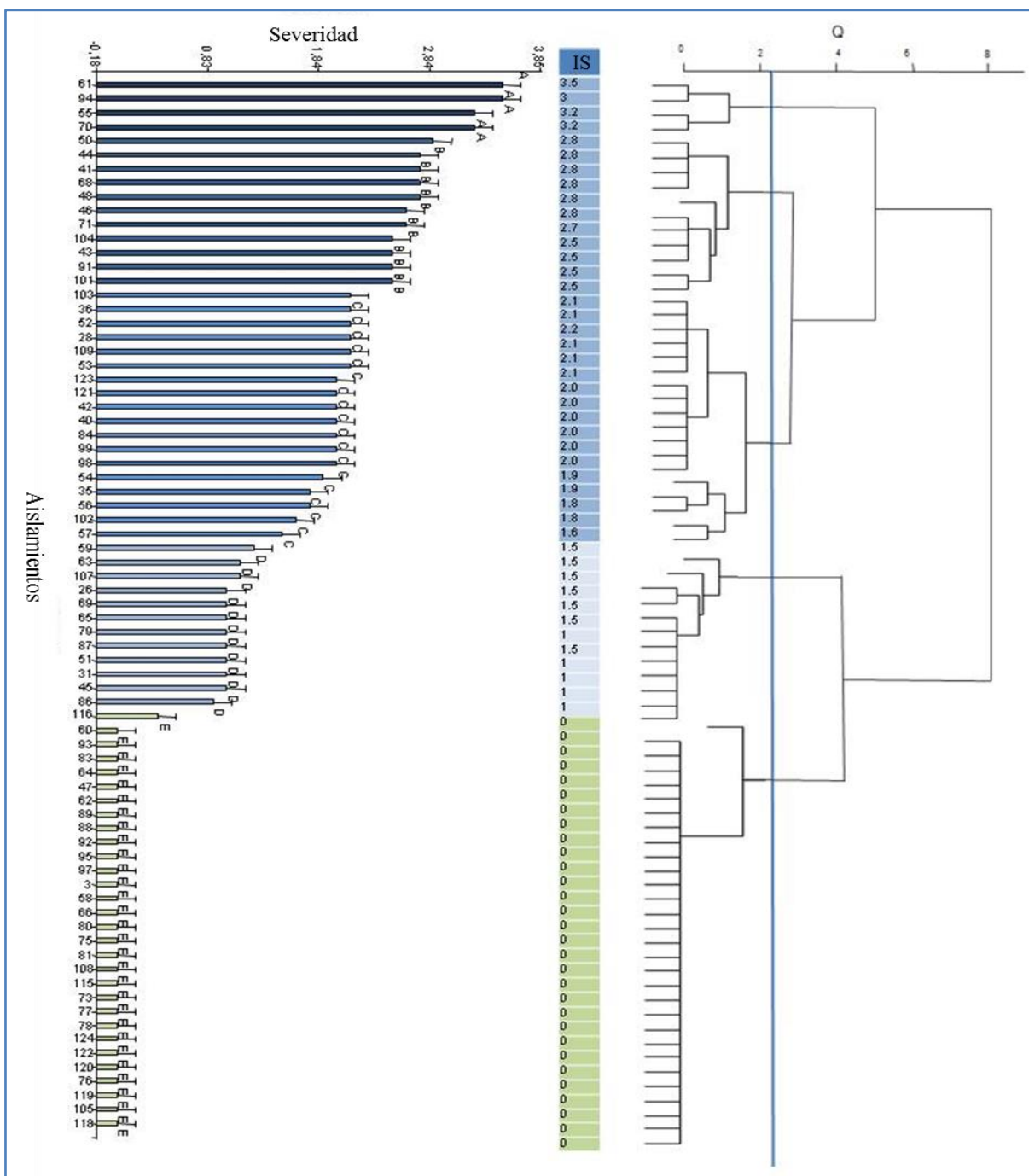


Figura 3.8. (a) Gradiente en la patogenicidad de 74 aislamientos de *F. s.* de diferentes localidades en las provincias de Salta y Jujuy. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,001$) entre aislamientos; b) Dendrograma generado de acuerdo con el índice de severidad de la enfermedad (IS). En azul se marcan los aislamientos altamente patógenos (AP), en celeste los moderadamente patógenos (MP) y en verde los ligeramente patógenos (LP).

Tabla 3.3. Datos de los 88 aislamientos de los complejos *F. o.* y *F. s.* analizados en el presente trabajo, indicando código, origen, año de colección, síntomas, fuente, crecimiento micelial, índice de severidad y categoría de patogenicidad.

Aislamiento	Origen geográfico (provincia/ localidad)	Año de colección	Síntomas/ etapa/ fuente ^a	Crecimiento micelial (cm± coef. Var.) ^b	IDS ^c	Patogenicidad ^d
Complejo <i>F. o.</i>						
1	Salta/La Merced	2013	DO/A/TT	1.7±0.3	2.5	AP
5	Salta/La Merced	2013	DO/A/TR	2.5±0.1	2.5	HP
6	Salta/La Merced	2013	DO/A/TR	2.6±0.1	2.5	HP
7	Salta/Cerrillos	2013	DO/A/TT	3.0±0.1	1.7	MP
8	Salta/Cerrillos	2013	DO/A/TT	3.3±0.1	3.1	HP
9	Salta/Cerrillos	2013	DO/A/TT	2.3±0.5	2.5	HP
11	Salta/Cerrillos	2013	DO/A/TR	3.8±0.1	1.7	MP
12	Jujuy/Ovejería	2013	M/C/TT	3.6±0.3	3.5	HP
13	Jujuy/La Caravana	2013	M/C/TT	1.8±0.4	3.3	MP
15	Jujuy/La Caravana	2013	M/C/R	3.5±0.2	2.7	HP
16	Jujuy/La Caravana	2013	M/C/R	3.5±0.3	2.7	HP
17	Jujuy/San Vicente	2013	M/C/TT	1.7±0.2	2.0	MP
18	Jujuy/San Vicente	2013	M/C/R	2.4±0.1	2.0	MP
19	Jujuy/San Vicente	2013	M/C/R	2.0±0.1	0.0	NP
20	Jujuy/Alto Verde	2013	M/C/R	3.5±0.6	2.3	HP
22	Jujuy/Alto Verde	2013	M/C/TR	4.2±0.4	1.8	MP
23	Jujuy/Alto Verde	2013	M/C/R	4.0±0.1	1.0	LP
24	Jujuy/C. Arias	2013	M/C/R	3.5±0.3	1.2	LP
25	Jujuy/Carambuco	2013	M/C/TR	3.3±0.2	2.0	MP
27	Jujuy/Alto Verde	2013	M/C/TT	3.5±0.2	3.0	HP
29	Jujuy/Ovejería	2013	M/C/R	3.5±0.3	2.3	HP
30	Jujuy/Ovejería	2013	M/C/TT	2.4±0.3	2.2	MP
32	Jujuy/Ovejería	2013	M/C/TT	2.1±0.2	0.0	NP
33	Jujuy/Alto Verde	2013	M/C/TT	2.9±0.5	3.0	HP
37	Jujuy/Alto Verde	2013	M/C/R	2.5±0.1	2.4	MP
49	Salta/La Merced	2013	M/C/R	1.7±0.4	1.5	MP
67	Salta/Cerrillos	2013	M/C/R	3.1±0.6	2.2	HP
72	Salta/La Merced	2014	M/C/R	2.7±0.2	2.0	HP

74	Salta/La Merced	2014	M/C/R	1.8±0.2	2.0	MP
82	Salta/Cerrillos	2014	M/C/TT	2.3±0.1	1.3	LP
90	Salta/Vaqueros	2014	M/C/TT	2.9±0.3	1.8	HP
96	Salta/Vaqueros	2014	M/C/TT	2.5±0.9	2.8	HP
100	Salta/La Merced	2014	M/C/TT	2.5±0.1	2.1	HP
111	Jujuy/Palpalá	2014	M/C/R	3.5±0.2	2.7	HP
112	Salta/Cerrillos	2014	M/C/R	3.5±0.1	2.0	HP
114	Salta/Cerrillos	2015	M/C/R	3.8±0.1	2.1	MP
126	Salta/La Viña	2013	M/C/TT	3.0±0.1	2.5	HP
127	Salta/La Merced	2013	M/C/TT	3.2±0.1	1.0	LP
128	Jujuy/C. Arias	2013	M/C/TR	3.0±0.1	1.0	LP
129	Salta/Cerrillos	2013	M/C/TT	1.9±0.2	1.0	LP
130	Salta/Cerrillos	2013	DO/C/TT	2.3±0.2	1.0	LP
131	Jujuy/San Vicente	2013	DO/C/TT	2.8±0.4	1.6	LP
132	Salta/La Merced	2013	M/C/TT	3.0±0.1	2.5	HP
133	Jujuy/C. Arias	2013	M/C/TT	2.5±0.2	2.3	MP
134	Jujuy/C. Arias	2013	M/C/TT	2.3±0.6	2.2	MP

Complejo *F. s.*

26	Jujuy/Alto Verde	2013	RR/C/R	3.1±0.2	1.5	LP
28	Jujuy/Ovejería	2013	RR/C/TR	2.9±0.1	2.2	MP
31	Jujuy/Ovejería	2013	RR/C/R	2.0±0.4	1.0	LP
35	Jujuy/Ovejería	2013	RR/C/R	2.0±0.1	1.9	MP
36	Jujuy/Alto Verde	2013	RR/C/R	2.6±0.3	2.1	MP
40	Salta/La Merced	2014	RR/C/R	1.5±0.3	2.0	MP
41	Salta/La Merced	2014	RR/C/TR	2.5±0.1	2.8	HP
42	Salta/La Merced	2014	RR/C/TR	3.1±0.1	2.0	MP
43	Salta/La Merced	2014	RR/C/R	3.3±0.2	2.5	HP
44	Salta/La Merced	2014	RR/C/R	3.3±0.3	2.8	HP
45	Salta/La Merced	2014	RR/C/R	2.5±0.3	1.0	LP
46	Salta/La Merced	2014	RR/C/TR	3.5±0.1	2.8	HP
48	Salta/La Merced	2014	RR/C/TR	1.0±0.1	2.8	HP
50	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/R	1.7±0.1	2.9	HP
51	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/R	1.6±0.1	1.5	LP
52	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/R	3.6±0.3	2.1	MP
53	Salta/La Merced	2014	RR/C/TR	2.7±0.3	2.1	MP

54	Salta/La Merced	2014	RR/C/TR	2.9±0.3	1.9	MP
55	Salta/La Merced	2014	RR/C/R	1.9±0.6	3.2	HP
56	Salta/La Merced	2014	RR/C/R	2.0±0.4	1.8	MP
57	Salta/La Merced	2014	RR/C/R	2.9±0.3	1.6	MP
59	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/R	2.4±0.3	1.5	LP
61	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/R	2.0±0.3	3.5	HP
62	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/TR	1.9±0.1	2.0	MP
63	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/R	2.0±0.2	1.5	LP
65	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/TR	2.2±0.1	1.5	LP
68	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/TR	3.2±0.3	2.8	HP
69	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/R	1.6±0.1	1.5	LP
70	Salta/La Merced	2014	RR/C/R	1.6±0.1	3.2	HP
71	Salta/La Merced	2014	RR/C/TR	2.0±0.1	2.7	HP
79	Salta/La Merced	2014	RR/C/R	1.6±0.1	1.0	LP
84	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/TR	3.4±0.1	2.0	MP
86	Salta/Cerrillos	2014	RR/C/R	3.2±0.3	1.0	LP
87	Salta/Chicoana	2014	RR/C/R	3.0±0.2	1.5	LP
91	Salta/Vaqueros	2014	RR/C/TR	2.3±0.2	2.5	HP
94	Salta/Vaqueros	2014	RR/C/TR	2.5±0.2	3.0	HP
98	Salta/Vaqueros	2014	RR/C/TR	2.4±0.2	2.0	MP
99	Salta/La Merced	2014	RR/C/TR	2.5±0.2	2.0	MP
101	Salta/R. de Lerma	2014	RR/C/TR	3.4±0.2	2.5	HP
102	Salta/R. de Lerma	2014	RR/C/TR	3.4±0.3	1.8	MP
103	Jujuy/Alto Verde	2014	RR/C/TR	3.2±0.3	2.1	MP
104	Jujuy/Alto Verde	2014	RR/C/TR	3.2±0.1	2.5	HP
107	Jujuy/Alto Verde	2014	RR/C/TR	3.5±0.1	1.5	LP
109	Jujuy/San Vicente	2014	RR/C/TR	2.3±0.2	2.1	MP
121	Salta/El Carril	2015	RR/C/TR	2.4±0.1	2.0	MP

^aSíntomas: M=slow yellowing; DO=damping off; RR= root rot. Fuente: A=almácigos; C=cultivo; TT= tejido de tallo (vascular); TR= tejido de raíz y R=rizosfera.

^b Media de crecimiento micelial, incubados en alternancia de luz y oscuridad a 25±2 °C por 3 días, ± coeficiente de variación .

^c0–4 Escala de severidad. Índice de severidad de la enfermedad observado en plantas de cv. “K326” .

^dCategorías de patogenicidad: AP: Altamente patogénicas (IS ≥ 2.5), MP: moderadamente patogénicas (2.5 > IS > 1.5) y LP: levemente patogénicas (IS ≤1.5).

Caracterización morfológica

Según la diferenciación de morfotipos realizada mediante el análisis de coordenadas principales (ACoP), dentro del complejo *F. o.* se definieron tres morfotipos distintos: MI, MII y MIII, que comprenden al 27%, 61% y 12% de los aislamientos patogénicos, respectivamente (Figura 3.9). Las características de cada morfotipo se describen en la Tabla 3.4. Las diferencias más importantes que se observaron fueron el color de la colonia y la forma de los macroconidios, como se pueden observar en la Figura A1 y A3 .a.-Anexo.

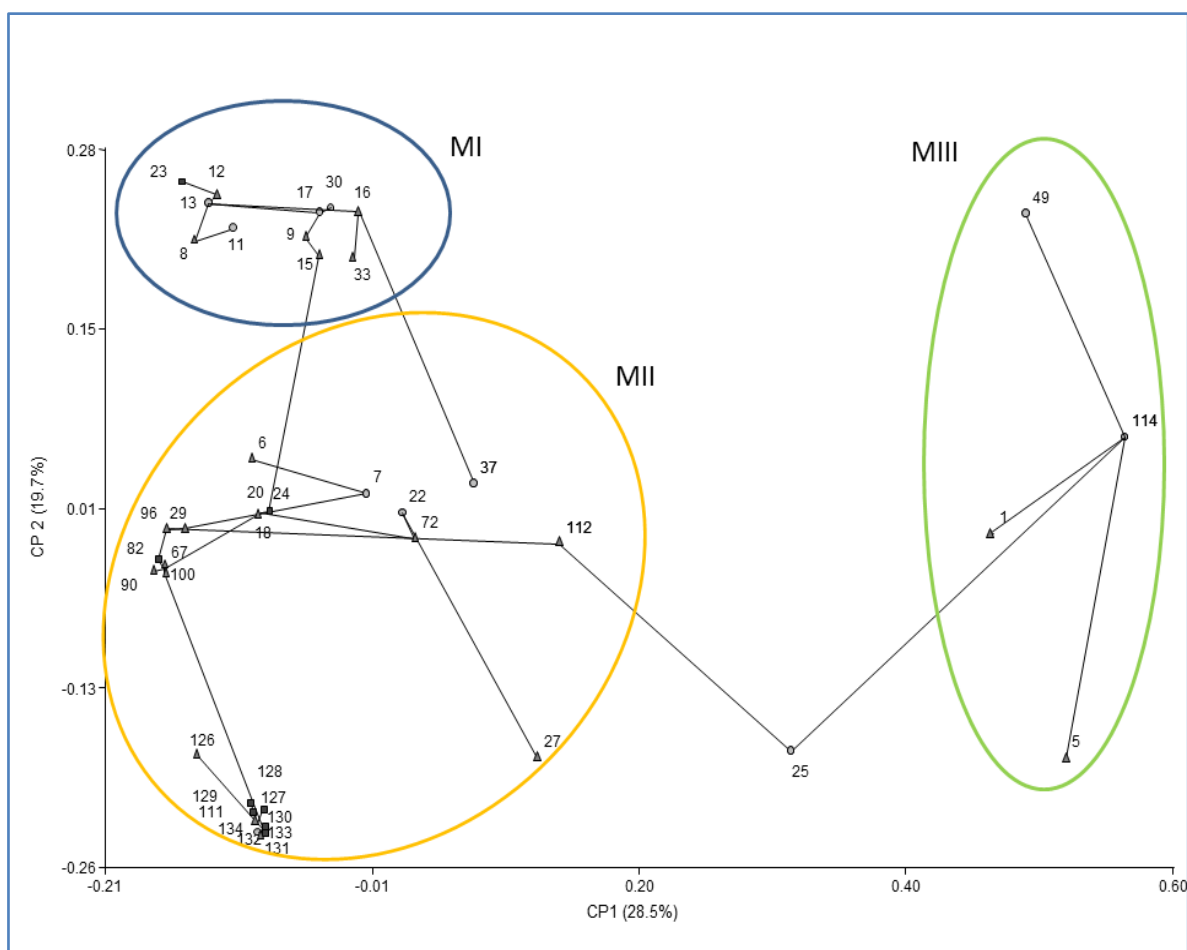


Figura 3.9. Diferenciación de los aislamientos del complejo *F. o.* en el análisis de coordenadas principales y superposición de árbol de recorrido mínimo. Reorganización en tres grupos de aislamientos encerrados por círculos (MI, MII y MIII: morfotipos I, II y III). El porcentaje de variación explicada en cada coordenada principal (CP) se indica entre paréntesis. ▲ Aislamientos altamente patogénicos, ● moderadamente patogénicos y ■ levemente patogénicos.

Por otra parte, se diferenciaron tres morfotipos dentro del complejo *F. s.*: MI, MII y MIII que comprenden el 17%, 47% y 36% de los aislamientos patógenos, respectivamente (Figura 3.10.). Las características más distinguibles fueron la forma de macroconidios y el número de septos, forma de microconidios y color de esporodocios, dichas estructuras se observan en la Figura A2 y A3b-Anexo.

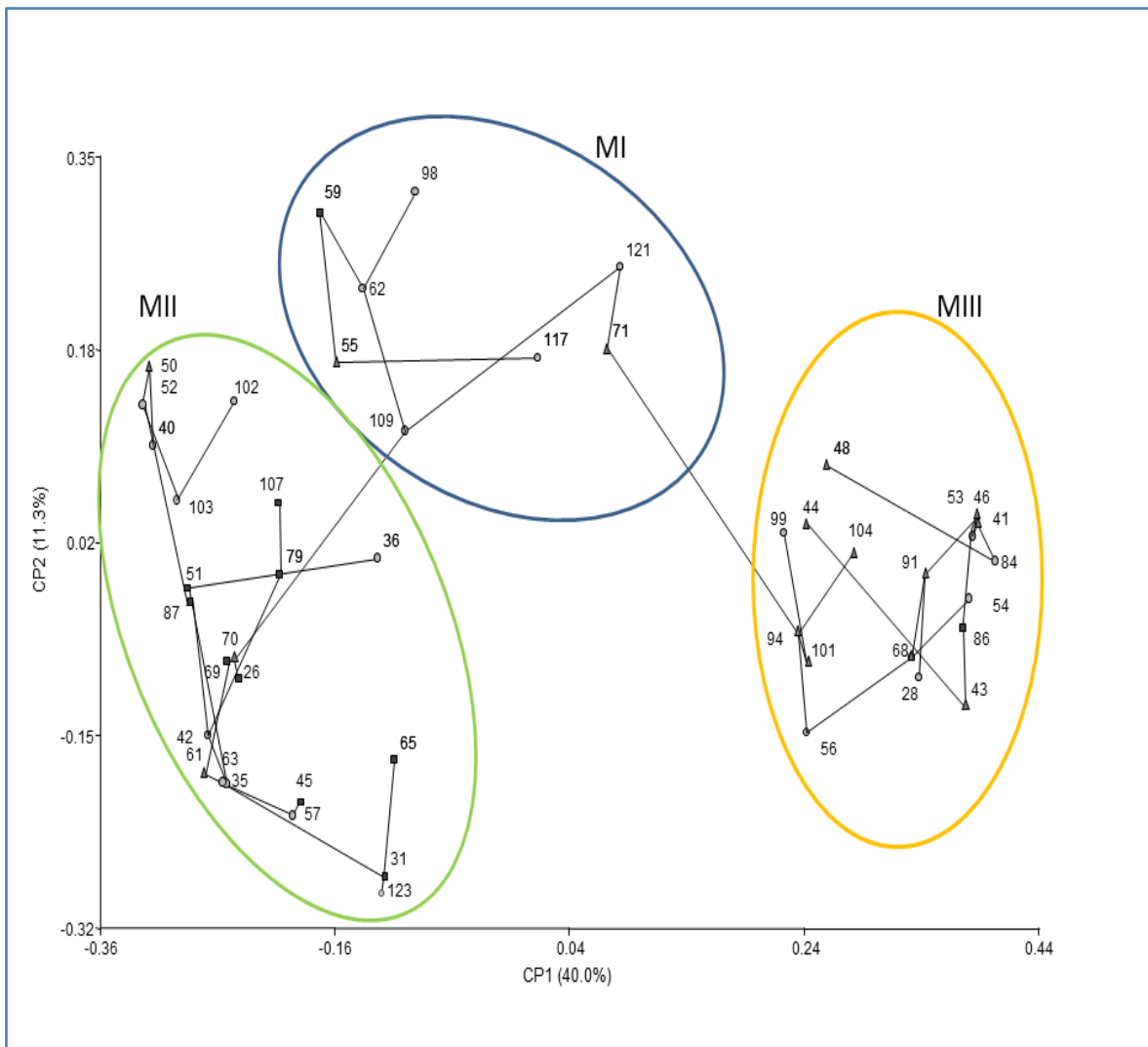


Figura 3.10. Diferenciación de los aislamientos del complejo *F. s.* en el análisis de coordenadas principales y superposición de árbol de recorrido mínimo. Reorganización de los aislamientos en tres grupos encerrados por círculos (MI, MII y MIII: morfotipos I, II y III). El porcentaje de variación explicada en cada coordenada principal (CP) se indica entre paréntesis. ▲ Aislamientos altamente patógenicos, ● moderadamente patógenicas y ■ levemente patógenicos.

Tabla 3.4. Código de los aislamientos, origen geográfico, media de crecimiento micelial, color de colonias, forma y tamaño de macroconidios, forma de macroconidios, color de esporodooquios, de los complejo *F. o.* y *F. s.* obtenidos de Salta y Jujuy.

Morfotipos ^a	Aislamientos ^b	Crecimiento micelial (cm) ^c	Color de colonias	Macroconidios Forma y tamaño	Microconidios	Color de esporodooquios
Complejo <i>F.o.</i>						
MI	J: 11-12-13-15-16-17-23-30-33 S: 8-9	3.2±0.7	Rosado, blanco a rosa.	Ligeramente curvo. 38.8±3.0 µm	Ovales sin septos	Crema fuerte
MII	J: 131-18-111-29-27-134-133-128-24-22-20 S: 96-90-126-132-127-100-72-67-37-130-129-112-82-7-6	2.4±0.8	Blanco a violeta	Ligeramente recto. 42.5±4.5 µm	Ovales sin septos	Naranja
MIII	J: 25 S: 1-5-49-114	2.6±0.5	Blanco a violeta	Ligeramente curvo comúnmente 4 septos.40.5±4.4 µm	Ovales y elipticos	Crema fuerte
Complejo <i>F.s.</i>						
MI	J: 109 S: 55-59-61-71-94-98-117-121	2.2±0.35	Blanca a crema	Falcados-ligeramente recto, comúnmente 5 septos. 46.5±6.3 µm	Ovales, elongados ovales	Crema o verde
MII	J: 26-31-35-45-103-107 S: 40-42-50-51-52-57-62-63-65-69-79-87-102-123	2.9±0.7	Blanca	Falcado, curvado dorsiventralmente, comúnmente 4 septos 43.1±3.9 µm	Ovales, elongados (1 septo)	Crema
MIII	J: 28-104 S: 41-43-44-46-48-53-54-56-68-70-84-86-91-99-101	2.6±0.7	Blanca a verde	Falcatos curvados dorsalmente, comúnmente 5 septos septate.48.3 ±5.1 µm	Ovales, reniformes, ovales redndeados sin septos.	Crema o verde

^a Diferenciación de Morfotipos de los complejo *F. o.* y *F.s.*

^b Código de los aislamientos; origen geográfico : S: Salta, J: Jujuy.

^c Media de crecimiento micelial de los aislamientos incubados en alternancia de luz y oscuridad a 25±2 °C por 3 días, ± coeficiente de variación .

Análisis molecular

A través de la amplificación del ADN de los aislamientos patogénicos utilizando los cebadores EF-1H y EF-2T, se generaron fragmentos de ADN de 656-720 pb, cuyas secuencias se incluyeron en el GenBank (MF327596-MF327666). El análisis de la secuencia los productos de PCR y la comparación con las secuencias disponibles en NCBI y FUSARIUM ID mostraron que todos los aislamientos pertenecían a los complejos *F. o.* y *F. s.* con una similitud del 98 -100%.

Se generaron árboles filogenéticos independientes para cada complejo (Figuras 3.11 y 3.12). En el árbol del complejo *F. o.* los 36 aislamientos analizados se agruparon con un soporte de clado de 0,99 (Figura 3.11). Los aislamientos se separaron en dos subgrupos distintos (Clados 1 y 2) con la excepción de los aislamientos 128, 7, 8, 12 y 15 que se agruparon por separado. El Clado 1 incluyó 16 aislamientos agrupados junto con *F. o. f. sp. batatas* (AF008484, AF008848) y *F. o. f. sp. radialis lycopersici* (HM057329) con un soporte de clado de 0,95. Dentro del Clado 2, 16 aislamientos se agruparon con *F. o. f. sp. batatas* (FJ985353). Considerando que el soporte del clado 2 fue de 0,88 sería conveniente incluir otros loci en el análisis para confirmar la asociación con *F. o. f. sp. batatas*. *F. commune* se utilizó como *outgroup* (Figura 3.11.).

En el árbol filogenético del complejo *F. s.* se observaron tres Clados genéticos (1, 2 y 3) (Figura 3.12). Todos los aislamientos se agruparon dentro del Clado 3 con un soporte de clado de 0,94. El 47% de los aislamientos, se agrupó junto con *F. falciforme* (DQ247041, KF836701, HF937435), mientras que el 32% formó un grupo con *F. falciforme* (AB817230) y *F. paranaense* (KF597820, KF597813, KF597807). La variabilidad observada en el análisis de la secuencia EF-1 α fue insuficiente para separar *F. paranaense*, *F. falciforme* y *F. keratoplasticum* ya que esta región genómica se encuentra conservada entre dichas especies. En el grupo FSSC5, se incluyeron cuatro aislamientos con un soporte de clado de 1,00. Se observaron tres aislamientos (44, 84 y 121) que se agruparon por separado del resto. *F. o. f. sp. vasinfectum* se utilizó como *outgroup*.

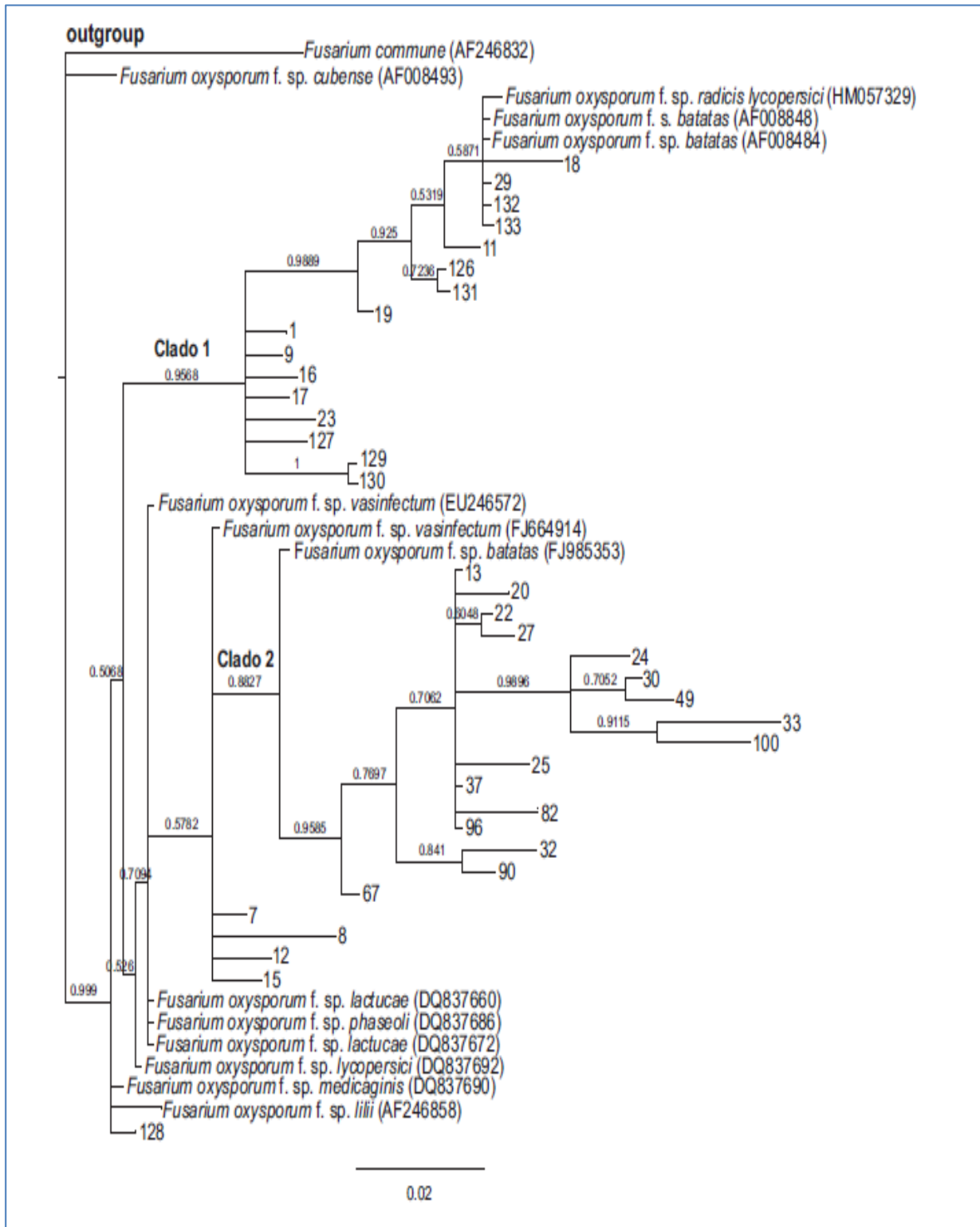


Figura 3. 11. Árbol filogenético basado en 36 secuencias de EF-1 α de los aislamientos patogénicos del complejo *F. o.* y 14 secuencias de control obtenidas del GenBank. El árbol fue construido utilizando el modelo de sustitución HKY + G + I para el análisis bayesiano. Los números por encima de las ramas indican

el soporte de cada nodo (probabilidad posterior). La barra de escala representa el número de sustituciones por sitio. *Fusarium comune* se utilizó como *outgroup*.

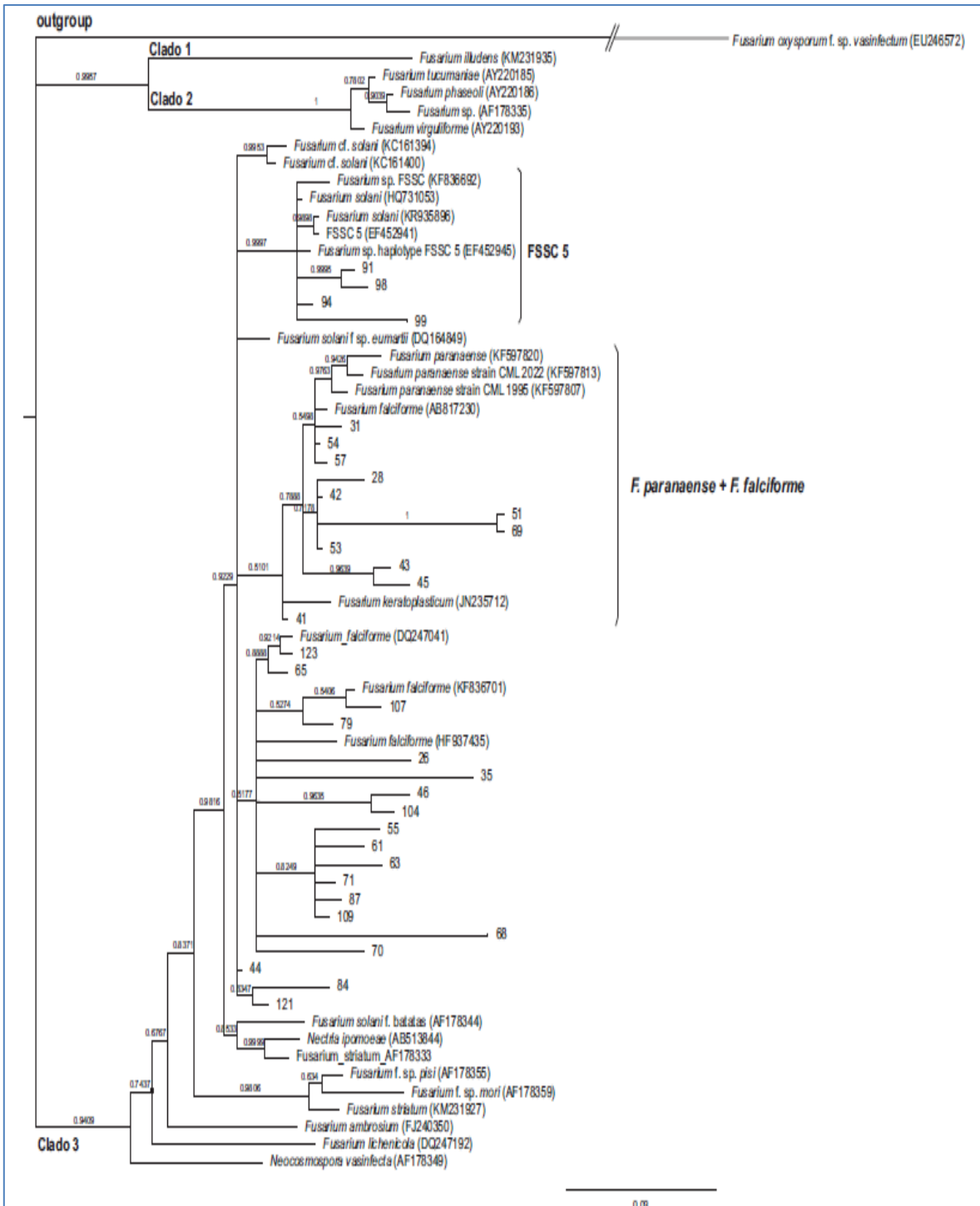


Figura 3.12. Árbol filogenético basado en 34 secuencias de EF-1 α obtenidas de aislamientos del complejo *F. s.* y 30 secuencias de control obtenidas del GenBank. El árbol se construyó utilizando el modelo de sustitución HKY + G para el análisis bayesiano. Los números por encima de las ramas indican soporte del

nodo (probabilidad posterior). La barra de escala representa el número de sustituciones por sitio. *Fusarium solani* f. sp. *vasinfectum* se utilizó como outgroup.

Determinación del tipo de apareamiento

A partir del análisis del *loci* MAT mediante amplificación por PCR se realizó la designación del tipo de apareamiento para 31 aislamientos seleccionados al azar del complejo *F. o.* (Tabla 3.5). Los resultados muestran la presencia de ambos tipos de apareamiento en los aislamientos del complejo *F. o.*, con un 45% MAT1-1 y un 55 % MAT1-2. En el primer caso se observó la amplificación de un fragmento de 200 pb, mientras que para MAT1-2 se generaron fragmentos de 800 pb de longitud, lo cual estuvo en concordancia con lo reportado en la bibliografía (Yun *et al.*, 2000).

Los aislamientos mostraron un agrupamiento disperso en el árbol filogenético (Figura 3.11) ya que se observan aislamientos con MAT1-1 y MAT 1-2 tanto en el Clado 1 como en el Clado 2. Se encontró un predominio de alelos MAT1-2 en los aislamientos de Jujuy. No se realizaron pruebas de compatibilidad entre aislamientos de tipo de apareamiento diferente.

Tabla 3.5. Tipo de apareamiento para 31 aislamientos del complejo *F. o.* a partir del análisis del *loci* MAT.

Provincia	Tipo de apareamiento	Aislamientos del complejo <i>F. o.</i>
Salta	MAT 1-1	1-5-7-8-9-72-82-132
	MAT 1-2	6-11-126-127-129
Jujuy	MAT 1-1	12-13-27-37-111-128-133
	MAT 1-2	16-17-18-19-20-22-23-24-25-129-131-134

DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente capítulo fue identificar y caracterizar las especies de *Fusarium* asociadas al tabaco tipo Virginia en el Noroeste Argentino (Salta y Jujuy) a través de su caracterización morfológica, molecular y patogénica. Dado que las especies de *Fusarium* son difíciles de estudiar, debido a que los aislamientos con morfología similar representan diferentes grupos biológicos que además incluyen a especies endófitas (Leslie *et al.*, 1990), saprófitos (Fracchia *et al.*, 2000) y patógenos de plantas (Chandra *et al.*, 2011), fue necesario identificar los patógenos combinando la información revelada por los tres tipos de datos morfológicos, moleculares y de patogenicidad.

Los 130 aislamientos de *Fusarium* analizados mostraron una apreciable variabilidad patogénica, resultando la mayoría de ellos (67%) patogénicos para el tabaco. A partir del análisis de las secuencias EF-1 α de los 88 aislamientos patogénicos se pudieron identificar 43 aislamientos patogénicos del complejo *F. o.* y 45 del complejo *F. s.* y se observaron diferencias significativas en los niveles de patogenicidad en ambos complejos con la identificación de tres categorías de virulencia. Todos los aislamientos identificados dentro del complejo *F. oxysporum* y *solani* tuvieron rasgos morfológicos de acuerdo con informes previos (Booth, 1971; O'Donnell *et al.*, 1998; Nalim *et al.*, 2011; Chehri *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015; Pinaría *et al.*, 2015; Schroers *et al.*, 2016).

- Complejo *F. o.*

En base al análisis de las secuencias del gen EF-1 α , los aislamientos del complejo *F. o.* se agruparon en diferentes clados, manifestando dos subgrupos importantes donde la mayoría de los aislamientos (89%) estuvieron relacionados con *F. o. f. sp. batatas*. El agrupamiento observado se encuentra en concordancia con informes previos en los cuales *F. o. f. sp. batatas* muestran similitud con *F. o. f. sp. vasinfectum* y *F. o. f. sp. radices lycopersici* (O'Donnell *et al.*, 1998, 2009; Laurence *et al.*, 2014; Pinaría *et al.*, 2015). Además, estos resultados están de acuerdo con reportes de *F. o. f. sp. batatas* aislados de campos de tabaco en España donde el análisis molecular también mostró dos subgrupos, los cuales presentaron diferentes características fisiológicas que podrían reflejar dos linajes distintos (Alves Santo *et al.*, 2007).

La diferenciación molecular de los aislamientos de *F. o.* por debajo del nivel de especies es complicada debido a la naturaleza polifilética de muchas formas especiales (Kistler, 1997; Lievens *et al.*, 2008). Diferentes autores sugieren la existencia de estrechas relaciones entre aislamientos de *F. o.* con tabaco, batata (*Ipomea batatas*) y algodón (*Gossypium hirsutum*), con patogenicidad variable dentro de cada especie (Shew y Lucas, 1991). Clark *et al.* (1998) sugirieron la existencia de tres linajes evolutivos entre aislamientos de *F. o.* a partir de batata y tabaco basados en

características patogénicas, marcadores RAPD y análisis de VCG (Grupos de Compatibilidad Vegetativa) y observaron diferencias en las interacciones hospedante-patógeno. Según Clark *et al.* (1998) y Tjamos *et al.* (2006), el marchitamiento vascular en tabaco es causado por *F. o. f. sp. nicotianae* en contraposición con lo sugerido por Armstrong y Armstrong (1968). A su vez, demostraron que los aislamientos de *F. o.* de batata y tabaco eran distintos a *F. o. f. sp. vasinfectum*, ya que los aislamientos de tabaco no inducían síntomas en algodón. En el mismo trabajo, se propuso a *F. o. f. sp. nicotianae* como una forma especial distinta de *F. o. f. sp. batatas* ya que los aislamientos de tabaco fueron menos virulentos en batata y causaron un marchitamiento mayor en tabaco (Clark *et al.*, 1998). Sin embargo, hasta el momento no existen secuencias disponibles en GenBank que permitan la identificación de los aislamientos como *F. o. f. sp. nicotianae* mediante análisis moleculares, por lo que sería necesario realizar pruebas de patogenicidad en batata y algodón para probar la hipótesis de especificidad para tabaco de los aislamientos analizados en el presente trabajo, lo que permitiría incluirlos como *f. sp. nicotianae*.

La reproducción sexual no ha sido observada hasta el momento en *F. o.*, pero si se han identificado genes de tipo de apareamiento (Arie *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2000). La determinación del tipo de apareamiento de todos los aislamientos estudiados mostró una distribución de los alelos MAT1-1 y MAT1-2 donde ambos estuvieron presentes en los diferentes clados. Sin embargo, los aislamientos AP ($IS \geq 2,5$) manifestaron una mayor proporción de alelos MAT1-1. O'Donnell *et al.*, (2004) encontró que los alelos MAT1-1 y MAT1-2 están representadas en los cuatro clados del complejo *F. o.*, lo que indica que los genes de tipo de apareamiento se han mantenido y evolucionado en el tiempo. En *F. o. f. sp. cepae* se encontró la presencia de ambos alelos MAT dentro de un mismo aislamiento, la distribución de los aislamientos que contenían sólo MAT1-1, o MAT1-1 + MAT1-2 no eran específicos de los clados obtenidos del análisis de las regiones EF-1 α -mtSSU o IGS (Southwood *et al.*, 2012), a pesar de que este complejo generalmente se considera heterotálico (Arie *et al.*, 2000). Por otro lado, Lievens *et al.* (2009) encontró que la presencia de MAT1-1 y MAT1-2 en *F. o. f. sp. lycopersici* manifestaba una distribución al azar ya que los aislamientos aparecieron dispersos sobre los diferentes clados de los árboles filogenéticos, independientemente del origen geográfico. Sin embargo, en *F. o. f. sp. lycopersici* las pruebas de compatibilidad entre aislamientos con diferentes alelos no dieron como resultado una descendencia viable (Kawabe *et al.*, 2005). El papel de la reproducción sexual en *F. o.* es incierta, porque no se ha descrito su estado teleomorfo (Baayen *et al.*, 2000). Por lo tanto, se considera que este complejo de especies es asexual, y la presencia de dos alelos para el locus MAT podría ser indicio de que la

reproducción sexual habría ocurrido tempranamente en su evolución (O'Donnell *et al.*, 2004; Fourie *et al.*, 2009).

Se observó gran variabilidad en base a los caracteres cualitativos y cuantitativos analizados con la diferenciación de tres morfotipos. La mayoría de los aislamientos altamente patógenos se incluyeron dentro de un solo morfotipo (MI). Sin embargo, no se observó asociación basada en la prueba de Mantel entre datos morfológicos y moleculares, lo que sugiere que los enfoques revelaron diferentes niveles de diversidad genética.

- **Complejo *F. solani***

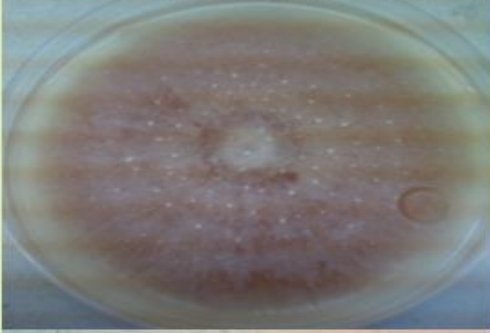
De los 74 aislamientos del complejo *F. s.* obtenidos de tejido y rizosfera, sólo 45 (60%) fueron patogénicos para las plantas de tabaco. Se diferenciaron tres morfotipos en función de los caracteres morfológicos evaluados, la mayoría de los aislamientos altamente patogénicos se incluyeron dentro de los morfotipos I y III. Los caracteres más distintivos de ambos morfotipos fueron la forma y número de septa de los macroconidios, forma de microconidios y color esporodocios. Asumimos que el morfotipo II pertenece a *F. falciforme* de acuerdo a informes previos (Chehri *et al.*, 2015). Sin embargo, la caracterización molecular de los aislados no respalda esta suposición y sería necesario incluir otros loci para probar esta hipótesis.

Basándose en el análisis de la secuencia EF-1 α , todos los aislamientos del complejo *F. s.* se incluyeron en el mismo grupo (clado 3) de acuerdo con los informes anteriores (O'Donnell *et al.*, 2008). El Clado 3 se describió inicialmente incluyendo especies clínicamente importantes (Zhang *et al.*, 2006b; O'Donnell *et al.*, 2008). Sin embargo, la inclusión de aislamientos de suelo y de plantas, como de la corteza de árboles, arveja, arroz, sandía y mango, dentro de este clado se informó posteriormente (O'Donnell *et al.*, 2008). Esta asociación de especies clínicamente importantes con ambientes agrícolas también se encontró en la soja (Chitrampalam y Nelson, 2016) y en tabaco (Chehri *et al.*, 2015). Dada la variabilidad encontrada en la patogenicidad de los aislamientos incluidos en el clado 3, que están asociados con diferentes hospedantes y/o ambientes, se los describió como patógenos oportunistas o facultativos (Chitrampalam y Nelson, 2016). Muchas especies de *Fusarium* son patógenos oportunistas o débiles capaces de atacar sólo a las plantas debilitadas previamente por otros factores, como los inducidos por el medio ambiente, tales como un pobre drenaje del agua del suelo o la presencia de nematodos (Chehri, 2014). La mayor parte de los aislamientos del complejo *F. s.* obtenidos en este estudio fueron capaces de inducir la podredumbre de las raíces en las plantas de tabaco. Dichos aislamientos son parte de la microbiota endémica del suelo en los campos de tabaco y posiblemente en la mayoría de los campos de esta

región. Sin embargo, un estudio más completo que incluya aislamientos obtenidos de otros hospedantes que presenten síntomas de pudrición de raíz sería necesario para confirmar este supuesto.

Conclusión

La información generada en el presente estudio sobre los complejos *F. o.* y *F. s.*, por primera vez proporciona información sobre la variabilidad de los patógenos asociados con el marchitamiento vascular y podredumbre radicular en el cultivo de tabaco en el noroeste argentino. En base a los resultados generados se observó una alta variabilidad morfológica y patogénica entre los aislamientos de ambos complejos y se confirmó la hipótesis de que los síntomas de marchitamiento vascular y podredumbre radicular observados a campo están asociados con la presencia de ambos complejos, respectivamente. La secuenciación de la región EF-1 α resultó ser una herramienta de gran utilidad para la identificación de las especies dentro de ambos complejos.



CAPÍTULO IV

Evaluación de la tolerancia al marchitamiento vascular y a podredumbre radicular ocasionados por *Fusarium* spp. en variedades comerciales de tabaco tipo Virginia.

INTRODUCCIÓN

En las epidemias de las enfermedades radiculares, el inóculo es una parte importante del triángulo de la enfermedad ya que interacciona con el medio ambiente y con las prácticas agrícolas realizadas en el agroecosistema. La comprensión del papel de la densidad del inóculo en el desarrollo de la enfermedad es importante en el desarrollo de conceptos epidemiológicos, para generar tácticas y estrategias de manejo, pero a su vez es necesario acompañarlo con el conocimiento del agroecosistema (March *et al.*, 2010).

Al evaluar las enfermedades, el interés se centra en medir 1) la incidencia de la enfermedad, es decir, el número o proporción de plantas enfermas (el número o proporción de plantas, hojas, tallos que muestren cualquier tipo de síntomas); 2) la severidad de la enfermedad, es decir, la proporción del área o cantidad de tejidos de la planta que está enferma (Agrios, 2005). De esta manera, podemos decir que una Epidemia se refiere al cambio en la intensidad (incidencia o severidad) de la enfermedad causada por una población de patógenos en una población de plantas, en el tiempo y/o en el espacio (Días, 2013).

Frecuentemente se aplican modelos estadísticos con el fin de resumir y describir la complejidad del proceso de enfermedad (Arneson, 2006; Madden *et al.*, 2007). La curva epidémica de una enfermedad es el resultado de la interacción del cultivo, el patógeno (su vector), el ambiente (clima, suelo) y el hombre en una única relación en el transcurso del tiempo y el espacio, por lo cual a partir de ella se puede inferir las causas de una epidemia y predecir su impacto en el cultivo (March *et al.*, 2010). El principal objetivo en el manejo de enfermedades es mantener la intensidad final de una enfermedad (y_f) por debajo del nivel de daño económico (Nutter, 2001) contribuyendo a que el cultivo exprese su máximo potencial genético en ese agroecosistema (Figura 4.1).

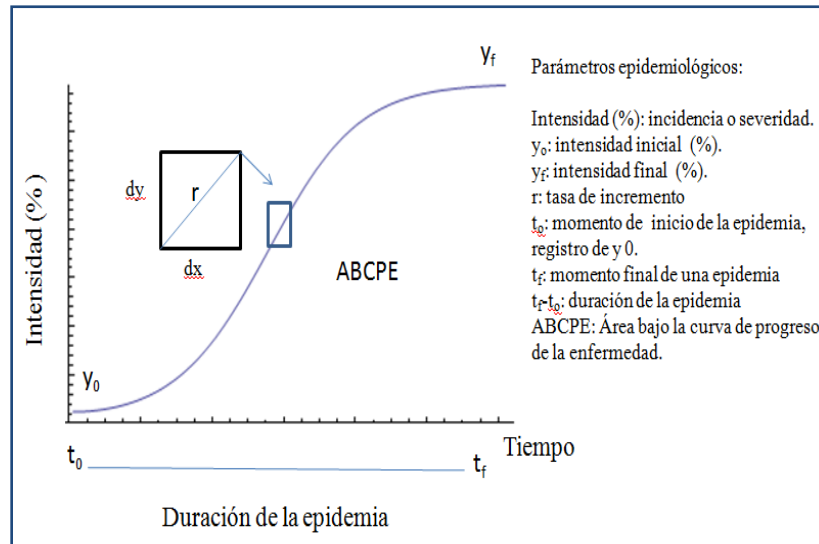


Figura 4.1. Curva de progreso de una enfermedad y parámetros epidemiológicos que la caracterizan (March *et al.*, 2010).

En fitopatología es importante el estudio del progreso de la enfermedad a lo largo del tiempo, donde el tiempo (t) es modelado como una variable continua en lugar de una variable discreta. Se han utilizado muchos modelos diferentes de crecimiento poblacional para modelar las curvas de progreso de la enfermedad (Madden *et al.*, 2007). La utilización de modelos empíricos o descriptivos (Tabla A3-Anexo) para describir la relación dada entre dos o más variables para simular el progreso de la enfermedad son:

Modelo Exponencial:

Es el modelo más simple empleado para el estudio del aumento de poblaciones. Puede ser descrito como: $dx/dt = re x$

donde re es la tasa de aumento específico para este modelo.

La interpretación biológica de la ecuación indica que la velocidad de aumento de la enfermedad: dx/dt , también llamada tasa absoluta de aumento de enfermedad, es proporcional a la propia cantidad de enfermedad. A pesar de la simplicidad puede ser usado para las fases iniciales de la epidemia, cuando la cantidad de la enfermedad no excede el 5 %.

Modelo Logístico:

La ecuación diferencial para este modelo puede ser descripta como:

$$dx/dt = r_l x (1-x)$$

donde r_l es la tasa de aumento específico o tasa de infección aparente como la denominó Vanderplank (1963) para este modelo y 1 es la cantidad máxima de la enfermedad.

El modelo logístico supone que la tasa absoluta de cambio en el nivel de enfermedad depende tanto del tejido sano (y) como del tejido enfermo ($1-y$) presente en ese momento. La curva es perfectamente simétrica con un punto de inflexión en $t = 1 / r_l \ln y_0 / (1 - y_0)$ cuando $y = 1/2$. Es decir, dy / dt aumenta hasta $y = 1/2$ y disminuye a partir de entonces.

Modelo Gompertz:

La ecuación puede ser descripta:

$$dx/dt = r_g x [-\ln(x)]$$

donde r_g es la tasa específica para este modelo. El modelo de Gompertz supone que la tasa absoluta de cambio depende de y y $\ln(1/y)$ y es muy similar al modelo logístico. Sin embargo, el modelo de Gompertz es más asimétrico, con un punto de inflexión alcanzado en $0.37(1/e)$ en su lugar.

Modelo Monomolecular:

El modelo monomolecular asume una capacidad de carga de uno, es decir, el nivel máximo de enfermedad es uno, por lo que la gravedad o incidencia de la enfermedad se mide como una proporción. El tejido vegetal enfermo sólo puede estar entre cero (saludable) y uno (enfermedad completa). También asume que la tasa absoluta de cambio es proporcional al tejido sano, es decir, $(1 - y)$.

La ecuación que describe el modelo es:

$$dx/dt = r_m (1-x)$$

donde r_m es la tasa específica para este modelo ($r_m = \text{inóculo inicial} * \text{tasa}$) y $(1-x)$ representa el tejido sano.

Modelo Weibull

El modelo Weibull incluye un mayor número de parámetros, por lo que puede describir curvas más complicadas. Los parámetros son:

A - unidades de tiempo, indicando el momento de aparición de la enfermedad,

B - el parámetro de escala, inversamente relacionado con la tasa de aumento de la enfermedad,

C - el parámetro de forma sin unidad que controla la asimetría de la curva.

Si $c = 1$, este modelo es idéntico al modelo monomolecular con el parámetro de velocidad $r = 1 / b$ y el nivel de enfermedad inicial $y_0 = 1 - \exp(-a / b)$. Con valores adecuados de los parámetros 1, 2 y 3, otros modelos pueden ser aproximados por el modelo de Weibull.

Selección del modelo

La selección del modelo más apropiado, puede ser determinada en forma gráfica o analítica; esta última es la más común y se realiza mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados. De este análisis se debe tener en cuenta la significancia del modelo, significancia de los parámetros estimados, coeficiente de determinación ajustado, desviación estándar de la regresión lineal y el modelo de dispersión de los residuales vs los predichos (Vanderplank, 1963).

Comparación de epidemias

Los parámetros utilizados para comparar las epidemias son: **Tasa de incremento aparente (r)** que cuantifica la relación hospedante-patógeno-ambiente, la **intensidad de la enfermedad inicial (y_0)**: es de principal ayuda para estimar indirectamente el inóculo infeccioso presente al inicio de una epidemia y el **Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE)** que es un parámetro cuantitativo de utilidad en comparaciones de la intensidad de la enfermedad a lo largo del tiempo, donde el método trapezoidal es el más empleado y calcula el promedio de la intensidad de la enfermedad entre cada par de puntos adyacentes en el tiempo.

Las enfermedades ocasionadas por *F. o.* y *F. s.* son monocíclicas porque las unidades de dispersión (inóculo) se producen sólo una vez por temporada de crecimiento, y no pueden convertirse en unidades de infección (Inóculo potencial) hasta la próxima vez que se cultive un cultivo susceptible y se desarrolle un ambiente es favorable para la infección.

Resistencia de las variedades

A pesar de que existen reportes de variedades consideradas resistentes al marchitamiento vascular del tabaco, la determinación genética de la resistencia no está muy estudiada, debido a que ningún cultivar tiene un nivel de resistencia alto que pueda evitar la infección vascular del patógeno. Sin embargo, algunos autores reportan la existencia de resistencia poligénica en las variedades de tabaco tipo Virginia analizadas (Muller y Morgan, 1996).

El manejo del marchitamiento vascular y podredumbre radicular ocasionados por los complejos *F.o.* y *F. s.* ha sido intentados por distintas estrategias incluyendo resistencia del hospedante, saneamiento, rotación de cultivos, fertilización, manejo de nemátodos y manejo químico o biológico. No todas las estrategias son igualmente eficaces, sumado a ello se ha reportado una baja eficiencia de los tratamientos con fungicidas (Frac *et al.*, 2016). En Argentina no hay variedades disponibles resistentes a *Fusarium*, pero si variedades tolerantes, que pueden reducir la infección y minimizar las pérdidas de rendimiento. La utilización de variedades que sean altamente tolerantes o tolerantes es clave para el manejo de las enfermedades de manera de mantener la intensidad final (y_f) por debajo del nivel de daño económico sin afectar su productividad.

Conocer la variabilidad genética del patógeno en una zona determinada es el principal requisito para el desarrollo y utilización de variedades con una resistencia duradera (McDonald y Linde, 2002). Actualmente, no existen informes sobre la asociación entre los complejos *F. o.* y *F. s.* con las principales variedades de tabaco cultivadas en el NOA y no hay información sobre el nivel de densidad de inóculo de *Fusarium* en los suelos cultivados con tabaco. En otros patosistemas, se ha demostrado que las mayores densidades de inóculo de *Fusarium* tienen una influencia directa sobre el nivel de incidencia final de la enfermedad y la aparición de síntomas tempranos (Ben Yephet y Shtienberg, 1994). Una mejor comprensión de la relación entre la densidad de inóculo, la incidencia de la enfermedad y la variabilidad del patógeno puede permitir el desarrollo de estrategias de manejo eficaces y una mejor predicción del progreso de la enfermedad en el tiempo.

El presente estudio se realizó bajo la hipótesis de que las variedades de tabaco actualmente utilizadas en el NOA presentan una susceptibilidad diferencial al marchitamiento vascular y podredumbre radicular ocasionada por miembros de los complejos *F. o.* y *F. s.* estudiados y que la incidencia y severidad de la enfermedad se encuentra asociada a densidad de inóculo presente en el suelo.

Objetivos

- 1) Evaluar los niveles de patogenicidad de los aislamientos del complejo *F. o.* y *F. s.* en diferentes variedades de tabaco Tipo Virginia.
- 2) Evaluar bajo condiciones controladas la influencia de la densidad del inóculo sobre la expresión del marchitamiento vascular y la podredumbre radicular en tabaco y analizar el progreso de la enfermedad mediante el ajuste de modelos matemáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos de *Fusarium* y preparación de inóculo.

Se seleccionaron seis aislamientos del complejo *F. o.* y *F. s.* obtenidos de las campañas evaluadas. Los mismos fueron seleccionados por la agresividad y por ser representativos de los diferentes clados identificados mediante caracterización molecular en el capítulo anterior. Los aislamientos se obtuvieron inicialmente de plantas de tabaco que presentaban síntomas de marchitamiento y podredumbre radicular. La identificación de los mismos se presentan en la Tabla 4.1. Las colonias se cultivaron en agar de dextrosa de papa (PDA) a 25 °C durante diez días, a los 5 días de crecimiento se colocó semillas de sorgo autoclavado durante 20 minutos en dos días consecutivos (Leslie *et al.*, 2006). Al completar el crecimiento en la placa de Petri, se realizaron suspensiones de conidios. Primeramente el inóculo se recogió inundando los cultivos con agua destilada estéril y frotando las superficies del cultivo con una varilla de vidrio estéril, se filtró y luego se cuantificó microscópicamente utilizando un hemocitómetro (Costa *et al.*, 2015).

Tabla 4.1. Identificación de los aislamientos evaluados

Aislamientos	Especie ^a	GenBank
<i>F.o.</i> 15	<i>F.o.</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	MF327631
<i>F.o.</i> 27	<i>F.o.</i> f. sp. <i>batatas</i>	MF327609
<i>F.o.</i> 33	<i>F.o.</i> f. sp. <i>batatas</i>	MF327613
<i>F.s.</i> 44	<i>F. solani</i>	MF327639
<i>F.s.</i> 55	<i>F. solani</i>	MF327646
<i>F.s.</i> 98	<i>F. solani</i> FSSC5	MF327665

^a: determinación de especie en base a la secuenciación de la región EF-1 α .

Sustrato y densidad de inóculo (D)

Se utilizó como sustrato una mezcla de arena estéril y mantillo (autoclavado durante 30 minutos a 120 °C en dos repeticiones) en una proporción de 1: 1. Para este ensayo se utilizaron macetas de plástico con un volumen de 400 g de sustrato. La inoculación se realizó a dos concentraciones diferentes: D1= 1.000 microconidios/g de sustrato y D2= 10.000 microconidios/g de sustrato.

Variedades evaluadas

Se evaluaron seis variedades comerciales de tabaco tipo Virginia (MB47, PVH229, NC71, K346, K326 y K394). Las semillas de tabaco se sembraron en almácigos con un sustrato estéril (autoclavado durante 30 minutos a 120 °C). Las plántulas fueron mantenidas a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 12 h. Cuando alcanzaron cuatro hojas verdaderas se realizó el trasplante. Se trasplantaron en 36 macetas de cada variedad, evaluando en todo el ensayo 216 plantas más 36 plantas utilizadas como testigo sin inocular. Se colocó en las macetas, 1 ml de la suspensión de esporas, con tres repeticiones para cada tratamiento. Las plantas se mantuvieron durante 30 días en cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente (Rodríguez-Molina *et al.*, 2013). Las macetas fueron regadas periódicamente con agua destilada estéril para mantener la humedad del sustrato. Se utilizaron como control macetas con sustrato estéril no inoculado de cada variedad.

Análisis estadístico

El diseño experimental consistió en tres factores: variedades de tabaco (seis niveles), aislamientos de *Fusarium* (seis niveles) y dos niveles de inóculo. Las evaluaciones se realizaron durante los 30 días (5, 10, 15, 20, 25 y 30) posteriores a la inoculación. Las variables analizadas fueron incidencia (I), severidad (S), largo y peso seco de raíces.

En base a los datos de severidad se calculó para cada aislamiento un Índice de Severidad (IS) utilizando la fórmula: $(n_1) + (n_2 \times 2) + (n_3 \times 3) + (n_4 \times 4) / n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4$, donde n_0 es el número de plantas de la categoría 0, n_1 es el número de plantas de la categoría 1, n_2 el número de plantas de la categoría 2, n_3 el número de plantas de la categoría 3 y n_4 el número de plantas de la categoría 4 (Fujinaga *et al.*, 2005).

La incidencia fue relacionada con el tiempo para describir la curva de progreso de la enfermedad. El área bajo la curva fue calculada con el método poligonal (Campbell y Madden, 1990) y sujeto a análisis de la varianza (ANOVA).

En complemento, los datos de incidencia fueron linearizados y se realizó un análisis de regresión lineal para obtener los parámetros de tres modelos epidemiológicos: monomolecular, logístico y Gompertz (Madden *et al.*, 2007). Los residuos y el ajuste gráfico de los datos experimentales y los valores R^2 se consideraron para la selección del modelo. El parámetro de velocidad de infección aparente (pendiente) de la ecuación para cada repetición se determinó a partir de datos linealizados. Las pendientes se analizaron a continuación por ANOVA y se utilizaron para construir una curva de progreso de la enfermedad simulada para cada aislamiento y densidad de inóculo evaluada (incidencia inicial considerada $y_0=0.0001$; $y_0^*=\ln[(y_0/(1-y_0))]$).

Todos los análisis de datos y los ajustes del modelo se realizaron utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017).

RESULTADOS

Análisis del Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE).

Los resultados obtenidos fueron altamente significativos para los efectos de las variedades ($p < 0,0001$) y significativos para densidad de inóculo ($p = 0,0123$), en contraste no fueron significativos a los efectos de los aislamientos ($p = 0,0516$). El coeficiente de variación en todo el experimento fue de 35,77 (Figura A4.- Anexos). A su vez se observó interacción entre las variedades x aislamientos ($p = 0,0095$), no registrándose interacción entre variedades x densidad de inóculo ($p = 0,7751$) y aislamiento por densidad de inóculo ($p = 0,7272$). Los resultados para la interacción entre factores, incluidos la media de ABCPE para todos los aislamientos se presentan en la Tabla 4.2. Los síntomas observados para las variedades evaluadas se observan en las Figuras 4.2 y 4.3 para el complejo *F. o.* y 4.4 para el complejo *F. s.*

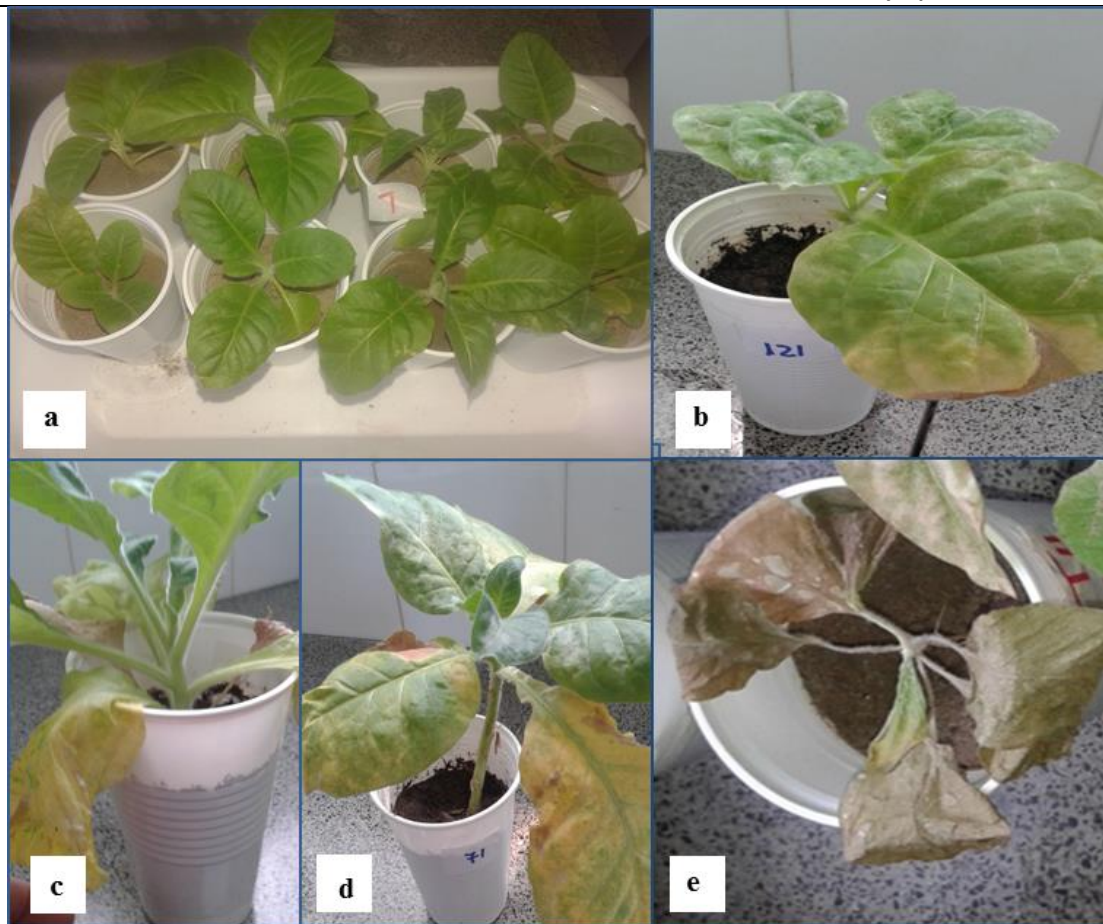


Figura 4.2. Ensayo de inoculación con aislamientos de *F. o.* a) Plantas de tabaco utilizadas como testigos del ensayo; b) planta inoculadas con *F. o.* con grado 1 en la escala de severidad; c) plantas con grado 2; d) plantas con grado 3 y e) Plantas con grado 4.



Figura 4.3. Síntomas observados en el ensayo de inoculación con aislamientos de *F. o.* a) Haces vasculares de planta testigo; b y c) oscurecimientos de los haces vasculares en plantas inoculadas con *F.o.* y e) Sistema radicular de planta que manifestó síntomas de marchitamiento.



Figura 4.4. a) Raíz de planta sana; b) sistema radicular de planta inoculada con *F.s.* con grado 1; b) sistema radicular con grado; 2 c) sistema radicular con grado y 3 e) sistema radicular con grado 4 en escala de severidad.

Tabla 4.2. Media del ABCPE registrada a los 30 días posteriores a la inoculación. Las celdas contienen los valores de ABCPE correspondientes a la interacción entre las variables.

Aislamientos de <i>Fusarium</i>							
		<i>F.o. 15</i>	<i>F.o. 27</i>	<i>F.o. 33</i>	<i>F.s. 44</i>	<i>F.s. 55</i>	<i>F.s. 98</i>
ABCPE MEDIA²		11,88 ab	12,6 b	10,42 a	12,69 b	11,2 ab	10,3 a
(CV)		(0,356)	(0,442)	(0,37)	(0,47)	(0,52)	(0,49)
Densidad de inóculo¹							
D1	10,92 (0,47)	10,69 ab	12,49 ab	10,28 ab	11,84 ab	11,25 ab	8,94 a
D2	12,35 (0,4)	13,06 ab	12,71 ab	10,56 ab	13,54 b	12,60 ab	11,66 ab
Variedades							
MB47	7,95 (0,44)	7,71 abc	7,92 abc	7,31 abc	7,71 abc	7,71 abc	9,98 abc
PVH2291	11,18 (0,46)	12,5 abc	10,20 abcd	6,88 ab	15,21 abcd	13,96 abcd	8,33 abc
NC71	9,36 (0,49)	11,47 abcd	13,56 abcd	9,17 abc	9,06 abc	6,88 ab	6,04 a
K346	11,89 (0,56)	11,67 abcd	18,71 d	13,13 abcd	13,31 bcd	15,42 bcd	14,58 abcd
K326	12,83 (0,31)	11,67 abcd	15,83 bcd	12,08 abcd	13,33 abcd	13,83 abcd	10,21 abcd
K394	13,6 (0,46)	16,25 cd	9,38 abc	13,96 abcd	14,99 abcd	13,75 abcd	13,29 abcd

¹ D1 y D2 = 1.000 y 10.000 microconidios/g de sustrato, respectivamente.

² Valores de media del ABCPE; letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). Comparación por el test de LSD Fisher. Coeficientes de variación entre paréntesis

Comportamiento varietal

La variedad MB47 fue significativamente menos infectada que las otras variedades en relación a todos los aislamientos evaluados. A su vez, la variedad más afectada que presentó una media de ABCPE mayor fue la K394 (Figura 4.5).

Las variedades K346, K326, K394 al tener una mayor media de ABCPE manifestaron un comportamiento susceptible frente a todos los aislamientos de *Fusarium* considerados. Mientras que, MB47, PVH2291 y NC71 presentaron menor ABCPE para ambos complejos. A su vez, los aislamientos que presentaron mayor media de ABCPE (Figura 4.6) fue el más agresivos del complejo *F. o.* (*F. o.* 27) y del complejo *F. s.* (*F. s.* 44).

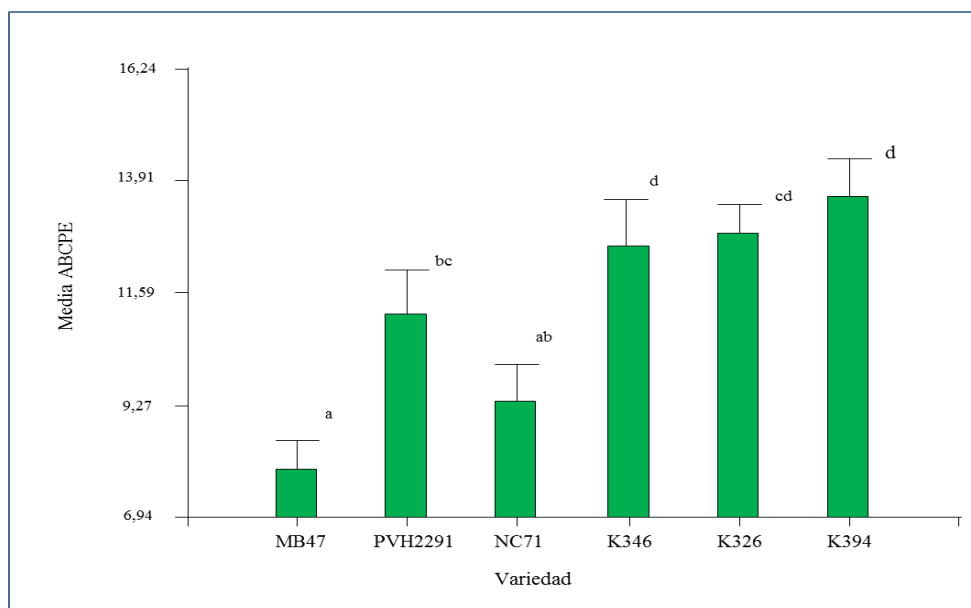


Figura 4.5. Media del ABCPE de las variedades evaluadas (test de LSD Fisher, $\alpha=0,05$). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

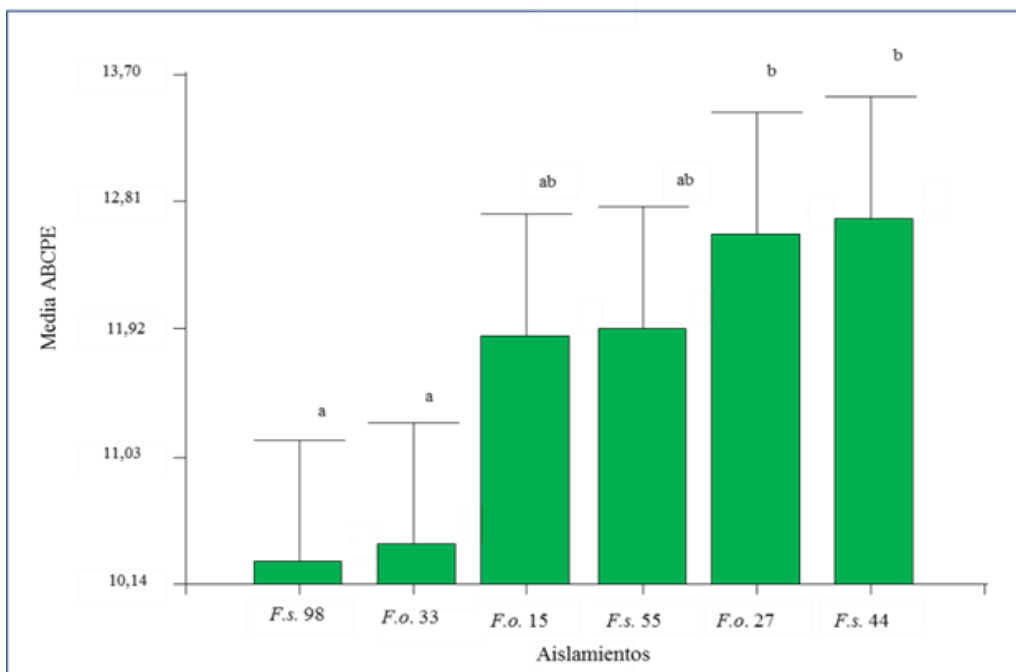


Figura 4.6. Media del ABCPE de los aislamientos considerados (test de LSD Fisher, $\alpha=0,05$). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Influencia de los dos niveles de Inóculo

Los aislamientos que manifestaron la misma agresividad a las dos concentraciones evaluadas fueron todos los *F. o.* (Tabla 4.2) mientras que los aislamientos de *F. s.* fueron significativamente diferentes a los dos niveles de inóculo estudiados comportándose con una mayor agresividad a 10.000 microconidios/g de suelo.

Se evaluaron dos niveles de inóculo; 1.000 y 10.000 microconidios/g de sustrato presentando diferencias significativas por comparación de medias por test de Fisher ($\alpha=0,05$). La mayor concentración resultó tener medias de ABCPE mayores (Figura 4.7). El aislamiento menos agresivo fue *F. s.* 98 en los dos niveles de inóculo y no manifestó diferencias con la media de ABCPE de los otros aislamientos a la concentración más baja.

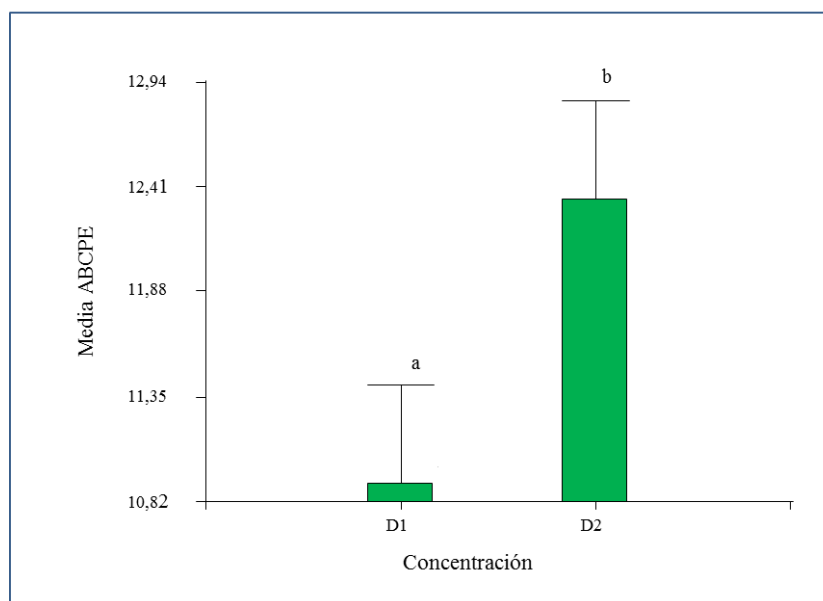


Figura 4.7. Media del ABCPE a las dos concentraciones evaluadas. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Agresividad de los aislamientos

Luego de 30 días de la inoculación todos los aislamientos produjeron una alta incidencia en las plantas de tabaco (Figura 4.8). Los aislamientos que presentaron una mayor agresividad fue *F. o.* 27, para la variedad K346. A su vez manifestaron un comportamiento más agresivo todos los *F. o.*

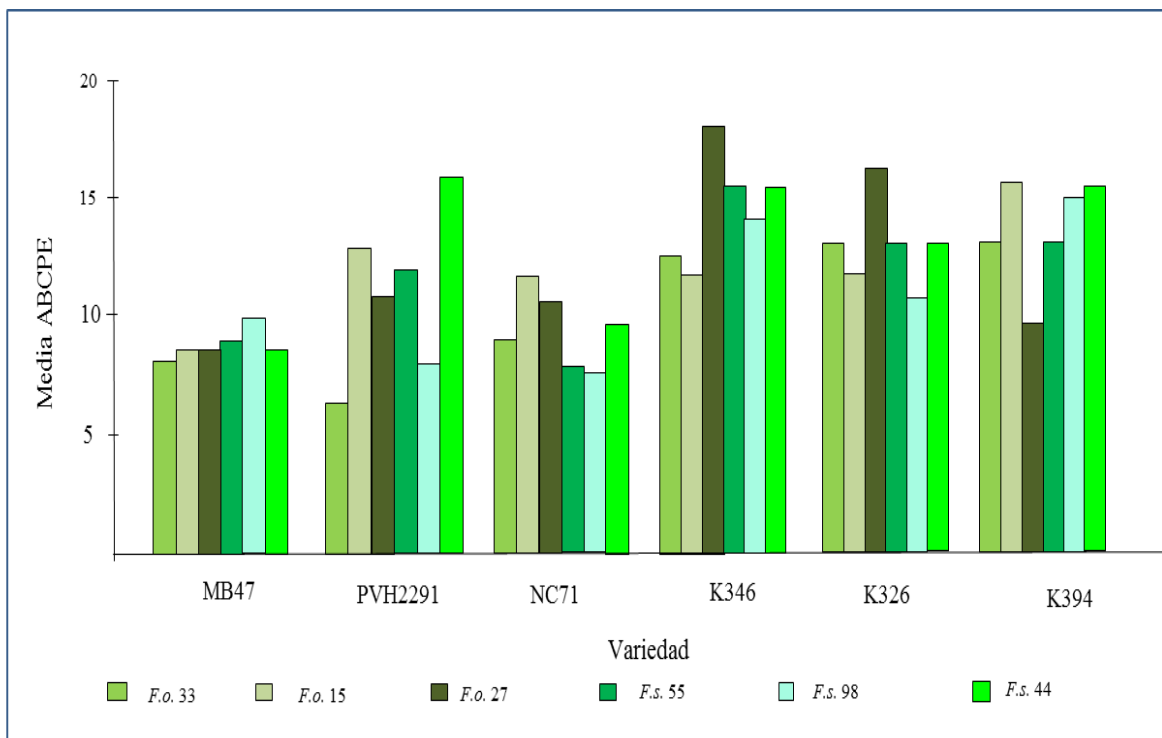


Figura 4.8. Interacción entre aislamientos y variedades de tabaco evaluadas.

Peso seco

La inoculación con los aislamientos de *Fusarium* redujo el peso seco en las diferentes variedades de tabaco inoculadas con respecto a sus correspondientes testigos, resultando ser altamente significativas ($p < 0,0001$) y manifestaron un comportamiento diferente en función de los aislamiento y del nivel de inóculo utilizado (Tabla A5.-Anexo).

Largo de raíces

Las variedades presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) en el largo de las raíces (Figura 4.9). Los aislamientos del complejo *F. o.* se diferenciaron del complejo *F. s.* que presentaron una disminución del largo radicular. A su vez los niveles de inóculo no resultó ser estadísticamente significativo.

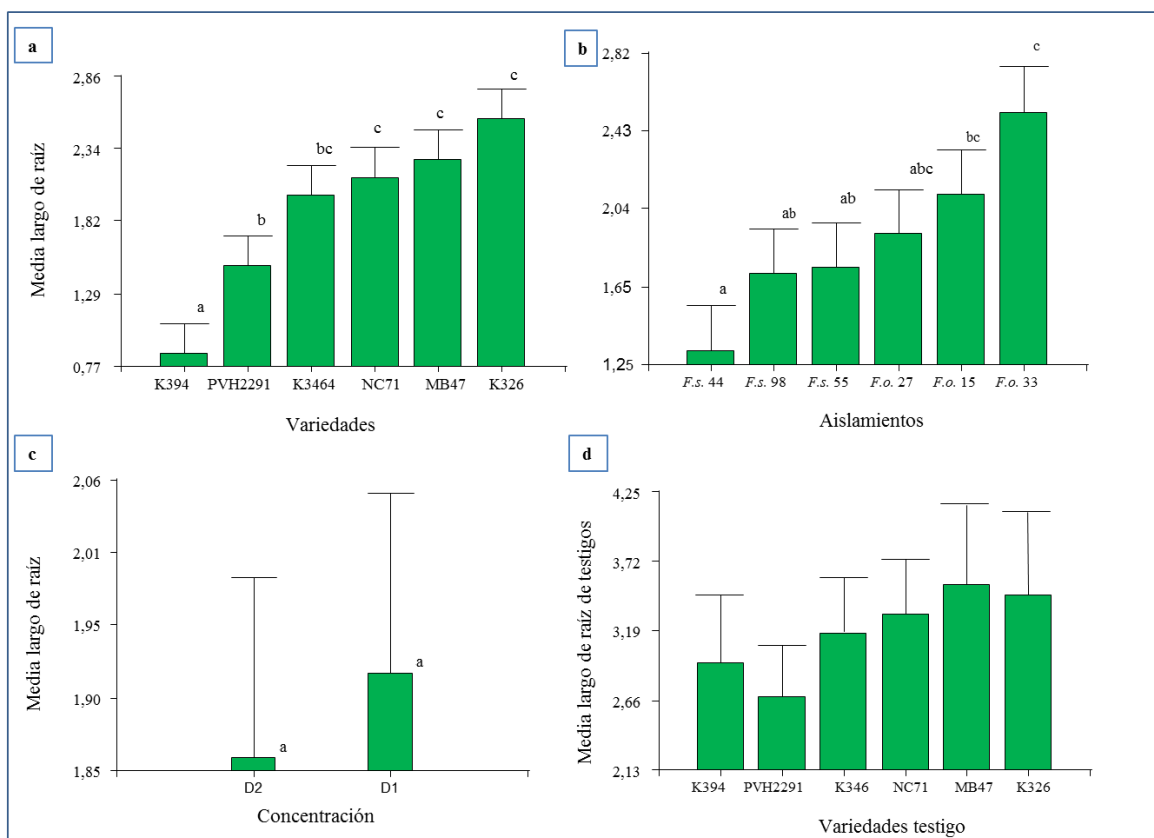


Figura 4.9. Media del largo radicular para a) variedades, b) aislamientos, c) concentración d) media del largo radicular para variedades testigos. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Índice de severidad de la enfermedad (IS).

Se encontró diferencias altamente significativas para las variables evaluadas ($p < 0,0001$). La variedad NC71 fue la que obtuvo menor valor de IS (2,28) seguido por MB47, PVH2291 (Tabla 4.3.). Las variedades que obtuvieron mayor IS fueron K326 y K394. El IS para los aislamientos resultó estadísticamente significativo, donde los más agresivos fueron *F. o. 27* y *F. o. 15*.

Tabla 4.3. Índice de severidad para las variedades evaluadas y aislamientos.

Variedad	IS	Aislamientos	IS
NC71	2,28 a*	<i>F.s.</i> 98	2,74 a
MB47	2,68 b	<i>F.s.</i> 55	2,82 ab
PVH2291	2,87 c	<i>F.o.</i> 33	2,84 b
K346	2,91 d	<i>F.s.</i> 44	2,84 b
K326	2,94 d	<i>F.o.</i> 15	2,99 c
K394	3,63 e	<i>F.o.</i> 27	3,06 d

*letras diferentes indican diferencias significativas prueba LSD Fisher $p \leq 0,05$

Ajuste del modelo

El modelo Monomolecular y el logístico fueron los que se ajustaron de mejor manera en base a los gráficos de residuos y coeficientes de determinación ajustados (R^2). La ecuación que representa la incidencia (y) en función del tiempo (t) a través de la siguiente ecuación: $y = 1 - (1 - y_0) \exp(-rt)$, seguidamente la ecuación que define al modelo de logístico es: $y = 1 / [1 + \{-\ln y_0 / (1 - y_0) + rt\}]$. Para controlar el cumplimiento de los supuestos del análisis se solicitaron los gráficos de residuos estudentizados vs. predichos y Gráficos de Q-Q plot para confirmar la normalidad de los datos del modelo (Figura 4.10.; Figura 4.11.).

Tabla 4.4. Parámetros estadísticos aplicados para la selección del modelo y describir a los complejos *F. o.* y *F. s.*

Aislamientos	Modelo ^a	r^b	r^{2c}	CME ^d	$p(m)^e$
Dilución D1					
<i>F.o.</i> 15	Monomolecular	0.01	0,93	0,03	0,0012
<i>F.o.</i> 27	Logístico	0.06	0,92	0,02	0,0006
<i>F.o.</i> 33	Logístico	0.059	0,8	0,03	0,0097
<i>F.s.</i> 44	Monomolecular	0.05	0,93	0,05	0,0003
<i>F.s.</i> 55	Monomolecular	0.06	0,85	0,06	0,021
<i>F.s.</i> 98	Monomolecular	0.06	0,9	0,05	0,0007
Dilución D2					
<i>F.o.</i> 15	Monomolecular		0,88	0,02	0,0033
<i>F.o.</i> 27	Monomolecular	0.01	0,91	0,02	0,0009
<i>F.o.</i> 33	Logístico	0.05	0,87	0,02	0,0015
<i>F.s.</i> 44	Monomolecular	0.056	0,88	0,38	0,0001
<i>F.s.</i> 55	Monomolecular	0.056	0,86	0,056	0,0015
<i>F.s.</i> 98	Monomolecular	0.06	0,95	0,06	0,0007

^aModelo ajustado. ^b r : tasa de infección aparente

^c r^2 : coeficiente de determinación ajustado.

^dCME: cuadrado medio del error.; ^e $p(m)$: probabilidad asociada al modelo.

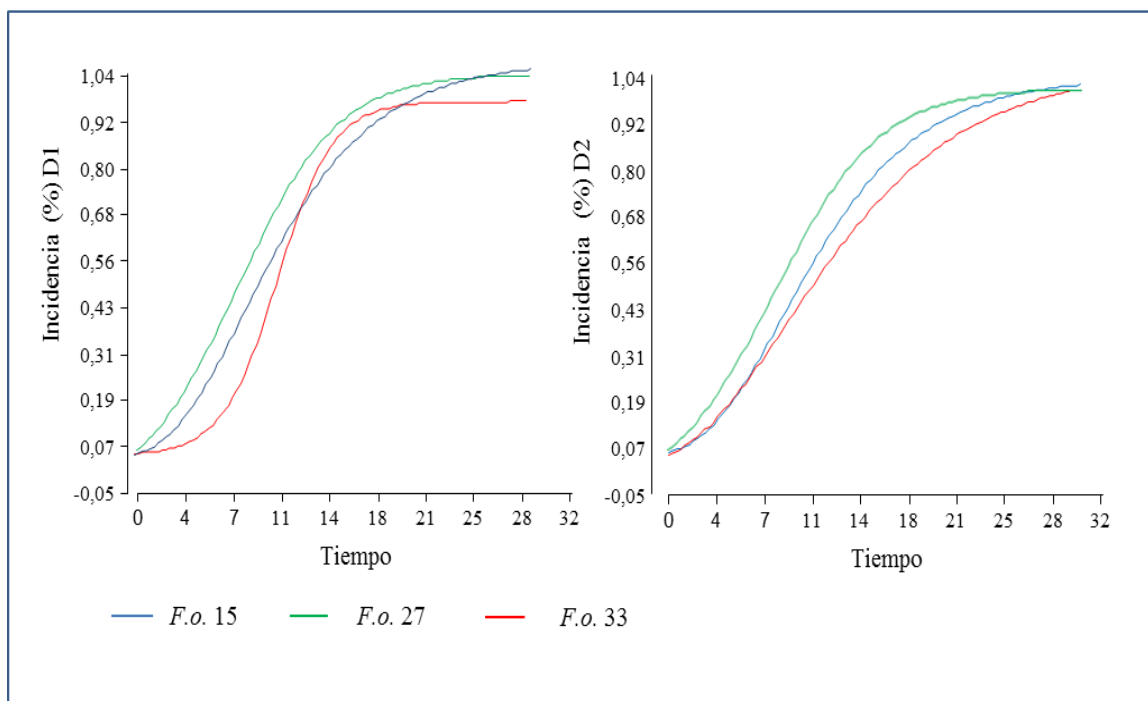


Figura 4.10. Progreso de la enfermedad ajustado por el modelo correspondiente según los aislamientos del complejo *F.o.*, particionado por la concentración de inóculo.

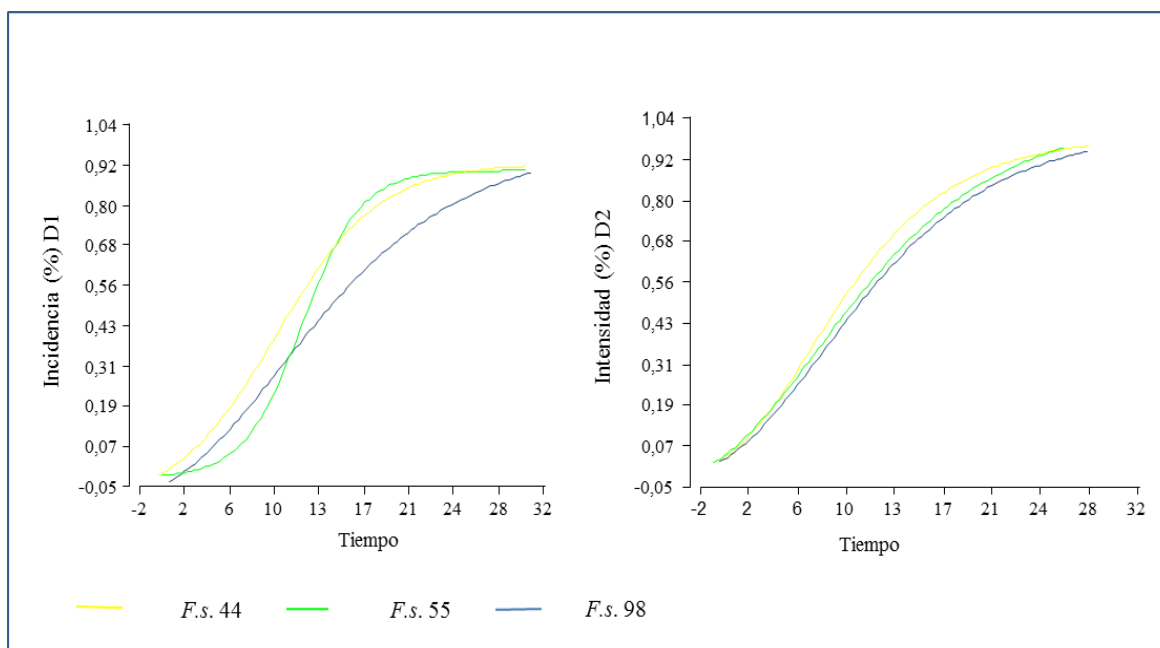


Figura 4.11. Progreso de la enfermedad ajustado por el modelo correspondiente según los aislamientos del complejo *F. s.*, particionado por la concentración de inóculo.

DISCUSIÓN

Bajo condiciones controladas, las variedades evaluadas exhibieron un comportamiento diferencial frente a los aislamientos y densidad de inóculo. Las variedades con mejor comportamiento fueron MB47, PVH2291 y NC71, que presentaron los valores de IS más bajos. Esto concuerda con lo observado a campo donde se registró un mejor comportamiento de estas variedades. Además, el análisis molecular de 17 variedades de tabaco Virginia del NOA realizado en base a marcadores microsátélites reveló que las tres variedades mencionadas muestran mayor divergencia genética en relación al resto (Cuellar *et al.*, 2013). Tjamos *et al.*, (2006) encontró que variedades de tabaco mostraban diferentes niveles de la susceptibilidad frente a *F. o.* y a su vez se manifestaban grados de severidad distintos entre las variedades tipo Virginia y las del tipo Burley, mostrando estos últimos niveles de incidencia y severidad más altos. Para los miembros del complejo *F. solani* existen registros para otros cultivos como en poroto, maracuyá y soja (Martínez-Garnica *et al.*, 2014; Bueno *et al.*, 2014; Chitrampalam y Nelson, 2016), sin embargo, no hay reportes sobre el comportamiento de las variedades cultivadas de tabaco.

En otros patosistemas, se ha demostrado que mayores densidades de inóculo de *Fusarium* spp. tienen una influencia directa sobre el nivel de incidencia final de la enfermedad y la aparición de síntomas (Ben-Yephet y Shtienberg, 1994). En el presente trabajo, se observó que los aislamientos de *F.o.* mantuvieron el mismo nivel de agresividad para las dos diluciones evaluadas. Mientras que el grupo de *F. s.* incrementó la severidad a mayor concentración de inóculo. En estudios realizados bajo condiciones controladas en cebolla (Bhatti y Kraft, 1992) se observó que la incidencia de los síntomas de marchitamiento aumentaba linealmente con el aumento de la densidad de inóculo de *F.o.*, la reacción de marchitamiento más severo que se determinó fue a una densidad de inóculo de 5000 propágulos g⁻¹ de suelo (Bhatti y Kraft, 1992). Del mismo modo, Sugha *et al.*, (1994) observó que un aumento en la carga de inóculo aceleraba el desarrollo del marchitamiento en cebolla, mientras que concentraciones menores retrasaban la expresión de los síntomas. Caligiore Gei *et al.*, (2014) confirmaron la ausencia de resistencia a *F.o.* y *F. proliferatum* en cuatro variedades de cebolla evaluadas, y consideraron que la concentración de inóculo es un factor crítico en la detección de los niveles de tolerancia a la podredumbre basal. Si bien, todos los patosistemas son diferentes se mantiene la tendencia de que a aumentos en la densidad de inóculo se acentúa la expresión de la incidencia y los grados de severidad de una enfermedad. En el caso de las especies patógenas de los complejos *F. o.* y *F. s.* el incremento en el número de plantas enfermas a campo, no se debe fundamentalmente a la multiplicación del patógeno o a su dispersión de una planta enferma a otra sana, sino a la cantidad de inóculo presente al momento de la plantación y a las

posibilidades que tenga el mismo de estar en contacto con las raíces de genotipos susceptibles y causar la infección (Archicanoy López, 2000).

En el presente estudio, el ABCPE resultó ser un parámetro de utilidad en la comparación de la incidencia de la enfermedad a lo largo del tiempo para describir el comportamiento de las variedades comerciales frente aislamientos de ambos complejos. Resultados similares se observaron en garbanzo donde el ABCPE permitió identificar el comportamiento de variedades y de razas de *F.o. f sp. ciceris* bajo condiciones controladas (Navas-Cortez *et al.*, 2000). Los datos de incidencia de la enfermedad para las dos densidades de inóculo de los aislamientos evaluados se ajustaron a los modelos de crecimiento monomolecular y logístico permitiendo inferir en la habilidad del patógeno para inducir enfermedad.

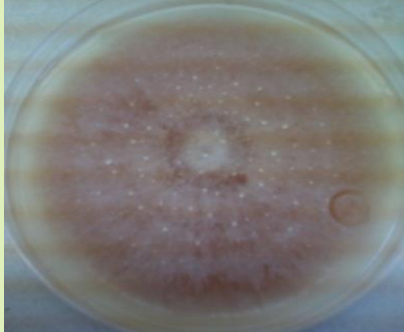
El control más eficaz y sustentable contra el marchitamiento y podredumbre radicular reside en el uso de genotipos resistentes. Sin embargo, se estableció la existencia de una estrecha base genética entre variedades de tabaco comúnmente utilizadas (Zhang *et al.*, 2006a, 2008). A campo se observaron niveles de tolerancia variables con potenciales de inóculo muy alto y condiciones ambientales favorables (LaMondia y Taylor, 1987; LaMondia 2015). Mientras que bajo condiciones controladas, Mueller y Morgham (1996) observaron el comportamiento de variedades susceptibles y resistentes encontrando que la infección de *F.o.* en las variedades resistentes se limitaba a un pequeño segmento del sistema vascular quedando detenido en la parte inferior de la planta y los síntomas ocurrieron solo en las hojas inferiores. A la inversa, en las variedades susceptibles, el patógeno se propagó rápidamente desde el área de infección con aparición concordante de síntomas en la parte superior.

La relación establecida entre, agresividad del patógeno y la susceptibilidad en las variedades de tabaco no se ha abordado en muchos trabajos hasta el momento, por lo que el presente trabajo representa el primer análisis del comportamiento de variedades comerciales de tabaco frente a los patógenos. En la región del NOA se realizaron ensayos comparativos de variedades de tabaco bajo condiciones controladas y a campo con *Rhizoctonia solani* observándose un comportamiento diferencial entre las variedades evaluadas (Mercado Cárdenas, 2016).

La existencia de gran variabilidad en los complejos de *Fusarium* estudiados nos sugiere aumentar el número de aislamientos y de genotipos de tabaco evaluados y sumar otras interacciones posibles en el patosistema, como la interacción con nemátodos por ejemplo, con la finalidad de identificar genotipos resistentes.

Conclusión

La información generada en el presente capítulo nos permitió determinar los niveles de tolerancia al marchitamiento vascular y podredumbre radicular bajo condiciones controladas de las principales variedades de tabaco tipo Virginia cultivadas en el NOA. A su vez, se observó que los aislamientos de *F. o.* mantuvieron el mismo nivel de agresividad para las dos niveles de inóculo evaluados. Ambos complejos incidieron directamente en el largo y peso de raíces. Por otro lado, los aislamientos del complejo *F. s.* incrementaron la severidad a mayor concentración de inóculo. Por tal motivo, los resultados del presente trabajo nos sugieren aceptar la hipótesis de que “las variedades de tabaco actualmente utilizadas en el NOA presentan una susceptibilidad diferencial al marchitamiento vascular y podredumbre radicular ocasionada por miembros de los complejos *F. o.* y *F. s.* estudiados y que la incidencia y severidad de la enfermedad se encuentra asociada a densidad de inóculo presente en el suelo para el complejo *F. s.*”



CAPÍTULO V

Consideraciones finales

El cultivo de tabaco representa una de las actividades productivas más importantes para las provincias de Salta y Jujuy. Se considera que el ciclo completo del cultivo de tabaco es de 330 días, debido a ello es considerada una actividad sumamente intensiva en relación a cantidad de etapas que posee en todo el ciclo productivo. Es una actividad de gran importancia socioeconómica a nivel regional debido a la generación de puestos de trabajo, esta relevancia es aún mayor a nivel de localidades o departamentos, donde se aprecia con mayor claridad su importancia económica. En los últimos años la producción presentó diversos problemas fitosanitarios asociados a enfermedades radiculares, las cuales se manifiestan con un marchitamiento y clorosis de la parte aérea de la planta y podredumbre radicular. Entre ellas, se destacaron el marchitamiento vascular y la podredumbre radicular causadas por especies de *Fusarium*, donde en los últimos años manifiesta un incremento en la prevalencia en diversos lotes tabacaleros en la provincia de Salta y Jujuy. El principal objetivo de este trabajo fue “Conocer la diversidad de *Fusarium* spp. asociadas al marchitamiento vascular y podredumbre radicular en *Nicotiana tabacum* L. para aportar conocimiento a los programas de mejoramiento”.

Unos de los aspectos más importantes a considerar en el estudio de una enfermedad es observar y cuantificar su comportamiento a campo. El relevamiento realizado en dos campañas permitió determinar la presencia de los complejos *F. o.* y *F. s.* asociados al cultivo de tabaco, los cuales no estaban estudiados en la región del NOA. Esto permitió describir los síntomas característicos de ambos complejos, con la posterior verificación de los postulados de Koch. Se estableció la asociación entre el marchitamiento vascular y la podredumbre radicular con variables agronómicas y edafoclimáticas a nivel regional. Esto permite brindar información de utilidad sobre la disminución en la incidencia y severidad de estas enfermedades con la implementación de rotación de cultivo, utilización de almácigos flotantes y de variedades con buen comportamiento a campo. Ambas patologías estudiadas adquirieron una considerable importancia en el segundo y tercer estadio fenológico del cultivo de tabaco, en concordancia con estudios realizados en otros cultivos donde los síntomas son más severos en los estadios avanzados (Jiménez Díaz *et al.*, 2015). Sin embargo, los miembros patógenos del complejo *F. o.* resultaron tener una mayor prevalencia en ambas campañas productivas, por ello detectar su presencia permitirá recomendar medidas de manejo que logren evitar la infección en campañas posteriores. Los aportes realizados en el presente trabajo de tesis podrían ser profundizados sobre la correlación de ambas enfermedades con las características fisicoquímicas de los suelos cultivados con tabaco, presencia e interacción con nemátodos u otras alternativas de manejo biológico.

El presente trabajo de investigación logró como resultado final identificar y caracterizar las especies de *Fusarium* asociadas al tabaco tipo Virginia en el Noroeste Argentino (Salta y Jujuy). Los complejos identificados mostraron una apreciable variabilidad patogénica registrando diferentes Índices de Severidad de la enfermedad y variabilidad morfológica representada a través de tres categorías de agresividad y tres morfotipos descriptos, respectivamente. Los aislamientos obtenidos en el presente trabajo se relacionaron mayormente con *F. o. f. sp. batatas*. Sin embargo, sería de utilidad la realización de pruebas de patogenicidad con los cultivos de batata y algodón para corroborar que los mismos sean específicos para el cultivo de tabaco. En el complejo *F. s.*, se pudo determinar los caracteres morfológicos (forma y número de septos de los macroconidios, forma de microconidios y color esporodoquios) que permiten diferenciarlos en tres morfotipos de los cuales dos de ellos agrupaban la mayor cantidad de aislamientos patógenos. En base al análisis de la secuencia EF-1 α , todos los aislamientos del complejo *F. s.* se incluyeron en un mismo clado en el cual los miembros están asociados con diferentes hospedantes y/o ambientes, por lo que se los describió como patógenos oportunistas o facultativos (Chitrampalam y Nelson, 2016).

La información generada en la presente tesis sobre los complejos *F. o.* y *F. s.*, proporciona por primera vez información sobre la variabilidad de los patógenos asociados con el marchitamiento vascular y de podredumbre radicular en el noroeste argentino en el cultivo de tabaco. A partir de ello se podrá plantear la generación de marcadores moleculares específicos para la determinación de *formas especiales* que permitan la detección temprana y selectiva del patógeno, fortaleciendo la prevención de la enfermedad en todas las etapas de la producción de tabaco.

En la presente tesis se determinaron las variedades con mejor comportamiento bajo condiciones controladas, caracterizando los materiales genéticos utilizados. La existencia de una estrecha base genética en las variedades de tabaco comúnmente empleadas (Zhang *et al.*, 2006) demanda la búsqueda de nuevas fuentes de resistencias a las principales enfermedades que afectan al cultivo en la región. Los resultados encontrados siguieron incorporar las variedades NC71 y PVH2291 en los programas de mejoramiento orientados a la obtención de genotipos con mayores niveles de tolerancia al marchitamiento vascular y la podredumbre radicular. Sin embargo, son necesarios estudios a campo que permitan conocer el comportamiento sanitario y el rendimiento de las variedades evaluadas bajo condiciones de cultivo. Además sería de gran interés realizar estudios adicionales para la determinación de la densidad de inóculo presente en los suelos tabacaleros para ambos complejos para establecer estrategias de control de las enfermedades.

Este trabajo contribuye al desarrollo de estrategias de manejo sostenibles, tales como la utilización de variedades con mayor tolerancia, implementación de rotación de cultivo, y uso de almácigos flotantes en la producción de tabaco.

Publicaciones Derivadas de la presente Tesis

Artículos científicos

Berruezo Lorena A., Mercado Cárdenas Guadalupe E., Harries Eleonora del M.1, Stenglein Sebastián A. Curti Ramiro N., Rodriguero Marcela S., Galván Marta Z. (2017). “Morphological and molecular differentiation of *Fusarium* species associated with tobacco diseases in northwestern Argentina”. *European Journal of Plant Pathology*. DOI 10.1007/s10658-018-1443-6.

En preparación

Berruezo Lorena A., Mercado Cárdenas Guadalupe E., Harries Eleonora del M.1, Stenglein Sebastián A. Y Galván Marta Z. (2017). “Relations of *Fusarium* spp. isolate and inoculum density on resistance screening tests in tobacco”.

Presentaciones en jornadas y congresos: 2013-2017.

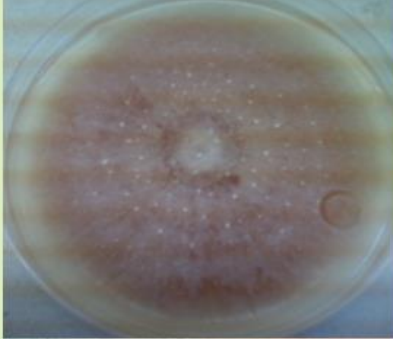
Berruezo L., Mercado Cárdenas G., Spedaletti Y., Chocobar A., Galván M. y Stenglein S. (2013) Análisis molecular de aislamientos de *Fusarium* spp. asociados al marchitamiento vascular en tabaco. XLII Congreso Argentino de Genética. III Reunión Regional SAG-NOA, 20 al 23 de octubre, Salta.

Berruezo L., Mercado Cárdenas G., Harries E., Chocobar A., Galván M. y Stenglein S. (2014). Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de *Nicotiana tabacum* L. 3ª Congreso de Fitopatología, 3, 4 y 5 de junio, Tucumán, Argentina.

Berruezo L., Mercado Cárdenas G., Harries E., Chocobar A., Galván M. y Stenglein S. (2014). Determinación de la patogenicidad de *Fusarium* spp obtenidas en *Nicotiana tabacum* L. en el NOA. 3ª Congreso de Fitopatología, 3, 4 y 5 de junio, Tucumán, Argentina.

Berruezo L., Mercado Cárdenas G., Harries E., Avila N., Chocobar, A., Galván M. y Stenglein S. (2015) Prevalencia e incidencia del marchitamiento vascular en el cultivo de tabaco en el Noroeste argentino. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 7 al 9 de octubre, Rosario-Santa Fé, Argentina.

Berruezo L., Mercado Cárdenas G., Harries E., Avila N., Curti R., Galván M. y Stenglein S. (2017). Determinación de la agresividad de aislamientos de *Fusarium solani* en tabaco.



CAPÍTULO VI

Bibliografía

- Agrios**, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Academic Press, USA.
- Aimé**, S., Alabouvette, C., Steinberg, C. y Olivain, C. 2013. The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26:918-926.
- Alves-Santos**, F. M., Martínez-Bermejo, D., Rodríguez-Molina M. C. y Dieza J. J. 2007. Cultural characteristics, pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Spain. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71:26-32.
- Aoki**, T. y O'Donnell, K. L. 1998. *Fusarium kyushuense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience*, 39:1-6.
- Aoki**, T., O'Donnell, K., y Scandiani, M. M. 2005. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience*, 46:162-183.
- Achicanoy López**, H. 2000. Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín*, 53:941-968.
- Arie**, T., Kaneko, I., Yoshida, T., Noguchi, M., Nomura, Y. y Yamaguchi, I. 2000. Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 13,1333-1339.
- Armstrong**, G. M., y Armstrong, J. K. 1968. *Formae specialis* and races of *Fusarium oxysporum* causing a tracheomyces in the syndrome diseases. *Phytopathology*, 58:1242-1246.
- Arneson**, P.A. 2006. Plant disease epidemiology: temporal aspects. The Plant Health Instructor. On-line DOI:10.1094/PHI-A-2001-0524-01.
- Ávila**, M. N., Berruezo, L., Mercado Cárdenas, G. E. y Harries, E. 2017. Asociación entre dos complejos de *Fusarium* y *Meloidogyne* spp. en lotes productivos tabacaleros del Valle de Lerma, Salta" 4^{to}. Congreso Argentino de Fitopatología, Mendoza.
- Avilés**, B. R., Snapp, S. S., Kelly, J. D. 2003. *Fusarium* root rot of common beans. Extension Bulletin E2876 . (Michigan University).
- Backhouse**, D., Burgess L. W., y Summerell B.A. 2001. Biogeography of *Fusarium*, p. 122-137. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Bagga**, S. y Straney, D. 2000. Modulation of cAMP and phosphodiesterase activity by flavonoids which induce spore germination of *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56:51- 61.
- Baker**, K. J., Cook R. J. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. San Francisco: Freeman
- Barve**, M. P., Haware, M. P., Sainani, M. N., Ranjekar, P. K. y Gupta, V. S. 2001. Potential of microsatellites to distinguish four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* prevalent in India. *Theoretical and Applied Genetics*, 102:38-147.

- Bateman, G. L.** y Murray, G. 2001. Seasonal variation in populations of *Fusarium* species in wheat-field soil. *Applied Soil Ecology*, 18:117-128.
- Baayen, R. P.**, O'Donnell, K., Bonants, P., Cigelnik, E., Kroon, L., Roebroeck, E. y Waalwijk, C. 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic *formae speciales* causing wilt and rot disease. *Phytopathology*, 90: 891-900.
- Belete, E.**, Ayalewb, A. y Ahmed S. 2013. Associations of biophysical factors with faba bean root rot (*Fusarium solani*) epidemics in the northeastern highlands of Ethiopia. *Crop Protection*, 52:39-46.
- Bennett, R. S.**, Spurgeon, D. W., DeTar, W. R., Gerik, J. S., Hutmacher, R. B., y Hanson, B. D. 2011. Efficacy of four soil treatments against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 4 on cotton. *Plant Disease*, 95:967-976.
- Ben-Yephet, Y.**, y Shtienberg, D. 1994. Effects of solar radiation and temperature on *Fusarium* wilt in carnation. *Phytopathology*, 84:1416-1421
- Bhatti, M. A.**, y Kraft, J. M. 1992. Effects of inoculum density and temperature on root rot and wilt of chickpea. *Plant Disease*, 76:50-54.
- Booth, C.** 1971. The genus *Fusarium*. Kew, England: Commonwealth Mycological Institute.
- Bueno, C. J.**, Fischer, I. H., Rosa, D. D., Firmino, A. C., Harakava, R., Oliveira, C. y Furtado, E. L. 2014. *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: a new *forma specialis* causing collar rot in yellow passion fruit. *Plant Pathology*, 63:382-389.
- Cámara del tabaco de Jujuy**
http://www.tabacojujuy.com.ar/noticias/index.php?option=com_content&view=article&id=3824:produccion-nacional&catid=72:produccion&Itemid=121. (verificado marzo 2018).
- Caligiore Gei, P. F.**, Valdez J. G., Piccolo R. J. y Galmarini C. R. 2014. Influence of *Fusarium* spp. isolate and inoculum density on resistance screening tests in onion. *Tropical Plant Pathology*, 39:19-27.
- Campbell, C. L.** y Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley, NYGoogle Scholar.
- Chandra, N. S.**, Wulff, E. G., Udayashankar, A. C., Nandini, B. P., Niranjana, S. R., Mortensen, C. N. y Prakash, H. S. 2011. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90:1625-1639.
- Chehri, K.**, Ghasempour, H. R., y Karimi, N. 2014. Molecular phylogenetic and pathogenetic characterization of *Fusarium solani* species complex (FSSC), the cause of dry rot on potato in Iran. *Microbial Pathogenesis*, 67:4-19.

- Chehri, K., Salleh, B., y Zakaria, L.** 2015. Morphological and phylogenetic analysis of *Fusarium solani* species complex in Malaysia. *Microbial Ecology*, 69:457-471.
- Chehri, K.** 2016. Molecular identification of pathogenic *Fusarium* species, the causal agents of tomato wilt in western Iran. *Journal of Plant Protection Research*, 56:143-148.
- Chitrampalam, P., y Nelson, Jr, B.** 2016. Multilocus phylogeny reveals an association of agriculturally important *Fusarium solani* species complex (FSSC) 11, and clinically important FSSC 5 and FSSC 3+ 4 with soybean roots in the north central United States. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109:335-347.
- Chung, W. C., Chen, L. W., Huang, J. H., Huang, H. C. y Chung, W. H.** 2011. A new 'forma specialis' of *Fusarium solani* causing leaf yellowing of Phalaenopsis. *Plant Pathology*, 60:244-252.
- Clark, C. A., Hyun, J. W., y Hoy, M. W.** 1998. Relationships among wilt-inducing isolates of *Fusarium oxysporum* from sweetpotato and tobacco. *Plant Disease*, 82:530-536.
- Cook, R. J.** 1980. *Fusarium* foot rot of wheat and its control in the Pacific Northwest. *Plant Disease* 64:1061-1066.
- Cook, R.J. y Baker, K.F.** 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.
- Cook, R. y Yarham, D.** 2006. Epidemiology in sustainable systems. In: COOKE B., JONES D., KAYE B. (eds) *The Epidemiology of Plant Diseases*. Springer, Dordrecht
- Corden, M. E.** 1965. Influence of calcium nutrition on *Fusarium* wilt of tomato and polygalacturonase activity. *Phytopathology*, 55:222-224.
- Costa, S. S., Matos, K. S., Tessmann, D. J., Seixas, C., y Pfenning, L.** 2015. *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. *Fungal Biology*, 120:51-60.
- Cuellar, D., Aparicio M., Mercado Cárdenas G. E., Galván M., et al.,** 2013. Variabilidad genética en germplasma de tabaco tipo Virginia empleando marcadores moleculares. *Ciencia y tecnología de los cultivos Industriales*. Año 3.Nº4.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., y Posada, D.** 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Natural Methods*, 9:772-772.
- Días C.** 2013. Apuntes curso "Fitopatología". Universidad Nacional de Tucumán.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W.** 2017. InfoStat Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.

- Doyle J. J.**; Doyle J. L. 1990. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.
- Edel-Hermann V.**, Gautheron N., Steinberg C. 2012. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* and related species pathogenic on tomato in Algeria and other Mediterranean countries. *Plant Pathology*, 61:787- 800.
- Edgington, C. W.** y Walker, J. C. 1958. Influence of calcium and boron nutrition on development of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology*, 48:24-326.
- Engelhard, A. W.** y Woltz, S. S., 1973. Fusarium wilt of chrysanthemum: complete control of symptoms with an integrated fungicide-lime-nitrogen regime. *Phytopathology*, 63:1256-1259.
- Fernández de Ullivarri, D.** 1990. El cultivo de los tabacos claros. Centro regional Salta-Jujuy EEA Salta. Argentina. Edición Comunicaciones Agropecuarias.
- Friedman, M.** 1937. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *Journal of American Statistical Association*, 32:75-701.
- Food and Agriculture Organization-** FAO (2015) Production Crops. <http://www.fao.org/docrep/006/y4956e/y4956e04.htm#bm04.2>. (verified may, 2017).
- Fogliata, G.**, Martínez, C., Acosta, M., Muñoz M., y Ploper, L. 2013. First Report of *Fusarium* Rot Caused by *Fusarium oxysporum* on Lemon in Tucumán, Argentina. *Plant Disease*, 97:989-998.
- Fraç, M.**, Gryta A., Oszust K. y Kotowicz N. 2016. Fast and accurate microplate method (Biolog MT2) for detection of *Fusarium* fungicides resistance/sensitivity. *Front Microbiology*, 7:489.
- Fracchia, S.**, Garcia-Romera, I., Godeas, A. y Ocampo, J. A. 2000. Effect of the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. *Plant and Soil*, 223:177-186.
- Fujinaga, M.**, Ogiso, H., Shinohara, H., Tsushima, S., Nishimura N., Togawa M., Saito H., y Nozue M. 2005. Phylogenetic relationships between the lettuce root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* races 1, 2, and 3 based on the sequence of the intergenic spacer region of its ribosomal DNA. *Journal of General Plant Pathology*, 71:402-407.
- Fourie, G.**, Steenkamp, E. T., Gordon, T. R. y Viljoen, A. 2009. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* vegetative compatibility groups. *Applied Environment and Microbiology*, 75:4770-4781.
- Gaetán, S. A.** 2005. Occurrence of Fusarium wilt on canola caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in Argentina. *Plant disease*, 89:432-432.

- Gerstel**, D. U., y Burk, L. G. 1960. Controlled introgression in *Nicotiana*: a cytological study. *Tobacco Science*, 4:147-50.
- Gerlach**, W. y Nirenberg H. 1982. The Genus *Fusarium*—a Pictorial Atlas. Berlin. Dahlem Hept 209-406.
- Gerstel**, D. U. 1963. Segregation in new allopolyploids of *Nicotiana*. II. Discordant ratios from individual loci in 6x (*N. tabacum* x *N. sylvestris*). *Genetics*, 48:677.
- Gimenez Monge**, J. L., Mercado Cárdenas, G., Lacci, F., Ortega, A., y Arzeno, J. L. 2009. Un enfoque integral del amarillamiento del tabaco. *Revista: Panorama Agropecuario. Centro regional Salta y Jujuy*, Año10 N°52.
- Glass**, N. L., Metznerberg, R. L. y Raju, N. B. 1990. Homothallic Sordariaceae from nature: the absence of strains containing only the mating type sequence. *Experimental Mycology*, 14:274-289.
- Goodspeed**, T. H. 1954. The genus *Nicotiana*. *Chronica Botanica* 16:1-536.
- Gordon**, T. R. y Martyn, R. D. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35:111-128.
- Gritton**, E. T., Jones, G. L., Powell, N. T. y Matzinger, D. F. 1965. Inheritance of resistance to *Fusarium* wilt in flue-cured tobacco. *Crop Science*, 5:547-550.
- Guindon**, S. y Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52:696-704.
- Harman**, G. E., Mattick, L. R., Nash, G. y Nedrow, B. L. 1980. Stimulation of fungal spore germination and inhibition of sporulation in fungal vegetative thallic by fatty acids and their volatile peroxidation products. *Canadian Journal of Botany*, 58: 541-1547.
- Hawks**, W. K. y Collins S. N. 1986. Principles of Flue-Cured Tobacco Production. *Field Crops Research*.
- Harrow**, S., Farrokhi-Nejad, R., Pitman, A., Scott, I., Bentley, A., Hide, C. et al., 2010. Characterization of New Zealand *Fusarium* populations using a polyphasic approach differentiates the *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/*F. tricinctum* species complex in cereal and grassland systems. *Fungal Biology*, 114:293-311.
- Hornok**, L., Waalwijk, C. y Leslie, J. F. 2007. Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 119:54-58.
- Huang**, L. W., Wang, C. J., Lin, Y. S., Chung, W. C. y Chung, W. H. 2014. Stem rot of jewel orchids caused by a new forma specialis, *Fusarium oxysporum* f. sp. *anoectochili* in Taiwan. *Plant Pathology*, 63:539-547.

- Jiménez Díaz**, R .M., Castillo, P., Jiménez-Gasco, M., Landa B. y Navas-Cortez J. A. 2015. Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Protection*, 73:16-27.
- Jiménez-Gasco**, M. M. y Jiménez-Díaz, R. M. 2003. Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6. *Phytopathology*, 93:200-209.
- John**, R. P., Tyagi R. D., Prevost D., Brar S. K., Pouleur S., y Surampalli R. Y. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection*, 29:1452-1459.
- Johnson**, J. 1921. Fusarium-wilt of tobacco. *Journal of Agricultural Research*, 20:515-535.
- Jones**, J. P. y Woltz, S. S. 1969. Fusarium wilt (Race 2) of tomato: calcium, pH and micronutrient effects on disease development. *Plant Disease*, 53:276-277.
- Jones**, J. P. y Woltz, S. S. 1972. Effect of soil pH and micronutrient amendments on *Verticillium* and *Fusarium* wilts of tomato. *Plant Disease*, 56:151-153.
- Jones**, M. J. y Epstein L. 1990. Adhesion of macroconidia to the plant surface and virulence of *Nectria haematococca*. *Applied and Environmental Microbiology* 56:3772-3778.
- Kauss**, H. 1985. Callose biosynthesis as a Ca²⁺-regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. *Journal of Cell Science Supplement* 2:89-103.
- Kawabe**, M., Kobayashi Y., Okada G., Yamaguchi I., Teraoka T. y Arie T. 2005. Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, MAT1, and pg1, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. *Journal of General Plant Pathology*, 71:263-272.
- Kawabe**, M., Katsube K., Yoshida T., Arie T. y Tsuchiya K. 2007. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *spinaciae* in Japan based on phylogenetic analysis of rDNA-IGS and MAT1 sequences. *Journal of General Plant Pathology*, 73:353-359.
- Kerenyi**, Z., Moretti, A., Waalwijk, C., Oláh, B. y Hornok, L. 2004. Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Applied and Environmental microbiology*, 70:4419-4423.
- Keszthelyi**, A., Jeney, A., Kerényi, Z., Mendes, O., Waalwijk, C. y Hornok, L. 2007. Tagging target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91: 373-391.
- Knapp**, S., Chase, M. W. y Clarkson, J. J. 2004. Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxonomy*, 53:73-82.

- Kistler**, H. C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 87:474-479.
- Koyyappurath**, S., Atuahiva, T., Le Guen, R., Batina, H., Le Squin, S., Gautheron, N. y Liew, E. C. Y. 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla. *Plant Pathology*, 65:612-625.
- LaMondia**, J. A. y Taylor, G. S. 1987. Influence of the tobacco cyst nematode (*Globodera tabacum*) on Fusarium wilt of Connecticut broadleaf tobacco. *Plant Disease*, 71:1129-1132.
- LaMondia**, J.A., Taylor, G.S., 1991. New Fusarium wilt-resistant Connecticut broadleaf tobacco varieties. *Connecticut Agriculture, Exp. Stn. Bull.* 891.
- LaMondia**, J. A. 1990. Pathogenicity and vegetative compatibility of *Fusarium oxysporum* isolated from tobacco. *Tobacco International*, 192: 58-61.
- LaMondia**, J. A. 1992. Predisposition of broadleaf tobacco to Fusarium wilt by early infection with *Globodera tabacum* or *Meloidogyne hapla*. *Journal of Nematology*, 24:425-431.
- LaMondia**, J. A. 1995. Influence of resistant tobacco and tobacco cyst nematodes on root infection and secondary inoculum of *Fusarium oxysporum* f.sp. *nicotianae*. *Plant Disease*, 79:337-340.
- LaMondia**, J. A., Rathier, T. M., 1995. The influence of plant nutrition on Fusarium wilt of broadleaf tobacco. *Tobacco Science*, 39:111-116.
- LaMondia**, J. A. 2015. Fusarium wilt of tobacco. *Crop Protection*, 73:73-77.
- Laurence**, M. ., Summerell, B. A., Burgess, L. W. y Liew, E. C. 2014. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biology*, 118:374-384.
- Leslie**, J. F., Pearson, C. A., Nelson, P. E. y Toussoun, T. A. 1990. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Ecological Studies*, 44:63-66.
- Leslie**, J. F. 1991. Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section Liseola). *Phytopathology*, 81:1058-1060.
- Leslie**, J. y Summerell, S. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Ed. Blackwell Publi. Iowa, USA. 388.
- Lievens**, B., Rep, M. y Thomma, B. 2008. Recent developments in the molecular discrimination of *formae speciales* of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science*, 64:781-788.
- Lievens**, B., Van Baarlen P., Verreth C., Van Kerckhove, S., Rep, M. y Thomma, B. 2009. Evolutionary relationships between *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* and *F.*

- oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* isolates inferred from mating type, elongation factor-1 alpha and exopolygalacturonase sequences. *Mycological Research*, 113:1181-1191.
- Lori, G.**, Edel-Hermann, V., Gautheron, N. y Alabouvette, C. 2004. Genetic Diversity of Pathogenic and Nonpathogenic Populations of *Fusarium oxysporum* Isolated from Carnation Fields in Argentina. *Phytopathology*, 94:661-668.
- Lucas, G.** 1975. Diseases of Tobacco. Third Edition. Biological Consulting Associates Box 5726. Raleigh, North Carolina, 174-190.
- McDonald, B.** y Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review Phytopathology*. 40:349-79.
- Madden, L. V.**, Hughes, G. y Van den Bosch, F. 2007. The Study of Plant Disease Epidemics. St Paul MN, American Phytopathological Society, USA.
- Malbrán, L.**, Mourelos, C., Mitidieri, M., Ronco, B. y Lori, G. 2016. Fusarium Wilt of Lettuce Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Argentina. *Plant Disease*, 98:1281-1292.
- Mantel, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27:209-220.
- March, G. J.**, Marinelli A. y Oddino C. 2007. Análisis del progreso de epidemias y pérdidas que causan. Apuntes del curso de postgrado Fundamentos de Fitopatología. Escuela para Graduados de la FAUBA.
- March, G. J.**, Oddino, C. y Marinelli, A. 2010. Manejo de las enfermedades de los cultivos según parámetros epidemiológicos. 1a ed. Córdoba, 193p.
- Martinez-Garnica, M.**, Nieto-Munoz, F., Hernandez-Delgado, S., y Mayek-Perez, N. 2014. Pathogenic and genetic characterization of Mexican isolates of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder & Hans. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 31:539-557.
- Mayr, E.** 1963. Animal Species and Evolution. Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts.
- Mercado Cárdenas, G. E.**, Carmona M., March G., Pérez Brandán C. y Correa O. 2008. Relevamiento de microorganismos de suelo patógenos del cultivo de tabaco. 1º Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de Resúmenes: 136.
- Mercado Cárdenas, G. E.**, Galván, M. Z., Barrera, V. A., Rodriguero, M. S., Carmona, M. A., March, G. J. y Shew, H. D. 2015. Molecular identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from tobacco growing areas in northwestern Argentina. *Tropical Plant Pathology*, 40:160-168.

- Mercado Cárdenas**, G. E. 2016. Aspectos biológicos y epidemiológicos de enfermedades del tabaco causadas por *Rhizoctonia solani*, en el noroeste argentino. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias.
- Miniagri**, 2014. Informe de productos regionales. Ministerio de Agroindustria. Presidencia de la Nación. http://www.agroindustria.gov.ar/sitio/areas/tabaco/produccion_mercados/interno
- Mora Aguilera**, G. 2008. Bases de estudios epidemiológicos para el manejo de patosistemas agrícolas. Taller Internacional de vigilancia epidemiológica. Colegio para postgraduados. Montecilla, México.
- Mora Aguilera**, G., March, G., Marinelli, A. y Micherff S. 2012. Epidemiología. Fundamentos y Aplicaciones en Patosistemas Agrícolas. UNRC.
- Mueller**, W. C. y Morgham, A. T. 1996. Ultrastructure of the vascular responses of tobacco to *F. o. f. sp. nicotianae*. Canadian Journal of Botany, 74:1273-1278.
- Nadir**, A. y Chafatinos, T. 1990. <https://inta.gov.ar/documentos/adecuacion-a-un-sistema-de-informacion-geografica-del-estudio-los-suelos-del-noa-salta-y-jujuy-nadir-a.-chafatinos-t.-1990>
- Nalim**, F., Samuels, G., Wijesundera, R. L. y Geiser, D. M. 2011. New species from the *Fusarium solani species complex* derived from perithecia and soil in the Old World tropics. Mycologia, 103:1302-1330.
- Navas-Cortés**, J. A., Alcalá-Jiménez, A. R., Hau, B., Jiménez-Díaz, R.M. 2000. Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. European Journal of Plant Pathology, 106:135-146.
- Nelson**, P. E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En: Fungal Wilt Diseases of Plants. Mace, M.E., Bell, A.A., Beckman, C.H. (Eds.). (Capítulo 3). Academic Press, New York, 51-80.
- Nelson**, P. E., Toussoun T. A. y Marasas W. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Nutter**, F. W. 2001. Disease assessment terms and concepts. En: Encyclopedia of plant Pathology (Maloy O.C. y Murays T.D. eds). John Wiley and Sons, Ind.NY 312-323.
- Ochoa**, J., Yangari, B., Ellis, M., y Williams R. 2004. Two new formae specialis of *Fusarium oxysporum*, causing vascular wilt. Biologia Molecular, 39:10-17.
- Oddino**, C. M., Marinelli, A. D., Auza, M. y March, G. J. 2008. Influence of crop rotation and tillage on incidence of brown root rot of peanut caused by *Fusarium solani* in Argentina. Canadian Journal of Plant Pathology, 30:575-580.

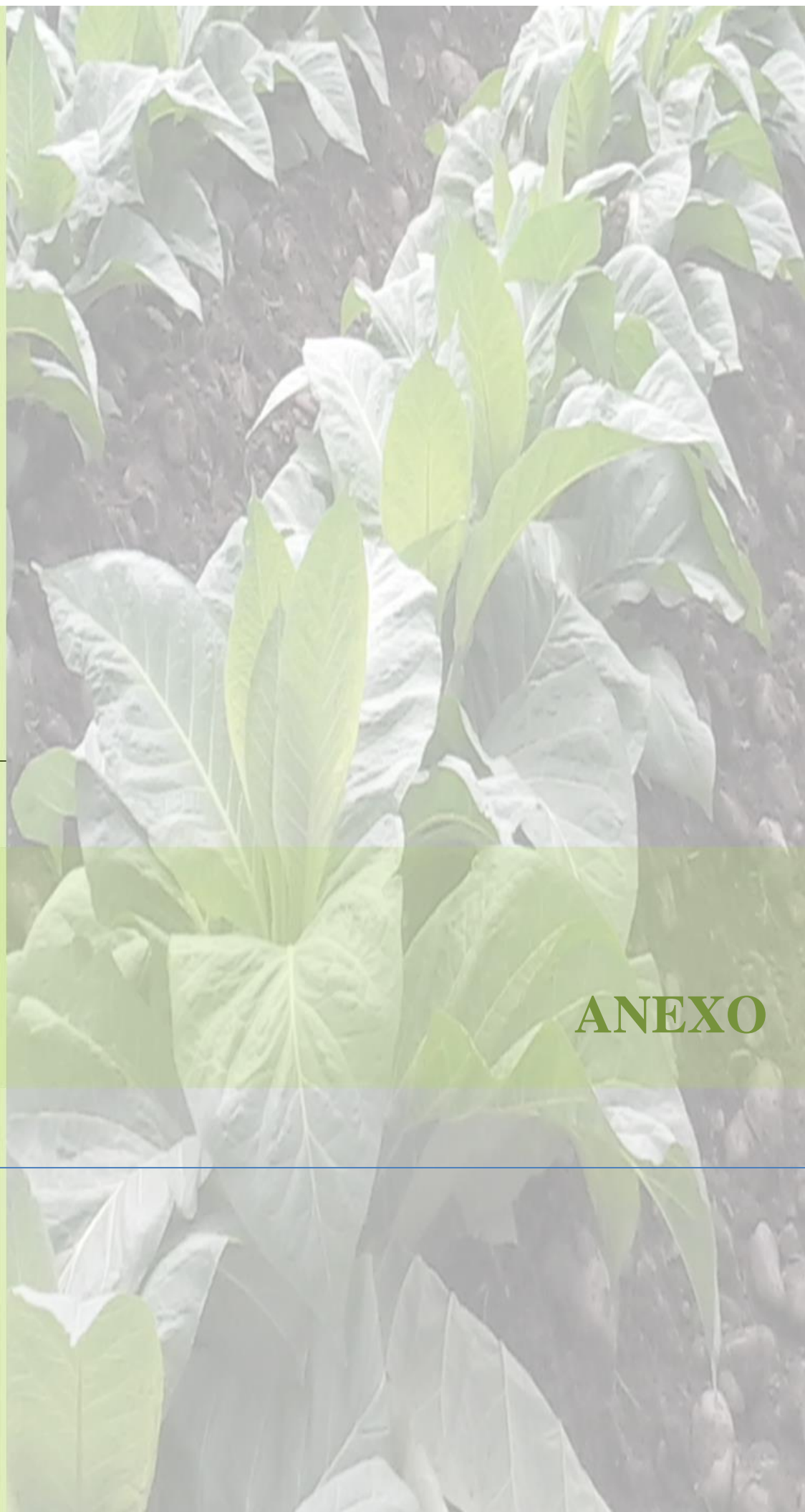
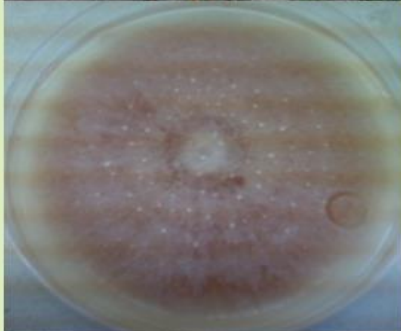
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E. y Ploetz, R. C.** 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panamá disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:2044-2049.
- O'Donnell, K.** 2000. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 919-938.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Magnon, K. C., Cox, P. A., Revankar, S. G., Sanche, S., Geiser, D. M., Juba, J. H., Van Burik, J.-A. H., Padhye, A., Anaissie, E. J., Francesconi, A., Walsh, T. J. y Robinson, J. S.** 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42:5109-5120.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M. G., Brandt, M.E. y Geiser, D. M.** 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani species complex*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:2477-2490.
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A. y Van Der Lee, T.** 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 46:936-948.
- O'Donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Sarver, B. A., Balajee, S. A., Schroers, H. J. y Aoki, T.** 2010. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 48:3708-3718.
- Pérez, B. A., Farinon O. M. y Berretta M. F.** 2011. First report of *Fusarium solani* causing root rot of olive in southeastern Argentina. *Plant Disease*, 95:1476.
- Pérez, L., Colque G., Osinaga R., Corvalan E., Arseno J. L.** 2009. Características físico químicas de los suelos de Valle de Lerma y su relación con el manejo. www.inta.gov.ar/.../Sist.../45-Caract-suelos-ValledeLerma-relacion-Manejo.pdf . 4 p.
- Piccolo, M. A.** 2004. Producción y Comercialización Mundial y Nacional de Tabaco. INTA EEA Salta. 12p.
- Pinaria, A. G., Laurence, M. H., Burgess, L. W. y Liew, E.** 2015. Phylogeny and origin of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in Indonesia. *Plant Pathology*, 64:1358-1365.
- Poggeler, S. y Kuck U.** 2001. Identification of transcriptionally expressed pheromone receptor genes in filamentous ascomycetes. *Gene*, 280: 9-17.

- Powell**, N. T. 1971. Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. Annual Review of Phytopathology, 9:253-274.
- Ramírez**, L. 2014. Poblaciones y tipos de apareamiento en *Fusarium*. V Workshop latinoamericano sobre *Fusarium*. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba.
- Rodríguez-Molina**, M. C., Morales-Rodríguez, M. C., Palo, C., Osuna, M. D., Iglesias, M. J., García, J. A. 2013. Pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD analysis of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Extremadura. European journal of Plant Pathology, 136:639-650.
- Ronquist**, F., Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes. 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19:1572-1574.
- Ronquist**, F., Teslenko, M., Van der Mark, P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology, 61:539-42.
- Ruan**, Y., Kotraiah, V. y Straney, D. C. 1995. Flavonoids stimulate spore germination in *Fusarium solani* pathogenic on legumes in a manner sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. Molecular Plant-Microbe Interactions, 8:929-938.
- Saremi**, H., Burgess, L.W. y Backhouse D. 1999. Temperature effects on the relative abundance of *Fusarium* species in a model plant-soil ecosystem. Soil Biology and Biochemistry, 31:941-947.
- Scandiani**, M., Carmona, M., Luque, M., Matos, K., Lenzi, L. y Formento, A. 2012. Isolation, identification and damages associated with sudden death syndrome in soybean cultivation in Argentina. Tropical Plant Pathology, 37:358-362.
- Schroers**, H. J., Samuels, G. J., Zhang, N., Short, D. P., Juba, J. y Geiser, D. M. 2016. Epitypification of *Fusisporium (Fusarium) solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. Mycologia, 108:806-819.
- Scott**, J. C., Gordon, T., Kirkpatrick, S. C., Koike, S. T., Matheron, M. E., Ochoa, O. E., Truco, M. J. y Michelmore, R.W. 2012. Crop rotation and genetic resistance reduce risk of damage from *Fusarium* wilt in lettuce. California Agriculture, 66:20-24.
- Shew**, H. D. y Lucas, G. B. 1991. Compendium of tobacco diseases. St Paul, MN. APS.
- Silvestro**, L. B., Stenglein, S. A., Forjan, H., Dinolfo, M. I., Arambarri, A. M., Manso, L., y Moreno, V. 2013. Occurrence and distribution of soil *Fusarium* species under wheat crop in zero tillage. Spanish Journal of Agricultural Research, 11:72-79.
- Snyder**, W. C. y Hansen, H. N. 1940. The species concept in *Fusarium*. American Journal of Botany, 27: 64-67.

- Southwood**, M. J., Viljoen, A., Mostert, L., Rose, L. J. y McLeod, A. 2012. Phylogenetic and biological characterization of *Fusarium oxysporum* isolates associated with onion in South Africa. *Plant disease*, 96:1250-1261.
- Stenglein**, S. A. y Balatti, P. A. 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by virulence and molecular markers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68:58-67.
- Stenglein**, S. A., Rodruigero M. y Chandler E. 2010. Phylogenetic relationships of *Fusarium poae* based on EF-1 alpha and mtSSU sequences. *Fungal Biology*, 114:96-106.
- Steinkellner**, S. y Langer, I. 2004. Impact of tillage on the incidence of *Fusarium* spp. in soil. *Plant Soil*, 267:13-22.
- Stotzky**, G. y Martin, R.T. 1963. Soil mineralogy in relation to the spread of Fusarium wilt of banana in Central America. *Plant and Soil*, 18:317-337.
- Sugha**, S. K., Kapoor, S. K. y Singh, B. M. 1994. Factors influencing Fusarium wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 24:97-102.
- Summerell**, B. A., Leslie, J. F., Liew, E. , Laurence, M. H., Bullock, S., Petrovic, T., Bentley, A. R., Howard, C. G., Peterson, S. A. y Walsh, J. L. 2011. *Fusarium* species associated with plants in Australia. *Fungal Diversity*, 46:1-27.
- Sutherland**, R., Viljoen, A., Myburg, A. A. y Berg, N. 2013. Pathogenicity associated genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *South African Journal of Science*, 109:1-10.
- Taylor**, G. S. 1987. Nematicide alternatives for Connecticut cigar tobacco. *Phytopathology*, 77-122.
- Thiessen**, L. 2016. Flue-Cured Information. Disease management practices. <https://content.ces.ncsu.edu/flue-cured-tobacco-information/managing-diseases>.
- Thompson**, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
- Tjamos**, S. E., Markakis, E. A., Antoniou, P., y Paplomatas, E. J. 2006. First record of Fusarium wilt of tobacco in Greece imported as seedborne inoculum. *Journal of Phytopathology*, 154:193-196.
- Toledo-Souza**, E., Silveira, P.M., Café-Filho, A. C y Lobo Junior, M. 2012. Fusarium wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47:1031-1037
- Toncovich**, M. E y Piccolo, M. A. 2008. Cadena de Tabaco Salta-Jujuy. INTA EEA Salta. 8p.

- Tu, J. C.** 1994. Effects of soil compaction, temperature, and moisture on the development of the Fusarium root rot complex of pea in southwestern Ontario. *Phyto protection*, 75:125-131.
- VanEtten, H. D.** 1978. Identification of additional habitats of *Nectria haematococca* mating population VI. *Phytopathology*, 68:1552-1556.
- Vanderplank, J. E.** 1963. *Plant Diseases: epidemics and control*. New York: Academic Press, 349p.
- Vargas Gil, S., Haro, R., Oddino, C., Kearney, M., Zuza, M., Marinelli, A. y March G. J.** 2008. Crop management practices in the control of peanut diseases caused by soilborne fungi. *Crop Protection*, 27:1-9.
- Wang, B., Brubaker C. L. y Burdon J. J.** 2004. *Fusarium* species and Fusarium wilt pathogens associated with native *Gossypium* populations in Australia. *Mycological Research*, 108:35-44.
- Wang, H. C., Wang, M. S., Xia, H. Q., Yang, S. J., Guo, Y. S., Xu, D. Q., Li, W. H., Xiang, Y., Shang, S. H. y Shi, J. X.** 2013. First report of Fusarium wilt of tobacco caused by *Fusarium kyushuense* in China. *Plant Disease*, 97:424.
- Weideman, H. y Wehner F. C.** 1993. Greenhouse evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* for biological control of citrus root rot in soils naturally and artificially infested with *Phytophthora nicotianae*. *Phytophylactica*, 25:101-106.
- Wollenweber, H. W. y Reinking, O. A.** 1935. *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany.
- Woltz, S. S. y Jones, J. P.** 1973. Interactions in source of nitrogen fertilizer and liming procedure in the control of Fusarium wilt of tomato. *HortScience*, 8:137-138.
- Yoder, O. C., Valent, B. y Chumley, F.** 1986. Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, 76: 383-385.
- Yun, S. H., Arie, T., Kaneko, I., Yoder, O. C. y Turgeon, B. G.** 2000. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic and asexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genetic Biology*, 31:7-20.
- Zhang, H.; Liu X.; Li, T. S. y Yang, Y.** 2006a. Genetic diversity among flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) revealed by amplified fragment length polymorphism. *Botanical Studies*, 47:223-229.
- Zhang, H.; Liu X.; He, C. y Yang, Y.** 2008. Genetic diversity among Flue-cured tobacco cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51:1097-1101.

Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D., Nalim, F. A., Summerbell, R. C., Padhye, A. A., y Geiser, D. M. 2006b. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 2186-2190.



ANEXO

Tabla A1. Características del tipo de asociación de suelos para la provincia de Salta.

Nombre del suelo	Limitación	Clase	Clasificación FAO	Clasificación USDA	Características
Vaqueros	Erosión ligera a moderada; pendiente del 2 al 4 %, profundidad efectiva 42 cm.	c	Fluvisol éútrico	Udorthente típico	Suelo de incipiente desarrollo; con perfil A, C; de textura media, bien drenado; moderadamente ácido; contenido de materia orgánica bajo; capacidad de intercambio catiónico moderadamente alta; porcentaje de saturación de bases alto; pendiente del 2 al 4 %; erosión ligera a moderada.
La Merced	Erosión ligera; anegabilidad temporaria.	b	Fluvisol éútrico	Udifluvente típico	Suelo de incipiente desarrollo; con perfil A, C; con texturas medianamente gruesa en superficie y media a medianamente gruesa en profundidad; moderadamente bien drenado; neutro a moderadamente alcalino; contenido de materia orgánica bajo; presencia de carbonatos; capacidad de intercambio catiónico baja a media; porcentaje de saturación de bases alto; pendiente del 2 %, erosión ligera.
Cerrillos	Erosión moderada, anegabilidad poco frecuente; pendiente del 4 %; salinidad moderada.	c	Regosol calcáreo	Haplustepte típico	Suelo de incipiente desarrollo; con perfil A, C; de textura media; bien drenado; moderada a extremadamente alcalino; salino; contenido de materia orgánica bajo; capacidad de intercambio catiónico moderadamente alta; porcentaje de saturación de bases; pendiente del 2 al 6 %; erosión moderada.
Ampascachi	Erosión moderada, pendiente del 5%, ligera salinidad, anegabilidad poco frecuente.	c	Phaeozem calcáreo	Haplustol típico	Suelo de incipiente desarrollo; con perfil A, C; de texturas medianamente gruesa en superficie y medianamente gruesa a medianamente fina en profundidad; moderadamente bien drenado; moderadamente alcalino; contenido de materia orgánica baja; abundante cantidad de carbonatos en profundidad; capacidad de intercambio catiónico moderadamente alta a alta; porcentaje de saturación de bases alto; pendiente del 2 al 6%; erosión moderada; anegabilidad poco frecuente.

Tabla A2. Características del tipo de asociación de suelos para la provincia de Jujuy.

Nombre del suelo	Limitación	Clase	Clasificación FAO	Clasificación USDA	Características
Perico	Erosión ligera a moderada.	a b	Fluvisol éutrico	Ustifluvente mólico	Suelo de incipiente desarrollo; con perfil A, C; de textura media; bien a moderadamente bien drenado; neutro; contenido de materia orgánica bajo; capacidad de intercambio catiónico media; porcentaje de saturación de bases alto; pendiente del 0 al 1 %; erosión ligera a moderada.
Monterrico	Erosión ligera.	b	Fluvisol éutrico	Haplustol fluvéntico	Suelo de incipiente desarrollo; con perfil A, C; de texturas media en superficie y media a medianamente fina en profundidad; bien a moderadamente bien drenado; neutro; contenido de materia orgánica bajo; capacidad de intercambio catiónico moderadamente alta a media; porcentaje de saturación de bases alto; pendiente del 1 %; erosión ligera.
Zapallar	Nivel freático alto, anegabilidad temporaria.	b	Phaeozem lúvico	Haplustalf psamméntico	Suelo de moderado desarrollo; con perfil A, B2, C; de texturas medianamente fina en superficie a gruesa en profundidad; algo excesiva a excesivamente drenado; moderadamente ácido a neutro; contenido de materia orgánica bajo; capacidad de intercambio catiónico media a baja; porcentaje de saturación de bases alto; pendiente del 1 al 2 %; erosión ligera.
Palpalá	Erosión moderada imperfectamente drenado.	ligera; a b	Phaeozem háplico	Hapludol aquértico	Suelo débilmente desarrollado; con perfil A, AC, C; de texturas media en superficie a medianamente fina en profundidad; moderada a imperfectamente drenado; moderadamente ácido a neutro; contenido de materia orgánica alto; capacidad de intercambio catiónico moderadamente alta; porcentaje de saturación de bases alto; pendiente del 1 al 2 %; erosión ligera.

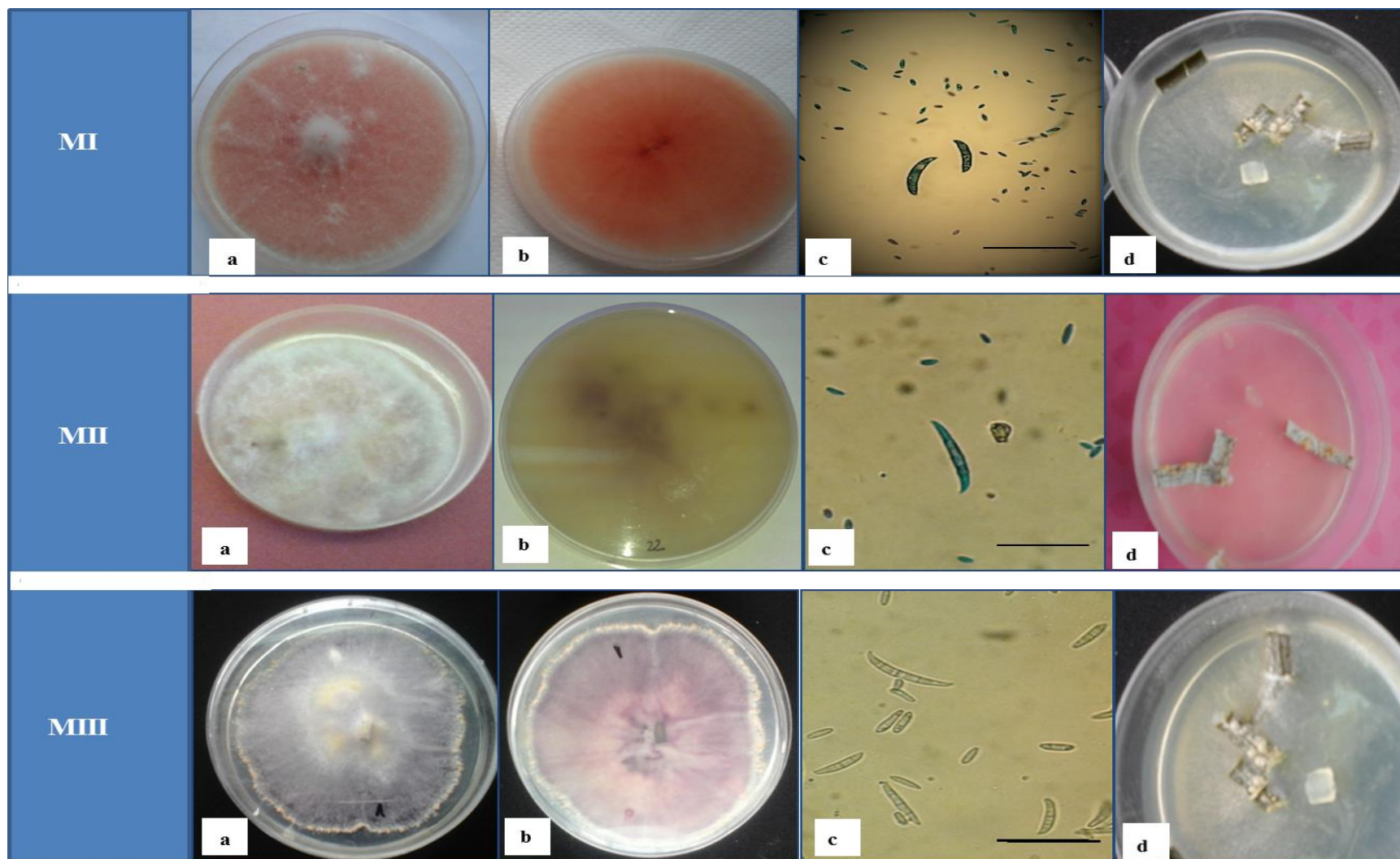


Figura A1. Características más sobresalientes de los tres morfotipos para el complejo *F.o.*; a y b) color de colonia en APG (frente y reverso), c) forma de macro y microconidios d) color de esporodocios en CLA. c) — barra de escala=50μm

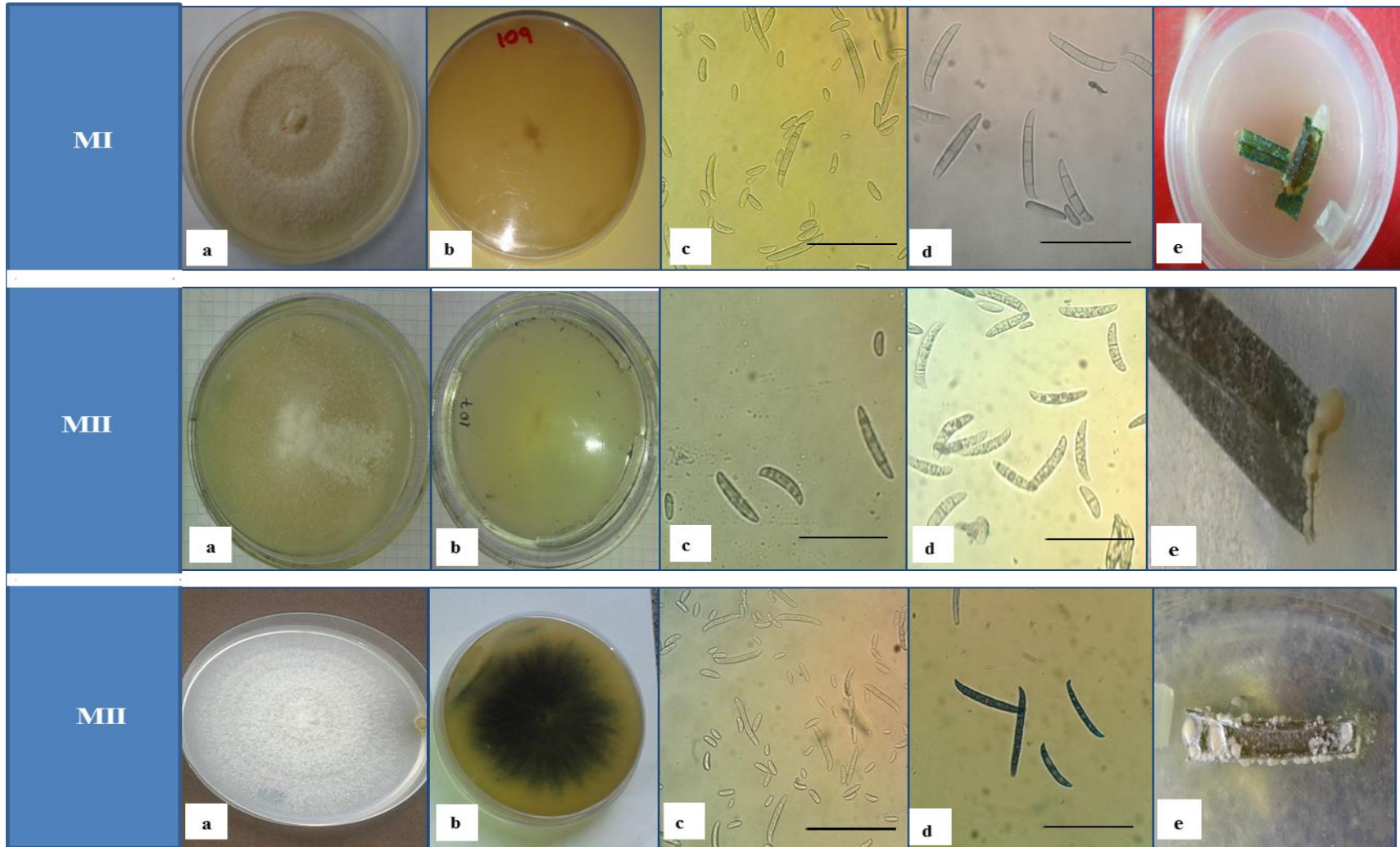


Figura A2. Características más sobresalientes de los tres morfotipos para el complejo *F.s.*; a y b) color de colonia en APG (frente y reverso), c) forma de macro y microconidios y d) color de esporodoquios en CLA. c-e) ————— barra de escala=50µm

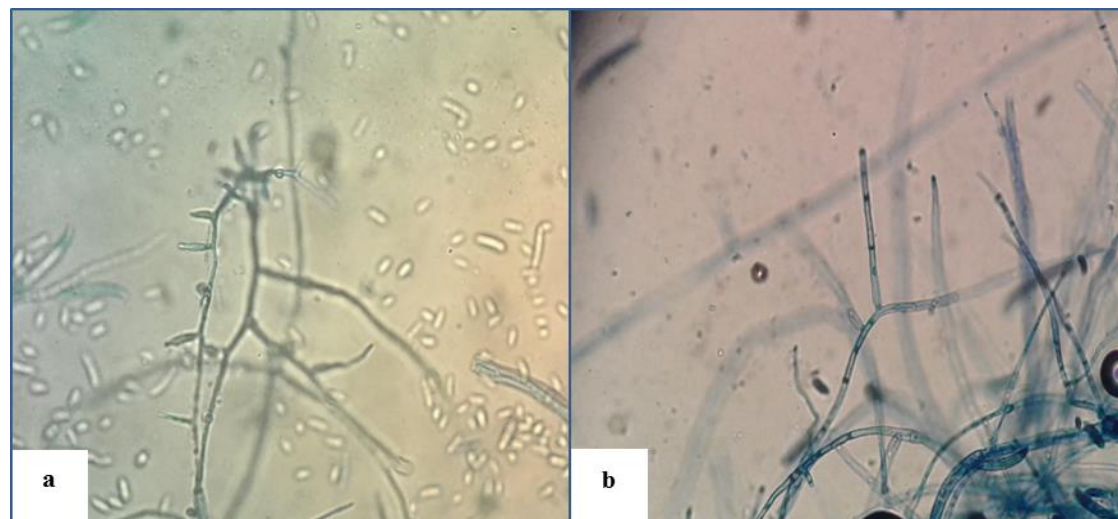


Figura A3. a) microconidios formados a partir de monofialides cortas en el complejo *F.o.*; b) microconidios formados a partir de monofialides largas en el complejo *F.s.*

Tabla A3. Modelos empíricos para describir la relación dada entre dos o más variables en la simulación del progreso de la enfermedad.

Modelo	Ecuación Diferencial	Forma Integral	Forma Linearizada
Exponential	$dy/dt = re y$	$y = y_0 \exp(rt)$	$\log y = \log y_0 + rt$
Monomolecular	$dy/dt = rm (1-y)$	$y = 1 - (1 - y_0) \exp(-rt)$	$\ln\{1/(1-y)\} = \ln\{1/(1 - y_0)\} + rt$
Logistic	$dy/dt = rl y (1-y)$	$y = 1/[1 + \exp\{-\ln y_0/(1 - y_0) + rt\}]$	$\ln(y/(1-y)) = \ln\{y_0/(1 - y_0) + rt\}$
Gompertz	$dy/dt = ry \ln(1/y) = ry(-\ln y)$	$y = \exp(\ln y_0 \exp(-rt))$	$-\ln(-\ln y) = -\ln(-\ln y_0) + rt$
Weibull	$dy/dt = c/b \{(t-a)/b\}^{(c-1) \exp[-\{(t-a)/b\}^c]}$	$y = 1 - \exp[-\{(t-a)/b\}^c]$	$\ln[\ln\{1/(1-y)\}] = -c \ln b + \ln(t-a)$

Tabla A4. Cuadro de Análisis de la Varianza para el análisis del Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3174,62	71	44,71	2,58	<0,0001
Variedad	1252,77	5	250,55	14,47	<0,0001
Aislamiento	195,66	5	39,13	2,26	0,0516
Concentración	111,38	1	111,38	6,43	0,0123
Variedad*Aislamiento	829,35	25	33,17	1,92	0,0095
Variedad*Concentración	43,38	5	8,68	0,5	0,7751
aislamiento*Concentración	48,86	5	9,77	0,56	0,7272
Variedad*Cepa*aislamiento	693,2	25	27,73	1,6	0,0458
Error	2493,59	144	17,32		
Total	5668,2	215			

Tabla A5. Medias de peso seco (mg) para las variedades evaluadas en función de los aislamientos y densidad de inóculo.

Variedad	Medias	C.V.		Medias	C.V.	
MB47	D1			D2		
<i>F. s.</i> 44	148,27	1,6	d*	217,13	1,65	e
<i>F. s.</i> 55	60,3	1,01	B	60,03	20,6	c
<i>F. s.</i> 98	42,23	2,6	A	30,93	2,8	a
<i>F. o.</i> 15	148,33	3,23	D	31,73	0,18	a
<i>F. o.</i> 27	91,1	2,05	C	50,4	0,94	b
<i>F. o.</i> 33	64,3	9,97	B	48,5	8,2	b
Testigo	144,67	0,5	D	131,33	0,2	d
PVH2291	D1			D2		
<i>F.o.</i> 27	25,03	1,83	A	50,4	1,01	b
<i>F. s.</i> 98	31,03	1,03	B	30,9	0,19	a
<i>F. s.</i> 55	50,4	1,3	C	60,05	1,67	c
<i>F. s.</i> 44	51,97	0,08	C	201	2,85	e
<i>F. o.</i> 15	75,23	20	D	31,7	1,74	a
<i>F. o.</i> 33	105,7	0,5	E	48,5	1,62	b
Testigo	130,1	0,5	F	130	0,38	d
NC71	D1			D2		
<i>F.o.</i> 15	50,37	1,26	A	123,3	0,49	d
<i>F. s.</i> 44	57,47	1,32	A	24,8	1,07	a
<i>F.o.</i> 27	89,57	1,62	B	40,73	0,57	b
<i>F.o.</i> 33	99,7	0,35	C	26,57	12,8	a
<i>F. s.</i> 55	109,53	0,21	d	233,2	4,91	f
Testigo	170,6	0,2	e	170,6	0,2	e
<i>F. s.</i> 98	192,73	5,72	f	94,2	3,49	c
K346	D1			D2		
<i>F. o.</i> 33	50,3	0,61	a	41,4	1,81	c
<i>F. o.</i> 27	74,73	1,1	b	32,57	1,75	b
<i>F. o.</i> 15	82,2	0,55	c	34,07	2,65	b
<i>F. s.</i> 55	156,9	0,82	d	103,5	0,52	d
<i>F. s.</i> 44	197,2	1,31	e	26	6	a
<i>F. s.</i> 98	19,8	0,82	e	26,5	6,6	a
Testigo	201,1	1	f	201,1	0,5	e
K326	D1			D2		
<i>F. s.</i> 44	72,83	5,06	a	62,53	0,65	a
<i>F. s.</i> 55	98,8	0,27	b	53,93	0,2	a
<i>F. s.</i> 98	101,33	0,57	bc	98	1,02	b
<i>F. o.</i> 27	103	0,44	c	113,33	4,07	c
<i>F. o.</i> 15	117,4	0,97	d	52,53	0,51	d
<i>F. o.</i> 33	144,83	1,2	e	105,23	0,31	e
Testigo	185,67	1,6	f	135,67	0,2	f

K394	D1			D2		
<i>F. s. 44</i>	14	8,1	a	19	18,23	a
<i>F. o. 15</i>	20,33	2,84	ab	20	4,33	a
<i>F. o. 33</i>	24,53	1,65	ab	21,5	2,33	a
<i>F. s. 55</i>	51,33	4,5	bc	20,67	2,79	a
<i>F. o. 27</i>	57,53	0,7	c	20	5	a
<i>F. s. 98</i>	91,53	0,44	d	21,67	3,28	a
Testigo	143,33	13,45	e	86,67	17,6	b

*letras diferentes indican diferencias significativas prueba LSD Fisher $p \leq 0,05$

