

IDENTIFICACIÓN DE DIVERSIDAD PATOGENICA DE *Phomopsis* sp. CAUSAL DEL TIZÓN DEL TALLO Y VAINA EN SOYA (*Glycine max*) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

IDENTIFICATION OF PATHOGENIC DIVERSITY IN *Phomopsis* sp. CAUSING STEM BLIGHT IN SOYBEANS (*Glycine max*) BY MOLECULAR MARKERS

Facundo Ezequiel-Hernández¹, Alejandra M. Peruzzo¹, Guillermo R. Pratta¹, Rosanna N. Pioli^{2*}

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias Rosario (IICAR). Facultad de Ciencias Agrarias. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y Universidad Nacional de Rosario (UNR). ²Campo Experimental J. Villarino. CC14 (2125) Zavalla, S. Fe. Argentina. (pioli@iicar-conicet.gob.ar).

RESUMEN

Phomopsis longicolla (Plo) y *P. phaseoli* var. *sojae* (Pps) son causantes del tizón del tallo y vainas (TTV) y decaimiento de semillas (DS) en soja (*Glycine max*). El objetivo fue estudiar la variabilidad genética y patogénica de *Phomopsis* al interactuar con cultivares con resistencia variada o susceptibilidad; así como conocer la asociación entre el perfil molecular y patogénico en las interacciones estudiadas. La hipótesis fue que existe variabilidad genética en los germoplasmas fúngico y vegetal que incrementa la diversidad de reacciones específicas durante el desarrollo del TTV. Por lo tanto, en este estudio se propone una metodología para analizar la asociación entre atributos patogénicos (expresión fenotípica de la enfermedad) y marcadores moleculares. Seis aislamientos de Plo y uno de Pps se inocularon en seis cultivares de soja. La variabilidad genética fúngica se evaluó mediante marcadores tipo RAPD e ITS y el comportamiento patogénico de los aislamientos fúngicos a través de la severidad (S%) de la enfermedad generada en los cultivares de soja. La caracterización molecular separó a los aislamientos de Plo de Pps. Las interacciones específicas evidenciaron comportamientos diferenciales entre aislamientos fúngicos y entre cultivares de soja. El estudio permitió identificar asociaciones entre la variabilidad molecular de los patógenos y los comportamientos diferenciales en el conjunto de aislamientos de *Phomopsis* y cultivares de soja frente a TTV en *G. max*.

Palabras clave: biodiversidad, interacción planta × patógeno, marcadores moleculares, análisis biplot, resistencia genética, agricultura sostenible.

ABSTRACT

Phomopsis longicolla (Plo) and *P. phaseoli* var. *sojae* (Pps) are causal agents of stem blight (SB) and seed decays (SD) in soybean (*Glycine max*). The objective was to study genetic and pathogenic variability of *Phomopsis* in interactions with cultivars of varied resistance or susceptibility, and to study the association between molecular and pathogenic profiles in the analyzed interactions. The hypothesis was that the existence of genetic variability in both fungus and plant materials increases the biodiversity in specific reactions during the development of SB. For contrasting this hypothesis, a new approach of the widely known statistical methods GGE Biplot was proposed for measuring the correlation among pathogenic attributes (phenotypic expression of the plant pathology) and molecular markers. Six isolates of Plo and one of Pps were inoculated to six soybean cultivars. Genetic variability in the fungi was evaluated at the molecular level by RAPD and ITS markers and at the phenotypic level by their pathogenic performance through the severity (S%) of the pathology caused in soybean cultivars. Molecular characterization separated the Plo isolates from the Pps isolate. Specific interaction between each isolate/cultivar combination evidenced differential pathogenic performances in respect to resistance/susceptibility. The study identified associations between the molecular variability of pathogens and the differential behavior observed in the set of soybean cultivars that interacted with *Phomopsis* isolates that cause TTV in *G. max*.

Key words: biodiversity, plant × pathogen interaction, molecular markers, biplot analysis, genetic resistance, sustainable agriculture.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: enero, 2019. Aprobado: julio, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 313-326. 2020.

INTRODUCCIÓN

D*iaporthe/Phomopsis* (DP) es un complejo fúngico, hemi-biótrofo, que afecta a más de 900 hospedantes que incluyen especies cultivadas y no cultivadas, forestales nativas, frutales y malezas (Dissanayake *et al.*, 2017); además, pueden sobrevivir en semillas y rastrojo. El binomio genérico-específico: *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. (teleomorfo, forma sexual perfecta, DP) - *Phomopsis phaseoli* (Desmaz.) Sacc (anamorfo, forma asexual imperfecta, PP) y la especie independiente *P. longicolla* T.W. Hobbs (forma asexual, imperfecta o anamorfo (Plo) de un teleomorfo aún desconocido) están presentes en Argentina (Pioli *et al.*, 2003) y en otros países de América, Europa, Asia y África (Vidic *et al.*, 1995). La plasticidad patogénica de DP ha permitido su expansión en diferentes agro-ecosistemas de Argentina (Alzugaray *et al.*, 2007), limitando la producción y calidad de grano seco, fresco (edamame) y semillas (Pioli *et al.*, 1997). *D. phaseolorum* var. *sojae* (Dps) (anamorfo *P. phaseoli* var. *sojae*, Pps) asociado a Plo causan la enfermedad Tizón del tallo y vainas (TTV) y el decaimiento o pudrición de semillas (DS) en los estadios reproductivos del cultivo de soja y deben su expansión a la disponibilidad de distintas fuentes de inóculo (Vidic *et al.*, 1995). El transporte a larga distancia y la transmisión por semillas son la causa principal de la introducción e infección primaria en lotes libres de la enfermedad (Pioli *et al.*, 2000). Estudios moleculares realizados sobre Dps y Plo demostraron una notable variabilidad genética de este grupo fúngico (Pioli *et al.*, 2003; Li, 2010; Vidic *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2015), que dieron origen a la aparición de nuevas razas fisiológicas (Udayanga *et al.*, 2014; Dissanayake *et al.*, 2017). El mejoramiento genético de soja en el mundo ha permitido disponer de genotipos portadores de genes de resistencia a TTV-DS (Zimmerman and Minor, 1993; Smith *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009), pero no en particular a TTV. Por ello, si bien en Argentina se ha logrado caracterizar y seleccionar algunas fuentes potenciales de resistencia (Hernández *et al.*, 2013), es relevante profundizar el estudio de esta enfermedad.

Los análisis de datos de ensayos multi-ambientales, dialélicos e interacciones planta × patógeno han incluido el concepto de biplot GGE (Yan and Falk, 2002), adaptándolo a cada situación biológica particular que implican estos estudios. Así, este tipo de

INTRODUCTION

D*iaporthe/Phomopsis* (DP) is a fungal complex, hemi-biotroph that affects more than 900 hosts including cultivated and uncultivated species of native forest, fruits and weeds (Dissanayake *et al.*, 2017); they can also survive on seeds and stubble. The binomial specific generic: *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. (teleomorph, perfect sexual form, DP) - *Phomopsis phaseoli* (Desmaz.) Sacc (anamorph, imperfect asexual form, PP) and the independent species *P. longicolla* T.W. Hobbs (asexual form, imperfect o anamorph (Plo) of a teleomorph still unknown) are present in Argentina (Pioli *et al.*, 2003) and in other countries of America, Europe, Asia and Africa (Vidic *et al.*, 1995). The pathogenic plasticity of DP has promoted its expansion in different agro-ecosystems of Argentina (Alzugaray *et al.*, 2007), limiting the production and quality of dry, fresh grain (edamame) and seeds (Pioli *et al.*, 1997). *D. phaseolorum* var. *sojae* (Dps) (anamorph *P. phaseoli* var. *sojae*, Pps) associated to Plo cause the disease stem and pod blight (SPB) and seed decay (SD) in the reproductive stages of soybean crop (Vidic *et al.*, 1995). Long distance transport and transmission by seeds are the main causes of inoculum introduction and primary infection in disease free batches (Pioli *et al.*, 2000). Molecular studies applied on Dps and Plo demonstrated a remarkable genetic variability within this fungal group (Pioli *et al.*, 2003; Li, 2010; Vidic *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2015), that gave rise to the appearance of new physiological races (Udayanga *et al.*, 2014; Dissanayake *et al.*, 2017). Resistant genotypes to SPB-SD were obtained by breeding programs worldwide (Zimmerman and Minor, 1993; Smith *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009), but not particularly to BSP. Therefore, although in Argentina it was possible to characterize and select some potential sources of resistance (Hernández *et al.*, 2013), it is relevant to deepen the study of these diseases.

Data analysis of multi-environmental trials, diallelic studies and pathogen plant interactions have included the concept of biplot GGE (Yan and Falk, 2002), adapting it to each particular biological situation that these studies imply. Thus, this type of analysis allows not only to identify differential behaviors between the virulence of various DP isolates when interacting with different soy genetic

análisis permite no sólo identificar comportamientos diferenciales entre la virulencia de diversos aislamientos DP al interactuar con germoplasma de soja de distinto origen genético, sino también detectar asociaciones entre el polimorfismo de los perfiles moleculares y la diversidad patogénica de los hongos.

En este contexto, la hipótesis de este estudio fue que existe variabilidad genética en los germoplasmas fúngico y vegetal, que incrementa la diversidad de reacciones específicas durante el desarrollo del TTV. Esta variabilidad genética permite detectar asociación entre la virulencia de cada aislamiento y marcadores moleculares. El objetivo fue identificar interacciones específicas entre aislamientos de *Phomopsis* y cultivares de soja, así como conocer la asociación entre el perfil patogénico y molecular mediante un análisis biplot.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización molecular del material fúngico

Siete aislamientos de *Phomopsis* causales de TTV (seis de Plo y una Pps), caracterizados morfológica y molecularmente por RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar) de acuerdo a Pioli *et al.* (2003) y por ITS (espaciadores internos transcritos) de acuerdo con Hernández *et al.* (2015), se seleccionaron desde la colección fúngica que dispone el Área Fitopatología, Biodiversidad Vegetal y Microbiana (BioVyM-FRE). Los aislamientos se desarrollaron como cultivos puros en medio agar-papa-glucosado 2% acidulado (APGA) y el ADN se extrajo de 5 mg de micelio fresco de colonias obtenidas luego de 5 d de incubación. Las reacciones de amplificación para la caracterización molecular se hicieron a partir de 10 ng de ADN fúngico (Hernández *et al.* (2015) con 4 cebadores: OP-AA01 (5'AGACGGCTCC3'), OP-AA06 (5'GTGGGTGCCA3'), Plo5 (cebador directo 5'CGAGCTCGCCACTAGATTTCA3' y cebador reverso 5'CCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGG3'), e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). La diversidad genética en el nivel molecular se evaluó por análisis de agrupamiento mediante el método de Ligamiento Promedio Ponderado a partir de la presencia/ausencia de los amplicones de RAPD e ITS obtenidos en cada cepa, y se usó como métrica a las distancias Euclídeas.

Caracterización de la diversidad de las reacciones patogénicas en la interacción soja-*Phomopsis*

Los siete aislamientos se inocularon y evaluaron en sus interacciones con seis cultivares de soja; dos de ellos portadores de

backgrounds, but also to detect associations between the polymorphism of molecular profiles and the pathogenic diversity of fungi.

In this context, the hypothesis of this study was that there is genetic variability in fungal and plant germplasm, which increases the diversity of specific reactions to BSP. This genetic variability allows to detect association between the virulence of each isolation and molecular markers. The objective was to identify specific interactions between *Phomopsis* isolates and soybean cultivars, as well as to know the association between the pathogenic and molecular profiles through a biplot analysis.

MATERIALS AND METHODS

Molecular characterization of fungal material

Seven *Phomopsis* isolates causing SB (six of Plo and one of Pps), morphologically and molecularly characterized by RAPD (random amplified polymorphic DNA) and by ITS (internal transcript spacers) according to Pioli *et al.* (2003) and Hernández *et al.* (2015), respectively, were selected from the fungal collection available at Plant Pathology Area, Plant and Microbe Biodiversity (BioVyM-FRE). Isolates were grown as pure cultures in Potato dextrose agar (PDA) medium 2% acid. Total DNA was extracted from 5 mg of fresh mycelium collected in independent colonies after 5 d of incubation. Amplification reactions for molecular characterization were made from 10 ng of fungal ADN (Hernández *et al.* (2015) with 4 primers: OP-AA01 (5'AGACGGCTCC3'), OPAA06 (5'GTGGGTGCCA3'), Plo5 (direct primer 5'CGAGCTCGCCACTAGATTTCA3' and reverse primer 5'CCTCAAGCCTGGCTTGGTGATGG3'), and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'). Genetic diversity at the molecular level was evaluated by hierarchical cluster analysis by UPGMA algorithm from the matrix of presence/absence of RAPD and ITS amplified fragments in each isolate, with the Euclidean distance as the metric.

Characterization of the biodiversity in pathogenic reactions of soybean-*Phomopsis* interactions

The seven isolates were inoculated and evaluated on six soybean cultivars; two of them carrying resistance genes combinations: PI 360841 (*Rpsd1* y *Rpsd2*); PI 417479 (*Rpsd2* y *Rpsd3*); other two carrying single genes: PI 80837 (*Rpsd2*) y PI 562694 (*Rpsd3*); and two without known *Rpsd* genes CVS-5 y CVS-6 (Smith *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012).

The inoculations were performed through a micro wound injection of 10 ml suspension containing $10^{-6} \times 10^{5-6}$ of conidia

genes de resistencia combinados: PI 360841 (*Rpsd1* y *Rpsd2*); PI 417479 (*Rpsd2* y *Rpsd3*); dos con genes únicos: PI 80837 (*Rpsd2*) y PI 562694 (*Rpsd3*); y dos sin genes *Rpsd* conocidos CVS-5 y CVS-6 (Smith *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012).

Las inoculaciones se realizaron a través de una micro herida e inyección de 10 mL de una suspensión de $1-6 \times 10^{5-6}$ de conidios de cada cepa fúngica, en la axila foliar (nudo 2) de 12 plantas por cada interacción soja-Plo/Pps, distribuidas en 3 macetas (consideradas como repeticiones para el análisis estadístico). A partir de los 7 d después de la inoculación, se cuantificaron los síntomas y expresaron en valores de severidad (S%) de TTV, siendo $S\% = \frac{\sum (\% \text{ área infectada en cada entrenudo o tallo})}{n^\circ \text{ de entrenudos o tallos evaluados en cada interacción soja-Phomopsis}}$ (Hernández *et al.*, 2015). El comportamiento de los aislamientos fúngicos se infirió a través del grado de Avirulencia/virulencia observado.

Con el fin de agrupar a los aislamientos de *Phomopsis* con base al comportamiento general de los aislamientos en el total de las interacciones analizadas, se generó un dendrograma por el método de Ligamiento Promedio Ponderado usando como métrica las distancias euclídeas (Hernández *et al.*, 2015). Los valores de S% se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, porque esta variable no se distribuyó normalmente ($W=0.89$ $p \leq 0.0001$), para estimar la diversidad fúngica, vegetal y sus interacciones específicas. Para visualizar las interacciones mediante aproximaciones convencionales, se graficó la regresión conjunta (Eberhart and Russell, 1966), en la que los cultivares de soja fueron considerados los ambientes donde las cepas del patógeno (entradas) expresaron su virulencia. Las interacciones específicas entre aislamientos y cultivares se visualizaron por la aproximación GGE del Análisis Biplot (Yan and Falk, 2002), tomando también como entradas a las cepas del patógeno y como ambientes o testers a los cultivares de soja.

Asociación entre la diversidad molecular fúngica y la diversidad patogénica

Polimorfismos moleculares, cuya posición relativa en el gráfico generado por el Análisis Biplot varía conjuntamente con el valor de S% en cada interacción específica, fueron identificados. Además, con la visualización gráfica que este análisis permite, se nombraron los aislamientos con base a la presencia de cada marcador molecular amplificado (Hernández *et al.*, 2015). Estos biplots se emplearon para seleccionar marcadores cuya presencia/ausencia está claramente diferenciada en los distintos sectores del biplot, lo que indicaría un comportamiento patogénico diferencial. Luego, se construyó un dendrograma por el método de Ligamiento Promedio y las distancias euclídeas (d.e)

from each fungal strain, in the leaf axilla (node 2) of 12 plants for each interaction soy-Plo/Pps, distributed in 3 pots (each of them considered as replications for statistical analysis). Symptoms were quantified from 7 d after inoculation, and expressed in severity values (S%) of BSE, being $S\% = \frac{\sum (\% \text{ infected area on each internode or stem})}{n^\circ \text{ of nodes or stem evaluated in each interaction soy-Phomopsis}}$ (Hernández *et al.*, 2015). The behavior of fungal isolates was inferred through the degree of Avirulence/virulence observed.

In order to group *Phomopsis* isolates based on their general behavior, a dendrogram was generated by the Weighted Average Linkage method using the Euclidean distances as a metric (Hernández *et al.*, 2015). In order to estimate fungal and plant diversity and their specific interactions, severity values were analyzed with the non-parametric Kruskal-Wallis test, since this variable was not normally distributed ($W=0.89$ $p \leq 0.0001$). To visualize the interactions using conventional approaches, the joint regression was plotted (Eberhart and Russell, 1966), considering soybean cultivars as environments where the pathogen strains (inputs) expressed their virulence. The specific interactions between isolates and cultivars were visualized by a GGE of Biplot Analysis approximation (Yan and Falk, 2002), also taking soybean cultivars as environment or testers and the pathogen strains as inputs.

Association between fungal molecular diversity and pathogenic diversity

Molecular polymorphisms, whose relative position in the graph generated by the Biplot Analysis varied together with the value of S% in each specific interaction, were identified. Besides, with the graphics visualization allowed by this analysis, isolates were identified according to the presence of each amplified molecular marker (Hernández *et al.*, 2015). These biplots were used to select markers whose presence/absence are clearly differentiated in the distinct sectors of the biplot, which would indicate a differential pathogenic performance. Then, a dendrogram was constructed with the Average Linkage method and Euclidean distances (e.d) as metric, starting from molecular polymorphisms whose presence/absence allowed differentiating among pathogenic interactions in the biplots performed. Comparison of this dendrogram with that obtained with all the molecular markers allowed to verify if the polymorphism selected based on the biplots were a representative sample of the molecular diversity present in the isolates, or if there is a bias related to its pathogenic diversity (Hernández *et al.*, 2015).

como métrica, a partir de los polimorfismos moleculares cuya presencia/ausencia diferenció a las interacciones patogénicas en los biplots realizados. La comparación de este dendrograma con el obtenido con base a la totalidad de los marcadores moleculares permitió verificar si los polimorfismos seleccionados con base a los biplots, constituyen una muestra representativa de la diversidad molecular presente en los aislamientos o si presenta algún sesgo relacionado con su diversidad patogénica (Hernández *et al.*, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la diversidad molecular del material fúngico

En total se detectaron 245 bandas amplificadas por los cuatro tipos de cebadores (OP-AA01, OP-AA06, ITS4 y Plo5), de ellas 136 fueron polimórficas. En el dendrograma obtenido a partir de estos 136 amplicones, que tuvo una correlación cofenética de 0.994, los siete aislamientos Plo y Pps seleccionados se agruparon en correspondencia a su identidad genética (Figura 1A). El análisis mostró variabilidad inter-específica entre las dos especies de *Phomopsis* (*P. longicolla* y *P. sojae*) que divergen a una d.e de 22 y variabilidad intra-específica, dentro de Plo, separándolos a partir de una d.e de 17.

En coincidencia con lo informado por Hernández *et al.* (2015), la caracterización molecular por marcadores RAPD e ITS separó a los aislamientos de *P. longicolla* y *P. sojae* en dos grupos y permitió poner en evidencia la diferenciación inter-específica. Esto se debe a la amplificación de regiones genómicas al azar, no necesariamente involucradas en la determinación de la Avirulencia/virulencia de las cepas fúngicas evaluadas (Pioli *et al.*, 2003).

Caracterización de la diversidad de las reacciones patogénicas en la interacción soja-*Phomopsis*

El dendrograma (Figura 1 B) obtenido con base a la reacción patogénica observada en los aislamientos DP (Cuadro 1), tuvo un valor de correlación cofenética de 0.853 y mostró la diversidad patogénica del grupo de seis aislamientos de Plo y un Pps. Ambas especies son causantes de TTV en soja y los aislamientos evaluados constituyeron una muestra representativa de una colección mayor de *Phomopsis*, que fueron diferenciados en dos grupos fúngicos de patogenicidad

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the molecular diversity in fungal material

A total of 245 fragments amplified by the four types of primers (OP-AA01, OPAA06, ITS4, and Plo5) were detected, and 136 of them were polymorphics. In the dendrogram obtained with these 136 amplified fragments, with a cophenetic correlation of 0.994, the seven selected Plo and Pps isolates were grouped according to their genetic identity (Figure 1A). This analysis evidenced inter-specific variability between both *Phomopsis* species (*P. longicolla* and *P. sojae*), which diverged a 22 e.d and intra-specific variability, within Plo, separating them starting from a 17 e.d.

According to the report of Hernández *et al.* (2015), the molecular characterization by RAPD and ITS markers separated the 6 *P. longicolla* isolate from the unique *P. sojae* isolate, forming two groups that allow evidencing the inter-specific differentiation. This observation can be explained because amplification of genomic regions was random so that these regions are not necessarily involved in genetic determination of Avirulence/virulence of the isolates under study (Pioli *et al.*, 2003).

Characterization of diversity in pathogenic reactions of the soybean-*Phomopsis* interactions

The dendrogram (Figure 1 B) obtained based on the pathogenic reaction observed in the DP isolates (Table 1), had a co-genetic correlation value of 0.853 and showed the pathogenic diversity of the group of six isolates of Plo and one Pps. Both species are causing TTV in soybeans and the isolates evaluated constituted a representative sample from a larger collection of *Phomopsis*, which were differentiated into two fungal groups of different pathogenicity according to S% average. Group I, included less virulent isolates, with a range of variation for S% between 27 and 32%, and was molecularly and taxonomically more heterogeneous, since It included Pps isolation (QCol7) and three Plo (Group 3.4, CaB, B5L16). Group II included three Plo isolates (B4L17, 8413, 227-B2) more virulent and causing TTV with values of S% average between 35 and 40% (Table 1).

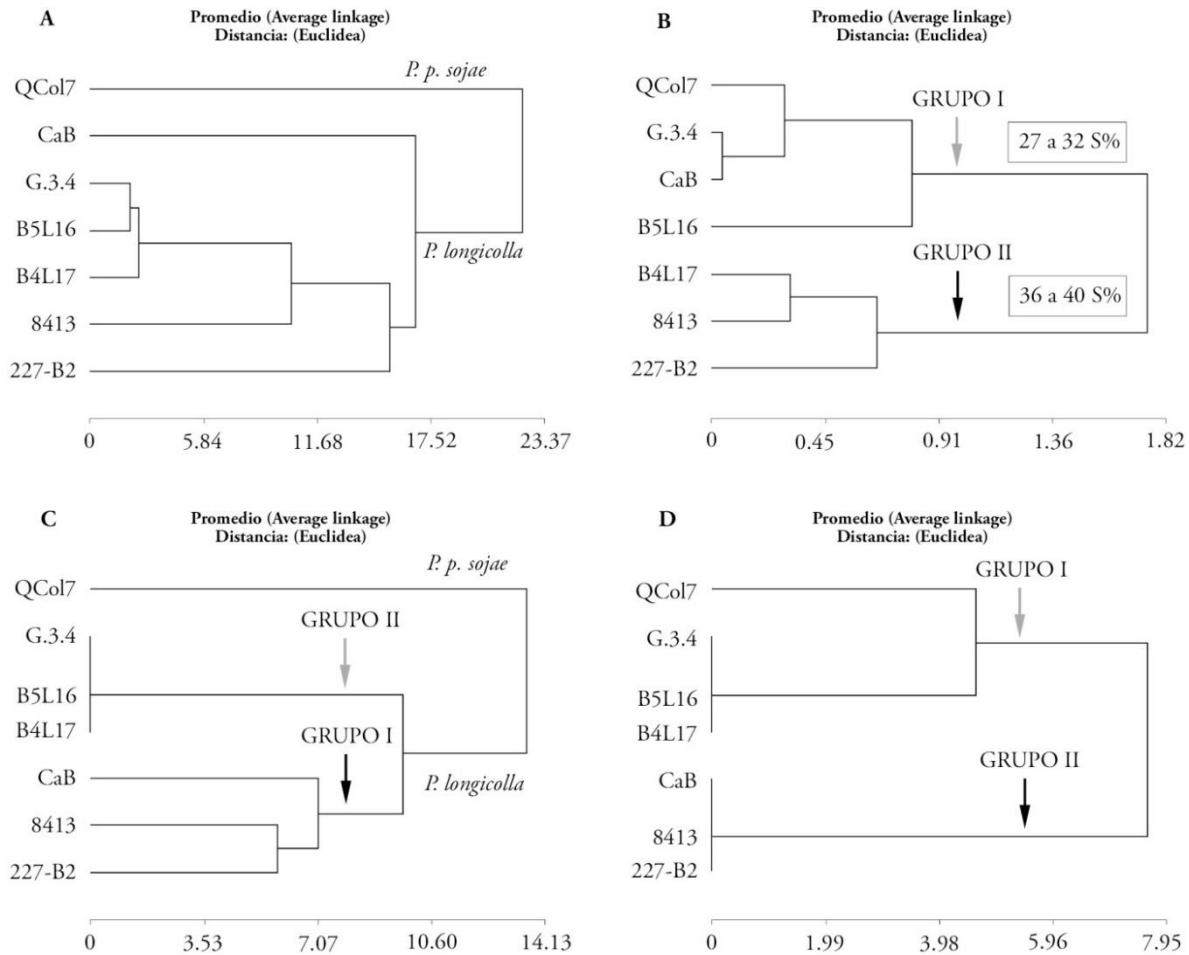


Figura 1. Agrupamiento de los siete aislamientos evaluados de *Phomopsis* spp. con base a diferentes atributos y cálculo de las distancias euclídeas entre ellos. **A:** dendrograma obtenido a partir de los 136 amplicones polimórficos generados con el total de cebadores (RAPD e ITS). **B:** dendrograma obtenido a partir de la severidad promedio (%) de cada aislamiento sobre los 6 cultivares inoculados de soja. **C:** dendrograma obtenido a partir de 49 amplicones polimórficos generados con el cebador RAPD OP-AA01. **D:** dendrograma obtenido a partir de 18 amplicones polimórficos generados por el cebador RAPD OP-AA01 que, de acuerdo con su presencia/ausencia, se ubicaron diferencialmente en el biplot (ver Figura 2).

Figure 1. Seven isolates of *Phomopsis* grouped on the base of different genetic attributes and measurements of Euclidean distances among them. **A:** dendrogram obtained with the 136 polymorphic fragments amplified by the total of primers (RAPD and ITS). **B:** dendrogram obtained with the mean severity (S%) of each isolate upon the 6 soybean inoculated cultivars. **C:** dendrogram obtained with the 49 polymorphic fragments amplified by primer RAPD OP-AA01. **D:** dendrogram obtained with the 18 polymorphic fragments amplified by primer RAPD OP-AA01, which were differentially positioned according to their presence/absence in the biplot (see Figure 2).

diferente de acuerdo a S% promedio. El Grupo I, menos virulento y con un rango de variación para S% entre 27 y 32%, fue más heterogéneo molecular y taxonómicamente, pues incluyó al aislamiento Pps (QCol7) y a tres Plo (Grupo 3.4, CaB, B5L16). El Grupo II incluyó a tres aislamientos de Plo (B4L17, 8413, 227-B2) más virulentos y causantes de valores de S% promedio entre 35 y 40% (Cuadro 1).

When comparing Figures 1A and 1B, it is observed that the isolates were grouped differentially according to their molecular diversity or their diversity in the pathogenic reaction or both, because in the first case the fungal genomic regions relieved are not necessarily related to virulence with respect to TTV, and in the second they are grouped only based on the S% caused on a group of soybean cultivars.

Cuadro 1. Valores de porcentaje de severidad promedio de tizón del tallo y vaina (TTV) en interacciones de seis cultivares de soja y seis aislamientos de *P. longicolla* y uno de *P. phaseoli* var. *sojae*.**Table 1. Percentage values of mean severity for stem blight (SB) in plant-pathogen interactions of six soybean cultivars with six *P. longicolla* isolates and one *P. phaseoli* var. *sojae* isolate.**

Aislamientos de <i>Phomopsis</i>	Severidad (%S) de TTV observado en cultivares de soja						S%
	PI360841	PI417479	PI562694	PI80837	Cv 5	Cv 6	
227-B2	49.45	31.25	50.00	50.00	40.90	16.66	39.71
B4L17	31.81	31.25	37.50	38.88	54.16	30.00	37.27
B5L16	40.90	18.5	20.83	54.16	36.36	12.50	32.09
CaB	33.33	16.67	16.67	55.55	40.90	8.30	28.57
GRUPO 3.4	25.00	25.00	9.09	50.00	45.45	18.18	28.79
8413	40.90	44.44	37.50	41.66	50.00	0.00	35.75
Qcol7	27.27	25.00	22.72	54.54	25.00	9.09	27.27
S%	35.52	28.77	27.76	49.26	41.82	13.53	32.78

%S Porcentaje de severidad promedio ♦ Percent mean severity (%S) of SB.

Al comparar las Figuras 1A y 1B, se observa que los aislamientos se agruparon diferencialmente según su diversidad molecular o su diversidad en la reacción patogénica o ambos, porque en el primer caso se ¿relevantan? regiones genómicas de los hongos que no necesariamente están relacionadas con la virulencia respecto a TTV, y en el segundo se los agrupa sólo en base al S% causado sobre un grupo de cultivares de soja.

Sin embargo, hay antecedentes de la existencia de interacciones específicas entre aislamientos de patógenos y cultivares vegetales (Flor, 1971; De Wit, 1992; Pioli *et al.*, 1999), por lo cual la patogenia suele no ser un buen indicador para seleccionar fuentes de resistencia a una enfermedad fúngica (Chiesa *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2015). En concordancia con esos resultados, en este estudio no se detectaron diferencias significativas entre aislamientos fúngicos (con una variación entre 27 y 40%) ($H=7.36$; *n.s*) (Cuadro 1). En cuanto a la caracterización de las interacciones planta-patógeno, la prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas entre cultivares ($H=39.69$; $p\leq 0.01$) y para la interacción ($H=64.90$; $p\leq 0.01$). Los resultados de este análisis pueden verificarse visualmente en el gráfico de la regresión conjunta (Figura 2A), en el cual se observa que las diferencias en el desarrollo de TTV (representadas en el eje de las ordenadas) son mayores entre los seis cultivares evaluados (representados en el eje de las abscisas) que entre los siete aislamientos DP (cada uno representado por una línea diferente en el plano definido por ambos ejes de coordenadas).

However, previous studies reported the existence of specific interactions between pathogenic isolates and plant cultivars (Flor, 1971; De Wit, 1992; Pioli *et al.*, 1999), thus the pathogenicity is usually not a good indicator to select sources of resistance for a fungal disease (Chiesa *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2015). In agreement with those results, in this study no significant differences were detected between fungal isolates (with a variation between 27 and 40%) ($H=7.36$; *n.s*) (Table 1). Regarding the characterization of plant-pathogen interactions, the Kruskal-Wallis test indicated significant differences between cultivars ($H=39.69$; $p\leq 0.01$) and for the interaction ($H=64.90$; $p\leq 0.01$). The results of this analysis can be visually verified in the joint regression graph (Figure 2A), which shows that the differences in the development of TTV (represented in the axis of the ordinates) are greater among the six cultivars evaluated (represented on the abscissa axis) than those observed among the seven DP isolations (each represented by a different line in the plane defined by both coordinate axes).

Figure 2A shows that the isolates are ordered differently according to the S% of TTV generated in each cultivar, indicated by the individual points of each line projected at the corresponding abscissa values, which is consistent with the statistically significant interactions detected by Kruskal-Wallis.

In the biplot (Figure 2B) different behaviours can be observed for both, DP isolates, cultivars and their interactions. In addition, if the axis of coordinates defined by Principal Components (CP)

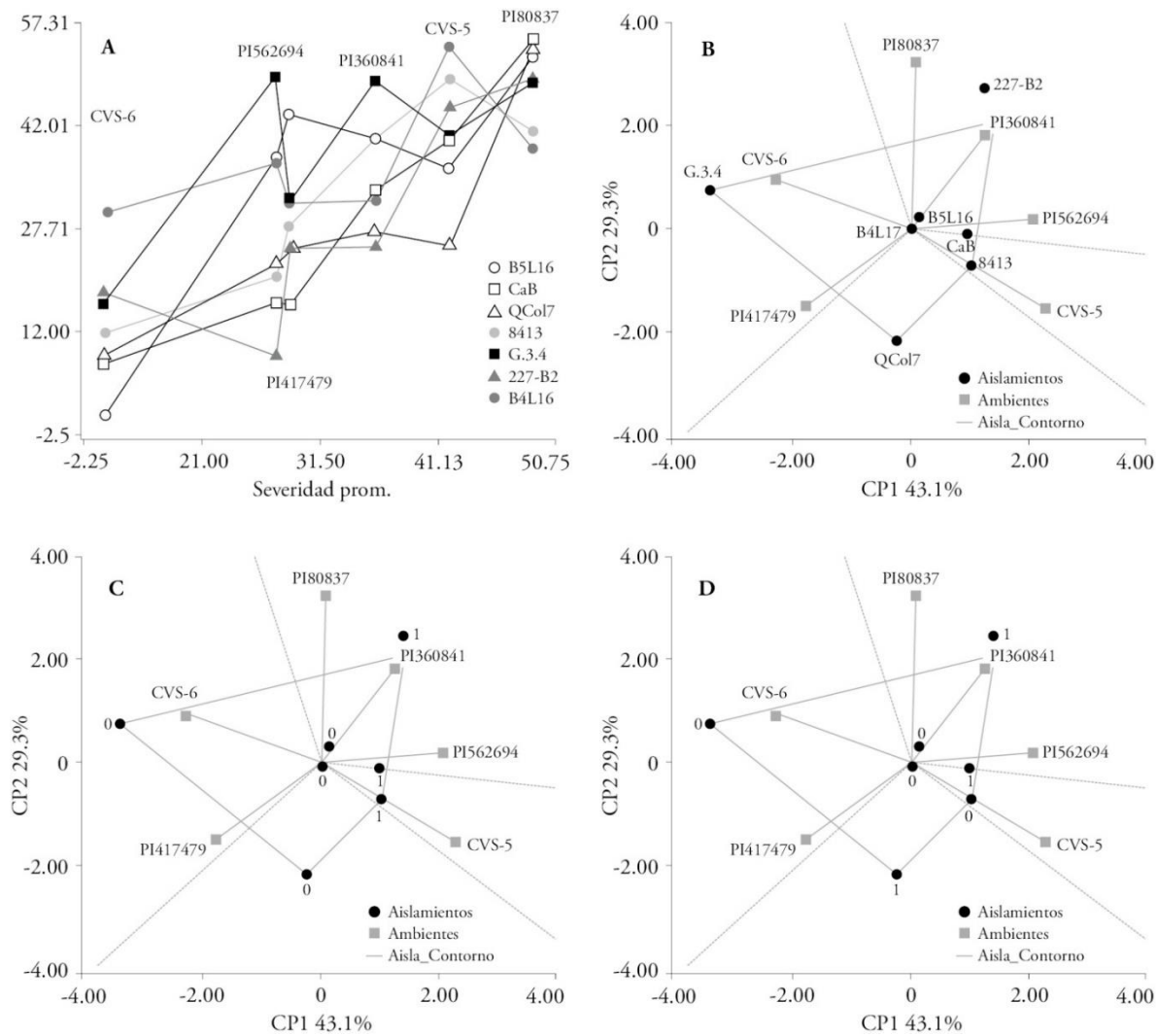


Figura 2. Análisis de la interacción cultivares de soja × aislamientos de *Phomopsis* spp. en diferentes niveles. A: análisis de la interacción a través de la regresión conjunta, graficada en base a valores promedio de severidad de TTV (S%), considerando todos los aislamientos de *Phomopsis*, observada en cada cultivar en el eje de las abscisas y la S% promedio de cada aislamiento sobre cada cultivar en particular en las ordenadas. B: análisis de la interacción a través del Biplot GGE (Yan, 1971), en el que los aislamientos son las entradas (*entries*) y los cultivares son los ambientes (*testers*). C y D: análisis de la interacción que surge de reemplazar el nombre de los aislamientos por la presencia (identificada por 1) y la ausencia (identificada por 0) de los 49 amplicones generados por el cebador OP-AA01. La Figura 2 C corresponde a un amplicón asociado con la interacción soja × *Phomopsis* spp. de patogenicidad específica, en tanto que la 2D ejemplifica un amplicón no asociado con la interacción soja × *Phomopsis* spp. de patogenicidad específica.

Figure 2. Analysis of soybean cultivars × *Phomopsis* spp. isolates in different levels. A: analysis of the interaction by joint regression, plotted on mean SB perceptual severity (S%) of SB through all *Phomopsis* isolates on each cultivar in the abscises axis and mean S% of each isolate on each cultivar in the ordinate axis. B: analysis of the interaction by GGE Biplot (Yan, 1971), considering the isolates as entries and the cultivars as testers. C and D: analysis of the interaction obtained by replacing the name of each isolates by the presence (identified by 1) and the absence (identified by 0) of the 49 polymorphic fragments amplified by primer OP-AA01. Figure 2C shows an amplified fragment associated to *Phomopsis* spp. × soybean interactions of specific pathogenicity, while Figure 2D shows an amplified fragment non associated to specific pathogenicity in *Phomopsis* spp. × soybean interactions.

La Figura 2A muestra que los aislamientos se ordenan de forma diferente de acuerdo con la S% de TTV generada en cada cultivar, indicado por los puntos individuales de cada línea proyectados en los valores de las abscisas correspondientes, lo que concuerda con las interacciones estadísticamente significativas detectadas por Kruskal-Wallis.

En el biplot (Figura 2B) pueden observarse diferentes comportamientos para los aislamientos DP, los cultivares y sus interacciones. Además, si se considera que el eje de coordenadas definido por Componentes Principales (CP) indica cuáles son las fuentes de variación que resultaron más importantes para explicar la variabilidad total encontrada en el conjunto de datos, se puede inferir que la CP1, que corresponde a los ambientes o cultivares de soja y las interacciones, explicó la mayor proporción de variabilidad (43.1%) en tanto que la CP2, que corresponde a las interacciones y las entradas o aislamientos de *Phomopsis*, explicó una proporción menor (29.3%). Al aporte acumulado (72.4 %) de ambas componentes, CP1 y CP2, se sumó además la CP3 (análisis no mostrado) y se alcanzó explicar el 92.4% de la variabilidad total, con lo que se logró una alta eficiencia analítica en el estudio de las interacciones planta × patógeno.

El análisis de las posiciones relativas de aislamientos y cultivares en el biplot permitió identificar las interacciones patogénicas. En referencia a los cultivares (los ambientes del biplot), la CP1 discriminó entre tres grupos: un primer grupo compuesto por CVS-6 y PI 417479, un segundo grupo formado sólo por PI 80837 (que se ubicó cerca del 0 de este eje) y un tercer grupo compuesto por PI 360841, PI 562694 y CVS-5. En relación a la CP2, los cultivares CVS-6 y PI 417479, incluidos en el grupo uno de la CP1, se separaron y cada uno formó un subgrupo, en tanto que PI 80837, neutro para la CP1, se posicionó en el lado positivo de la CP2. El tercer grupo definido por la CP1 se separó en dos subgrupos de acuerdo con la CP2: uno compuesto por PI 360841 y PI 562694 y otro formado solo por CVS-5.

El gradiente definido por CP1 y CP2 tuvo sentido biológico asociado al comportamiento patogénico promedio mostrado por los hongos sobre los diferentes cultivares. La CP1 definió un gradiente asociado a los valores de S% promedio de TTV (Cuadro 1 y Figura 1B), ubicándose a aquellos aislamientos que causaron una %S menor a 35% en los 6 cultivares evaluados en valores negativos de este eje y aquellos

indicates which are the sources of variation that were most important to explain the total variability found in the data set, it can be inferred that CP1, which corresponds to the environments or cultivars of soybeans and interactions, explained the highest proportion of variability (43.1%), while the CP2, corresponding to the interactions and entrances or isolates of *Phomopsis*, explained a lower proportion (29.3%). Based on the accumulated contribution (72.4%) of both components, CP1 and CP2, a CP3 (analysis not shown) was also added and the 92.4% of the total variability was explained; thus, achieving high analytical efficiency in the study of plant interactions × pathogen.

The analysis of the relative positions of isolates and cultivars in the biplot, allowed to identify the pathogenic interactions. In reference to cultivars (biplot environments), CP1 discriminated between three groups: a first group consisting of CVS-6 and PI 417479, a second group consisting only of PI 80837 (which was located near 0 of this axis) and a third group consisting of PI 360841, PI 562694 and CVS-5. In relation to CP2, cultivars CVS-6 and PI417479, included in group one of CP1, were separated and each formed a subgroup, while PI 80837, neutral for CP1, was positioned on the positive side of CP2. The third group, defined by CP1, was separated into two subgroups according to CP2: one consisting of PI 360841 and PI 562694, and another consisting only of CVS-5.

The gradient defined by CP1 and CP2 showed biological sense associated with the average pathogenic behaviour shown by fungi on different cultivars. CP1 defined a gradient associated with the values of S% average of TTV (Table 1 and Figure 1B), placing those isolates that caused a %S less than 35% in the 6 cultivars evaluated in negative values of this axis and those isolates that caused a %S greater than 35% of its positive values.

The position of each isolate in the polygon, defined by the isolates with extreme values for CP1 and CP2, explained their behaviour in specific associations/interactions with cultivars; the isolates 227-B2, Group 3.4, QCol7 and 8413 were the most discrepant. In the polygon plotted in the plane of CP1 and CP2, four quadrants are distinguished from the values 0 of each axis. As an example, the upper right quadrant, defined by 227-B2 isolate, which, on average, was the most virulent, will be interpreted

aislamientos que causaron una %S mayor a 35% sobre los valores positivos del mismo.

La posición de cada aislamiento en el polígono definido por los aislamientos con valores extremos para CP1 y CP2 explicó su comportamiento en las asociaciones específicas con los cultivares, siendo 227-B2, Grupo 3.4, QCol7 y 8413 los aislamientos más discrepantes. En el polígono graficado en el plano de CP1 y CP2 se distinguen cuatro cuadrantes a partir de los valores 0 de cada eje. A modo de ejemplo, se interpretará detalladamente el cuadrante superior derecho, definido por el aislamiento 227-B2 que, en promedio, fue el más virulento. En consecuencia, se ubica en los valores más altos de CP1 y de CP2. A este cuadrante están asociados los cultivares PI 360841, PI 80837 y PI 562694, sobre los que 227-B2 produjo mayor infección. Además, este aislamiento se distanció de CVS-6 y PI 417479, que mostraron menor S% frente a él. Aunque en este cuadrante también se ubicaron los aislamientos B5L16 y CaB, estos últimos se encuentran cercanos a su límite y próximos al cuadrante inferior derecho, definido por el aislamiento 8413. El aislamiento B5L16 se ubicó en el mismo cuadrante que 227-B2 por presentar valores similares de enfermedad para dos (PI 360841 y PI 80837) de los tres cultivares asociados a este último aislamiento, pero cercano al origen de coordenadas. Esta posición lo distanció del tercer cultivar asociado a este cuadrante (PI 562694), hecho que se explica porque sobre él, B5L16 presentó el menor S%. El aislamiento CaB se ubicó entre los cultivares con los que 227-B2 presentó mayor S% (PI 80837 y CVS-5) pero se alejó de los dos cultivares con quienes presentó interacción menos compatible (PI 417479 y CVS-6). Cabe destacar que si bien con PI 562694 también presentó baja compatibilidad (similar a la presentada con PI 417479), la aparente asociación mostrada por CP1 y CP2 entre ellos (PI 562694 - CaB) es discriminada en la CP3. Este componente, que como ya se mencionó explicó 20% de la variabilidad y acumuló junto a CP1 y CP2 un 92.4% del total, no se había considerado hasta ahora porque no aportaba significativamente a las interacciones ya analizadas (gráfico no mostrado).

La longitud de los vectores que unen a cada genotipo de soja con el punto de intersección entre los 0 de cada CP indica su capacidad para discriminar a los aislamientos de acuerdo con su S%. Una menor longitud de vector se corresponde con una menor

in detail. Consequently, it is at the highest values of both CP1 and CP2. The quadrants are associated with cultivars PI 360841, PI 80837 and PI 562694, on which 227-B2 produced greater infection. In addition, this isolate distanced itself from CVS-6 and PI 417479, which showed lower S% when interacting with it. Although B5L16 and CaB were also located in this quadrant, these isolates are close to their limit and closer to the lower right quadrant, defined by isolation 8413. The B5L16 isolate was located in the same quadrant as 227-B2 for presenting similar disease values for two (PI 360841 and PI 80837) of the three cultivars associated with it, but it is closer to the origin of coordinates. This position distanced him from the third cultivar associated with this quadrant (PI 562694), a fact that is explained because B5L16 caused the lowest value of S% over the latter cultivar. The CaB isolate was located between the cultivars (PI 80837 and CVS-5) with greater S% caused by 227-B2, but distanced itself from the two cultivars with whom it presented less compatible interaction (PI 417479 and CVS-6). It should be noted that while CaB showed also low compatibility with PI 562694 (similar to that presented with PI 417479), the apparent association shown by CP1 and CP2 between them (PI 562694 - CaB) was discriminated by the CP3. This component, which as mentioned above explained 20% of the variability and accumulated 92.4% of the total together with CP1 and CP2, had not been considered so far since it did not contribute significantly to the previously analyzed interactions (graph not shown).

The length of the vectors that link each soybean genotype with the point of intersection between the 0 of each CP indicates its ability to discriminate isolates according to its S%. A shorter vector length corresponds to a lower capacity of the cultivar to discriminate between isolates of different virulence. In this context and in particular, the shorter vectors corresponded to the cultivars PI 80837 and PI 360841 (15 and 24% of S, respectively), which presented the lowest range of variation against the pathogens.

The biplot analysis also allowed to identify that the cultivars of differential behaviour CVS-6 (R) and PI 80837 (S), even though it carries the *Rpsd* 2 gene), were the least discriminating environments for Plo and Pps isolates with whom they interacted, but they expressed opposite reactions. CVS-6 was

capacidad del cultivar para discriminar entre aislamientos de diferente virulencia. En este contexto y en particular, los vectores más cortos correspondieron a los cultivares PI 80837 y PI 360841 (15 y 24% de S, respectivamente), que presentaron el menor rango de variación frente a los patógenos.

El análisis biplot permitió identificar también que los cultivares de comportamiento diferencial CVS-6 (R) y PI 80837 (S), aun cuando porta el gen *Rpsd 2*), fueron los ambientes menos discriminantes para las cepas de Plo y Pps que interactuaron, pero expresaron reacciones opuestas. CVS-6 fue un ambiente resistente y PI 80837 susceptible donde los aislamientos actuaron como avirulentos y virulentos, respectivamente. En estas interacciones se destacó el comportamiento del Plo B4L17 que en el cultivar resistente CVS-6 fue el más virulento y en el cultivar susceptible PI 80837 resultó el menos virulento. Además, el cv. CVS-5 fue discriminante inter-específico para *Phomopsis*, ya que diferenció el comportamiento de Qcol7 (Pps) respecto a los aislamientos de Plo. El Análisis Biplot, validado por el método clásico de la regresión conjunta, permitió identificar comportamientos diferenciales tanto en los patógenos como en los hospedantes.

La aplicación del análisis biplot permitió identificar interacciones específicas que validaron el comportamiento de cultivares de soja portadores de genes de resistencia a TTV usados en los programas de mejoramiento genético de soja, y además detectaron nuevas fuentes de resistencia en relación a los aislamientos predominantes en la región agroecológica.

Asociación entre la diversidad molecular fúngica y la diversidad patogénica

OP1 generó bandas discriminantes entre los aislamientos ubicados diferencialmente en el polígono del biplot generado a partir de la presencia de los amplicones obtenidos, lo cual demostró que este análisis es también útil para visualizar asociaciones entre la diversidad molecular y la patogénica (Figura 2B). La Figura 2C muestra un amplicón cuya presencia determinó la distribución diferencial de los aislamientos en los valores positivos de CP1 (donde están los 1, que indican presencias) o en los valores negativos y cercanos al 0 u origen de coordenada (donde se ubican los 0, que indican ausencias). La Figura 2D muestra la distribución al azar de un amplicón de

a resistant environment and PI 80837 susceptible where the isolates behaved as avirulent and virulent, respectively. In these interactions, the behaviour of the Plo B4L17 was remarkable because in the resistant cultivar CVS-6 it was the most virulent and in the susceptible cultivar PI 80837 it was the least virulent. Besides, CVS-5 was discriminant inter-specific for *Phomopsis*, since it differentiated the behaviour of Qcol7 (Pps) with respect to Plo isolates. The Biplot Analysis, validated by the classic method of joint regression, allowed identifying differential behaviours in both pathogens and hosts.

The application of the biplot analysis allowed the identification of specific interactions that validated the behaviour of soybean cultivars carrying TTV resistance genes used in the genetic improvement programs of soybeans, and also detected new sources of resistance in relation to the predominant isolates in the agro-ecological region.

Association among fungal molecular diversity and pathogenic diversity

OP1 generated discriminating bands among isolates that were differentially positioned in the polygon of the biplot generated from the presence of the obtained amplicons, which showed that this analysis is also useful for visualizing associations among molecular and pathogenic diversities (Figure 2B). Figure 2C shows an amplicon which presence determined the differential distribution of isolates in PC1 positive values (where the 1, or the presence of this fragment, are grouped) in contrast to the negative or near to zero values (where the 0 or the absence of this fragment, are located). Figure 2D shows a random distribution of an amplicon with random distribution since the 1 and the 0 (presence and absences, respectively) are randomly distributed both on CP1 as well as on CP2. Based on these results, it was inferred that OP1 amplifies fungal genomic regions which show a potential statistical association with pathogenicity of seven *Phomopsis* isolates in specific interactions with six soybean cultivars. Then, a clustering of isolates based on the 49 polymorphic fragments amplified by OP1 was accomplished, and a dendrogram (Figure 1C) showing a similar distribution to that obtained by grouping the total amplified polymorphic fragments, was obtained (Figure 1A). This dendrogram

distribución independiente ya que los 1 y los 0 (presencias o ausencias, respectivamente) se distribuyen al azar tanto sobre CP1 como respecto a CP2. Con base a estos resultados se infirió que OP1 amplifica regiones genómicas fúngicas que muestran una asociación estadística potencial con la patogenicidad de siete aislamientos del género *Phomopsis* en las interacciones específicas con seis cultivares de soja. Luego se realizó un agrupamiento a partir de las 49 bandas polimórficas amplificadas por OP1, obteniéndose un dendrograma (Figura 1C) que mostró una distribución similar a la generada por el agrupamiento con el total de las bandas polimórficas (Figura 1A). Este dendrograma (Figura 1C) tuvo una correlación cofenética de 0.990 y demostró que a partir de los 49 amplicones generados por OP1 es posible validar la variabilidad interespecífica entre Pps y Plo de manera similar a lo observado con el total de los amplicones polimórficos (Figura 1A). Después, con la submuestra de 18 amplicones amplificadas por el OP1 que de acuerdo a su posición en el biplot demostraron asociación con la diversidad patogénica, se construyó un nuevo dendrograma (Figura 1D). Este dendrograma, cuya correlación cofenética fue 0.943, no mostró una separación de los aislamientos por su variabilidad molecular inter-específica (es decir, no diferenció Plo de Pps), sino que agrupó a los siete aislamientos con base a su comportamiento patogénico, lo que coincide con los resultados obtenidos en el análisis biplot sobre la CP1 (Figura 2B).

El análisis biplot permitió detectar marcadores moleculares potencialmente asociados a las interacciones planta \times patógeno. De esta manera, la correlación diversidad patogénica - diversidad molecular que se logró al relacionar el biplot (y su respectivo análisis clásico como control: el gráfico de la regresión conjunta) con el dendrograma basado en 49 marcadores polimórficos OP1, reflejan las reacciones observadas en interacciones específicas entre cepas Plo y Pps y cultivares de soja, tomados como ambientes. Con la integración de la caracterización molecular y la patogénica, se destaca que el G2-sub2 formado por 8413, 227-B2 y CaB evidenció polimorfismo patogénico y molecular, lo cual permite separar a CaB de 8413 y 227-B2. Como ya se mencionó, estos tres

(Figura 1C) had a cophenetic correlation of 0.990 and demonstrated that, from the 49 polymorphic fragments amplified by OP1, it is possible to validate the inter-specific variability among Pps and Plo, which is similar to that observed with the total of polymorphic amplicons (Figure 1A). Then, with the subsample of 18 polymorphic fragments amplified by OP1 whose differential positions in the biplot evidenced an association with pathogenic diversity, a new dendrogram was constructed (Figure 1D). This dendrogram, whose cophenetic correlation was 0.943, did not show a clear separation of isolates according to the inter-specific molecular variability (that is, it was not able to differentiate among Plo and Pps), but it grouped the seven isolates according to their pathogenic performance, in agreement to results obtained on the PC1 of the biplot graphic (Figure 2B).

Biplot analysis allowed the detection of molecular markers potentially associated to plant \times pathogens interactions. Hence, the correlation between pathogenic diversity - molecular diversity obtained by combining the biplot (and its respective classical analysis as control: joint regression graphic) with the dendrogram based on 49 polymorphic markers, reflects the reactions observed in specific interactions observed among Plo and Pps isolates and soybean cultivars, considered as environments. The integration of molecular and pathogenic characterization, a G2-sub2 group composed by 8413, 227-B2 and CaB isolate are noticeable for evidencing pathogenic and molecular polymorphism in respect to the other isolates, which allows the separation of CaB from 8413 and 227-B2. As previously mentioned, these three isolates were discrepant in their performance upon the soybean cultivar carrying known Rpsd genes, and present a common molecular profile that is associated to their virulence profile.

Results from the present study can be incorporated to breeding soybean programs with the aim of identifying and incorporate genes resistant to diseases; thus, it will become a tool that avoids the excessive application of phytosanitary, contribute to environment and natural resources preservation and achieve and safer and secure food.

aislamientos discreparon en su comportamiento frente a los cultivares que portan genes Rpsd conocido y presentan un perfil molecular común asociado al perfil de virulencia.

Los resultados de este estudio pueden ser agregados a programas de mejoramiento del cultivo con el fin de identificar e incorporar genes de resistencia a enfermedades, constituyendo una herramienta que, al evitar el uso excesivo de fitosanitarios, contribuye a la preservación del ambiente y los recursos naturales, logrando un alimento más sano y seguro para su consumo.

CONCLUSIONES

La variabilidad patogénica se detectó sobre el conjunto de cultivares de soja evaluados y la variabilidad molecular en el grupo de aislamientos del complejo *Diaporthe/Phomopsis*, lo cual permitió separar las dos especies bajo estudio (*P. longicolla* y *P. sojae*).

La variabilidad genética en el germoplasma fúngico y vegetal (cultivares de *G. max*) se correspondió con la diversidad de reacciones específicas durante el desarrollo de la enfermedad TTV de la soja.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Paolo Cacchiarelli, Carlos O Gosparini, Carlos A Cairo, Bibiana Ferrari y a las Instituciones: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de Rosario (UNR), Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR, UNR-CONICET), GDM Seeds y a la Bolsa de Comercio de Rosario.

LITERATURA CITADA

- Alzugaray, C., N. Carnevale, A. Salinas, y R. Pioli. 2007. Factores bióticos y abióticos que afectan la calidad de las semillas de *Schinopsis balansae* Engl y *Aspidosperma* quebracho-blanco Schlttdl. Rev. Iber. Micol. 24: 142-147.
- Chiesa, M. A., R. Pioli, and E. Morandi. 2009. Specific resistance to soybean stem canker conferred by the Rdm4 locus. Plant Pathol. 58: 1032-1038.
- De Wit, P. J. G. 1992. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 30: 391-418.
- Dissanayake, A. J., A. J. L. Phillips, K. D. Hyde, J. Y. Yan, and X. H. Li. 2017. The current status of species in *Diaporthe*. Mycosphere 8: 1106-1156.
- Eberhart, S. A., and W. A. Russell. 1966. Stability parameters for comparing varieties. Crop Sci. 6: 36-40.

CONCLUSIONS

Pathogenic variability was detected in a set of evaluated soybean cultivars and the molecular variability in a group of isolates from the *Diaporthe/Phomopsis* complex, which allowed the separation of both fungal species (*P. longicolla* and *P. sojae*) under study.

Genetic variability in fungal and plant germplasm (*G. max* cultivars) was associated to diversity in specific reactions during the development of SB pathology in the soybean crop.

—End of the English version—



- Flor, H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Ann. Rev. Phytopath. 9: 275-95.
- Hernández, F., L. Faraco, C. Malik, G. Pratta, and R. Pioli. 2013. Resistance sources to stem and pod blight of soybean caused by two *Phomopsis* species in Argentina. Biocell 37: 81-159.
- Hernández, F. E., R. N. Pioli, A. M. Peruzzo, A. N. Formento, y G. R. Pratta. 2015. Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *P. longicolla* (teleomorfo desconocido: *Diaportheales*) de la región templada y subtropical de Argentina. Rev. Biol. Trop. 63: 871-884.
- Jackson, E. W., F. Chunda, F. Patrick, and C. Pengyin. 2009. Genetic mapping of resistance to *Phomopsis* seed decay in the soybean breeding line MO/PSD-0259 (PI562694) and Plant Introduction 80837. J. Hered. 100: 77-783.
- Pioli, R. N., R. Benavidez, y E. N Morandi. 1997. Estudio preliminar sobre la incidencia de patógenos en semillas de soja fresca para consumo humano. Fitopatología 32: 106-120.
- Pioli, R. N., E. N. Morandi, C. O. Gosparini, and A. L. Borghi. 1999. First report on pathogenic variability of different isolates of *D. phaseolorum* var. *meridionalis* on soybean in Argentina. Ed. American Phytopathol Soc. Plant Dis. Note 83: 1071.
- Pioli, R. N., R. Benavidez, E. N Morandi, and M. Bodrero. 2000. Epidemiological study of diseases associated to soybean carpels and seeds, Santa Fe, Argentina. Fitopatología 35: 111-118.
- Pioli, R. N., E. N. Morandi, M. C. Martínez, M. F. Lucca, A. Tozzini, V. Bisaro, and H. E. Hopp. 2003. Morphological, molecular and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the soybean producing area of Argentina. Phytopathology 93: 136-146.
- Smith, S., P. Fenn, P. Chen, and E. Jackson. 2008. Inheritance of resistance to *Phomopsis* seed decay in PI 360841 Soybean. American Genetic Association. J. Hered. 99: 588-592.

- Sun, S., V. Kyujung, K. Moon Young, L. Yeong-Ho, K. Jong-Min, B. In-Youl, L. Yin-Won, L. Weixian, and L. Suk-Ha. 2012. Evaluation of soybean cultivars for resistance to *Phomopsis* seed decay in Korea. *J. Crop Sci. Biot.* 15: 85-91.
- Udayanga, D., L. A. Castlebury, A. Y. Rossman, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2014. The *Diaporthe sojae* species complex: phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. *Fung. Biol.* 119: 383-407.
- Vidic, M., S. Jasnic, and J. Miladinovic. 1995. The pathogenicity of *Phomopsis sojae* and *Phomopsis longicolla* isolates on soybeans. *Zastita-Bilja* 46: 197-205.
- Vidic, M., K. Petrovic, V. Đorđević, and L. Riccioni. 2013. Occurrence of *Phomopsis longicolla* conidia in naturally infected soybean. *J. Phytopath.* 161: 470-477.
- Yan, W., and D. E. Falk. 2002. Biplot analysis of host-by-pathogen data. *Plant Dis.* 86: 1396-1401.
- Zimmerman, M. S., and Minor H. C. 1993. Inheritance of *Phomopsis* seed decay resistance in soybean PI 417479. *Crop Sci.* 32: 96-100.