

Artículo científico

Evaluación *in vitro* de la influencia de la temperatura en la germinación carpogénica de *Sclerotinia sclerotiorum* nativo del Noroeste Argentino.***In vitro* evaluation of temperature influence on native *Sclerotinia sclerotiorum* carpogenic germination of Northwest Argentina.**E. Allori Stazonelli^{1, 2*}; M.G. Yasem de Romero¹; L.D. Ploper^{1, 2, 3}

¹ Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Av. Kirchner 1900, (4000), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. *E-mail: enzo_0387@hotmail.com

² CONICET,

³ Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes. Wiliam Cross 3150, Las Talitas, Tucumán, Argentina.

Resumen

En el Noroeste Argentino, la producción de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) representa una importante actividad agrícola. Uno de los problemas sanitarios más complejos es provocado por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, el cual produce esclerocios capaces de germinar carpogénica o miceliogénicamente e infectar a las plantas. Entre otros factores ambientales, la temperatura previa a la germinación de los esclerocios puede alterar la intensidad de la enfermedad producida por el patógeno. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de la temperatura en la germinación carpogénica de un aislamiento nativo de *Sclerotinia sclerotiorum*. El aislamiento LA11 fue aislado de plantas de poroto con síntomas de la enfermedad de la provincia de Catamarca, Argentina e identificado a nivel de especie como *S. sclerotiorum*. Los esclerocios del patógeno fueron sometidos a dos temperaturas (4 ± 2 °C y 25 ± 2 °C) durante 4 semanas y luego incubados sobre arena húmeda a 20 ± 2 °C para favorecer su germinación carpogénica. Los esclerocios tratados con bajas temperaturas alcanzaron una media de esclerocios germinados de 86 % y una tasa de germinación de 3,7 apotecios y/o estípites/ esclerocio/ semana, mientras que los tratados con altas temperaturas, 43 % y 2,2 apotecios y/o estípites/ esclerocio/ semana. El aislamiento LA11 se comporta como una cepa que requiere de bajas temperaturas para producir mayor germinación carpogénica, dicho conocimiento permitirá diseñar estrategias de manejo oportunas y eficientes que permitan reducir los niveles de enfermedad que este patógeno genera.

Palabras clave: Esclerocio; Germinación carpogénica, *Sclerotinia sclerotiorum*; Temperatura.

Abstract

Production of bean (*Phaseolus vulgaris* L.), is an important agricultural activity in Northwestern Argentina (NWA). Currently, fungus *Sclerotinia sclerotiorum* originates one of the most serious health problems. Sclerotia, which is able to carpogenic or miceliogenic germinate and infect to plants. Temperature prior sclerotia germination is among other environmental factors that can change and influence pathogenicity of the disease. This study aimed at studying the influence of temperature on the carpogenic germination of a native isolate of *Sclerotinia sclerotiorum*. An isolate of LA11 strain identified as *S. sclerotiorum* from infected bean plants originated at Catamarca province was used in this study. Sclerotia of the pathogen were subjected to temperatures of 4 and 25 (± 2) °C for a period of four weeks and then incubated on wet sand at 20 (± 2) °C to promote carpogenic germination. The results showed that a mean of germinated sclerotia equal to 86% and a germination rate of 3.7 apothecia/ sclerotia/ week were observed for sclerotia treated at the lowest temperatures. In the case of sclerotia treated at the highest temperatures, a mean of 43% and rate of 2.2 apothecia/ sclerotia/ week were found. LA11 strain behaves as a pathogen that requires low temperatures to produce more carpogenic germination. This knowledge will allow design strategies for timely and efficient management to reduce pathogen disease levels.

Keywords: Sclerotia; Carpogenic germination; *Sclerotinia sclerotiorum*; Temperature.

Recibido 17/05/16; Aceptado 23/06/16.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Introducción

En el Noroeste Argentino (NOA), la producción de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) representa una importante actividad agrícola, destinándose en su mayor parte a la exportación. Se estima que la superficie sembrada en el país en la campaña 2012 fue de 450.000 ha, de las cuales 270.000 ha corresponden a poroto negro, 120.000 ha a poroto blanco y 60.000 ha a otros colores (Vizgarra *et al.*, 2012). Uno de los problemas sanitarios más complejos y que causa graves pérdidas es provocado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (Ascomycotina) agente causal del moho blanco del poroto y las hortalizas. Se trata de un fitopatógeno polífago, habitante del suelo, el cual produce estructuras de resistencia denominadas esclerocios en ausencia de los hospederos y/o en condiciones climáticas desfavorables. Infecta alrededor de 278 géneros y 408 especies de vegetales en todos los estadios de crecimiento y en productos cosechados (Boland y Hall, 1994). La capacidad de supervivencia, durante varios años, hace al esclerocio el componente central de la epidemiología de la enfermedad causada por *S. sclerotiorum*. El esclerocio puede germinar carpogénica o miceliogénicamente, dependiendo de las condiciones ambientales. El mismo, al germinar miceliogénicamente produce micelio infectivo capaz de atacar los tejidos de las plantas próximas (LeTorneau, 1979; Bardin y Huang, 2001), mientras que, los que germinan carpogénicamente producen apotecios y subsecuentemente, numerosas ascosporas que infectan las partes aéreas de las plantas.

La mayor cantidad de enfermedad producida por este patógeno es iniciada por las ascosporas provenientes de los apotecios. Estos están formados por un estípite que se origina del esclerocio y un receptáculo con una capa himenial cóncava (2-10 mm de diámetro) de color ocre claro. Dicha capa tiene filas de ascos, formados por bolsas cilíndricas, que contienen 8 ascosporas hialinas binucleadas (4-6 x 9-14 μ m) por asco (Kohn, 1979). La germinación carpogénica juega un importante rol en la epidemiología de la enfermedad ya que cada apotecio puede producir, bajo óptimas condiciones, más de 1 millón de ascosporas (Liu y Paul, 2007), aproximadamente 1600 esporas/h durante 10 días y mantenerse viables por largos periodos (Clarkson *et al.*, 2003). Las ascosporas son diseminadas por las corrientes de aire y se depositan en las plantas generando nuevas infecciones, en la

mayoría de los casos, en lugares próximos a donde han sido producidas (Wegulo *et al.*, 2000), sin embargo algunas pueden ser transportadas varios kilómetros (Li *et al.*, 1994). Los factores ambientales que condicionan la germinación carpogénica son la humedad del suelo (Morrall, 1977), la temperatura del suelo y la temperatura a la cual los esclerocios estuvieron sometidos previamente a su germinación (Huang y Kozub, 1989). El comportamiento de cada aislamiento varía de acuerdo a su origen geográfico debido a que el patógeno se encuentra adaptado a las condiciones climáticas locales. El tratamiento con bajas temperaturas puede alterar la germinación carpogénica de los esclerocios provenientes de regiones cálidas, produciendo una germinación más rápida en la mayoría de los casos (Huang y Kozub, 1991; Liu y Paul, 2007). Los aislamientos procedentes de regiones con clima fresco (10 °C) podrían germinar más rápidamente que los producidos a altas temperaturas (25 - 30 °C), mientras que los provenientes de regiones tropicales no requieren bajas temperaturas para germinar carpogénicamente (Huang y Kozub, 1991).

En Argentina, este patógeno a mediados de la década de los 90 ocasionó la pudrición húmeda del tallo en el cultivo de soja, convirtiéndose en una epifitía que provocó pérdidas de rendimiento de hasta el 55 % en algunos lotes (Ploper, 2004). Wrather *et al.*, (2001) mencionaron que la podredumbre húmeda afectó a la soja en la subregión pampeana norte y que en la campaña 1997/98 las abundantes lluvias y temperaturas frescas la favorecieron, causando mayores pérdidas de rendimiento que en años anteriores. Mediante la implementación de adecuadas técnicas de manejo, las cuales fueron posibles gracias al estudio de las características propias del patógeno y su relación con el cultivo de soja, se pudo reducir el impacto de esta enfermedad. En este caso, la incorporación de cultivares de maduración temprana y fechas de siembra también tempranas, convirtieron a la pudrición húmeda del tallo en un problema menor y ocasional para los productores (Ploper, 2004).

Actualmente, en las zonas productoras de poroto en el NOA es común encontrar lotes destinados al cultivo que presentan una elevada densidad de esclerocios en el suelo, lo que garantiza la presencia de la enfermedad en las campañas agrícolas. Dicha problemática ocasiona considerables pérdidas de rendimiento en el cultivo y requiere el uso indispensable de fungicidas para reducir los

altos niveles de enfermedad que afectan al cultivo. Por lo tanto, el conocimiento del comportamiento de las cepas patógenas nativas, en cuanto a su dinámica de germinación carpogénica, resultaría de gran utilidad para poder diseñar medidas de control de la enfermedad.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de las temperaturas sobre los esclerocios en la posterior germinación carpogénica de un aislamiento nativo de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Materiales y métodos

Aislamiento del agente patógeno

El aislamiento patógeno (LA11) fue obtenido a partir de vainas de plantas de poroto que presentaron síntomas típicos de la enfermedad (pudrición blanda) provenientes de la localidad de Los Altos, provincia de Catamarca, Argentina, en la campaña 2011-2012.

En el laboratorio de la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Tucumán, bajo condiciones de asepsia, se extrajeron los esclerocios del interior de las vainas de las plantas enfermas. Las estructuras de resistencia fueron desinfectadas superficialmente con sucesivas inmersiones en alcohol etílico 70 % (un minuto), hipoclorito de sodio 1 % (un minuto) y agua destilada estéril (2 veces durante 1 minuto cada vez). Se sembraron en medio de cultivo agar papa glucosado (APG) al 2 % y fueron incubadas a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 12 horas de luz día. Una vez desarrollado el patógeno, se extrajeron los esclerocios de las cajas y se almacenaron a 4 ± 2 °C para su posterior empleo.

Identificación molecular del agente patógeno

Con el objeto de identificar el aislamiento patógeno, partiendo de colonias puras se realizaron repiques en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo APG al 2 %. Luego de 10 días de incubación se observaron las características de los esclerocios y su patrón de distribución sobre la superficie de las colonias (Kohn, 1979; Willetts y Wong, 1980).

En el laboratorio de Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones se extrajo el ADN del aislamiento de *Sclerotinia* spp. a partir de fragmentos de micelio utilizando

el método del acetato de potasio. El micelio fue previamente lavado y posteriormente triturado con buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1,5 M, EDTA 50 mM pH 8, Proteinasa K, 0,1 mg/ml, β -mercaptoetanol 10 mM, SDS 2 %) y digerido a 60 °C por 1 h agitando con vórtex cada 10 min. Se purificó utilizando cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), por dos veces, y acetato de potasio 3 M.

Para realizar la identificación del aislamiento se amplificó la región ITS1– 5,8S–ITS2 del DNA ribosómico utilizando los cebadores ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4: TCCTC-CGCTTATTGATATGC descriptos por White *et al.* (1990). La PCR se llevó a cabo en 20 μ l de volumen final conteniendo Buffer 1X, cloruro de magnesio 2,5 mM, dNTPs 200 μ M, 10 pM de cada cebador, Taq polimerasa 0,5 U. El programa de amplificación utilizado constó de una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 4 min seguido de 35 ciclos de amplificación (40 s a 94 °C, 40 s a 50 °C y 40 s a 72 °C), y una extensión final de 10 min a 72 °C.

Los productos de la PCR fueron chequeados en geles de agarosa 2 %, secuenciados utilizando el servicio de Macrogen Corea y analizados con el programa Geneius 3.1.6. Las secuencias fueron contrastadas con la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para determinar su grado de identidad y similitud.

Multiplificación de esclerocios

El aislamiento patógeno se multiplicó en medio de cultivo APG al 2 % partiendo de esclerocios almacenados a 4 ± 2 °C previamente desinfectados superficialmente. Erlenmeyers con 50 g de trozos de raíces de zanahoria, previamente lavados con agua corriente y autoclavados a 120 °C por 20 minutos se incubaron con 3 discos de micelio de 6 mm de diámetro procedentes del borde de la colonia de 5 días de edad del patógeno. Los esclerocios maduros fueron colectados luego de 3 semanas de incubación a 20 ± 2 °C y 12 h de luz día.

Evaluación de la dinámica de la germinación carpogénica del aislamiento nativo LA11

Los esclerocios del patógeno fueron separados por su tamaño, se seleccionaron aquellos de 1 a 2 cm de diámetro y se descartaron los demás. Un grupo de esclerocios fue sometido a temperaturas

bajas ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) y otro a temperaturas altas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 4 semanas (Huang y Kozub, 1989). Posteriormente fueron removidos y colocados sobre arena estéril saturada de humedad en cajas de Petri de 120 mm de diámetro e incubados a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h de luz día y 4.500 a 20.000 lux de intensidad lumínica para favorecer la producción de apotecios (Bae y Knudsen, 2007).

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado que contó con 4 repeticiones por tratamiento y 40 esclerocios por repetición. La cantidad de esclerocios germinados y de apotecios y/o estípites formados se evaluó semanalmente durante 5 semanas consecutivas. Se calculó la pendiente de las curvas de la dinámica de la germinación carpogénica para las dos temperaturas evaluadas, ajustándolas al modelo logístico para obtener la tasa de germinación carpogénica para ambos tratamientos. Se realizó un ANOVA y las medias de los tratamientos fueron comparadas con el test LSD Fisher empleando el software Infostat Versión 2013 (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Por otro lado, el aislamiento patógeno LA11 se agrupó dentro de la clasificación propuesta por Huangy Kozub (1991) en relación al comportamiento de los aislamientos de *S. sclerotiorum* según la germinación carpogénica.

Resultados

Aislamiento e identificación molecular del agente patógeno

El aislamiento nativo de acuerdo a lo observado en las colonias respondió a las características de las especies *S. sclerotiorum* y *S. trifoliorum*. Las colonias presentaron pocos esclerocios, de forma irregular y de gran tamaño (1 a 2 cm), los cuales se desarrollaron en la periferia de la caja de Petri y en algunos casos, de forma irregular formando parches. Raramente se distribuyeron uniformemente sobre toda la superficie de la colonia como es característico de la especie *S. minor*.

Como resultado del análisis de la región ITS1–5,8S–ITS2 del DNA del aislamiento LA 11 y la comparación de la secuencia obtenida con la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se determinó que el aislamiento nativo pertenece a la especie *S. sclerotiorum* (número de acceso: KR014868).

Evaluación de la dinámica de la germinación carpogénica del aislamiento nativo LA11

El número de esclerocios germinados fue significativamente diferente entre los tratamientos. Los esclerocios sometidos a temperaturas bajas ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) alcanzaron una media de germinación de 34,3 (86 %) mientras que los expuestos a temperaturas altas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) a 17,3 (43 %) (Figura 1).



Figura 1. Esclerocios del aislamiento LA11 de *S. sclerotiorum*, previamente sometidos a bajas temperaturas, germinando carpogénicamente sobre arena húmeda.

El análisis descriptivo de los resultados muestra una distribución simétrica de datos. Se observa además mayor variación en la germinación de esclerocios, en términos absolutos, para el tratamiento a temperaturas bajas ($4 \pm 2^\circ\text{C}$), en comparación a la observada para las temperaturas altas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (Figura 2).

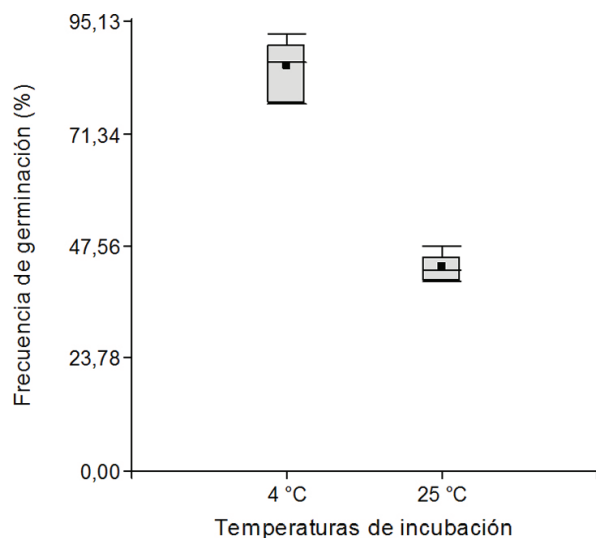


Figura 2. Frecuencia de germinación carpogénica de los esclerocios del aislamiento LA11 de *S. sclerotiorum* sometidos previamente a dos tratamientos de inducción térmica.

La dinámica de la germinación carpogénica del aislamiento nativo, mostró en la primera semana de incubación una mayor cantidad de esclerocios

y/o estípites formados en los esclerocios tratados previamente con temperaturas altas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), alcanzando valores máximos de 13 apotecios y/o estípites formados por repetición. En la segunda y tercera semana los esclerocios tratados a temperaturas bajas ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) mostraron un mayor número de esclerocios germinados que los tratados a temperaturas altas. El número máximo de esclerocios germinados y apotecios formados para ambos tratamientos se observó a la tercera semana de incubación, alcanzando valores promedios de 39 apotecios y/o estípites formados para las temperaturas altas y 149 apotecios y/o estípites cuando fueron sometidos a temperaturas bajas. A partir de la tercera semana, el número de apotecios producidos se redujo y los apotecios formados en las semanas anteriores iniciaron su proceso de senescencia (Figura 3).

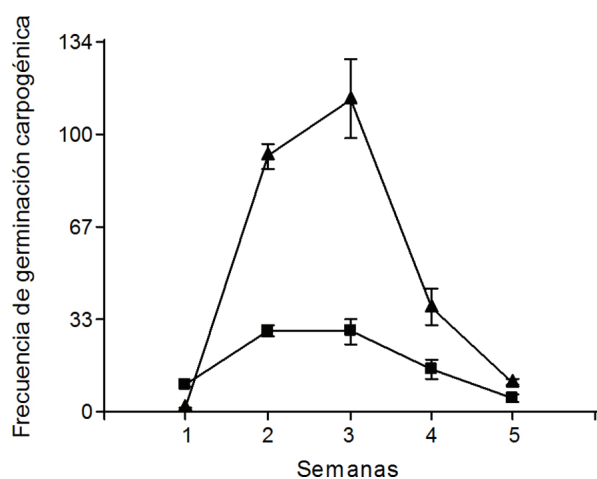


Figura 3. Dinámica de la germinación carpogénica de los esclerocios del aislamiento LA11 de *S. sclerotiorum*, sometidos previamente a dos temperaturas de inducción. —■— Temperatura alta ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Temperatura —▲— baja ($4 \pm 2^\circ\text{C}$).

Ajustando las curvas de dinámica de germinación carpogénica al modelo logístico se obtuvo la tasa de germinación carpogénica para ambos tratamientos. Los esclerocios tratados con bajas temperaturas presentaron una tasa de germinación de 3,71 apotecios y/o estípites por esclerocio por semana, mientras que los tratados con altas temperaturas 2,20 apotecios y/o estípites por semana. Además se observó que las bajas temperaturas influyeron en el número de apotecios germinados por esclerocio. Los esclerocios tratados a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ produjeron en promedio 2,8 apotecios por esclerocio mientras que los tratados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ produjeron 0,7 apotecios promedio por esclerocio.

El aislamiento LA11 de *S. sclerotiorum* de

acuerdo a sus características de germinación se ubicó en el Grupo A propuesto por Huang y Kozub (1991) donde los esclerocios formados entre 10 y 25°C presentan una reducida o nula germinación si no son inducidos previamente con bajas temperaturas.

Discusión

Los resultados obtenidos con el aislamiento nativo LA11 de *S. sclerotiorum* muestran que periodos previos a la germinación carpogénica de los esclerocios con bajas temperaturas favorecen la germinación de los esclerocios y un mayor número de apotecios producido por cada esclerocio. Resultados semejantes fueron obtenidos por Huang y Kozub (1991) quienes evaluaron cepas de *S. sclerotiorum* de diferentes procedencias geográficas y observaron en un aislamiento de origen argentino (SS- Arg.) un 93,2 % de germinación carpogénica en esclerocios tratados previamente con bajas temperaturas. También coinciden con lo expuesto por Dillard *et al.* (1995) quienes determinaron que los esclerocios procedentes de ciudades cálidas presentaron dormancia y requirieron en entre 4 a 8°C para germinar.

Se observó además, que el comportamiento del aislamiento nativo fue acorde al origen geográfico al cual pertenece, coincidiendo con lo expresado por Liu y Paul (2007) y Huang y Kozub (1991) quienes vieron que los esclerocios provenientes de regiones con estación cálida, producían una germinación mayor al ser tratados con temperaturas bajas previas a su germinación carpogénica. Este resultado pone de manifiesto la adaptación del patógeno a las condiciones climáticas locales.

De acuerdo al comportamiento observado en el aislamiento nativo LA11, el monitoreo de las condiciones meteorológicas previas al inicio de las infecciones de *S. sclerotiorum*, representa un factor de gran importancia en la epidemiología de la enfermedad, ya que una mayor germinación carpogénica estaría asociada a una elevada producción de apotecios con la capacidad de liberar alrededor de 1 millón de ascosporas/ apotecio de acuerdo a lo descrito por Liu y Paul, (2007), además de la elevada viabilidad que presentarían dichas ascosporas (Clarkson *et al.*, 2003).

El conocimiento del comportamiento de las cepas patógenas nativas asociadas al cultivo de poroto, representa un importante aporte al conocimiento del patosistema, lo que permitirá diseñar

estrategias de manejo oportunas y eficientes para reducir los elevados niveles de enfermedad que ellas ocasionan.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Cecilia Gladys Díaz, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Secretaría de Ciencia, Arte e Innovación Tecnológica de la UNT (SCAIT) y a la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la UNT.

Referencias bibliográficas

- Bae Y.S., Knudsen G.R. (2007). Effect of sclerotial distribution pattern of *Sclerotinia sclerotiorum* on bio-control efficacy of *Trichoderma harzianum*. *Applied Soil Ecology* 35 (1): 21-24.
- Bardin S.D., Huang H.C. (2001). Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 88-98.
- Boland G.J., Hall R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16: 93-108.
- Bolton M.D., Thomma B.P.H.J., Nelson B.D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7 (1): 1-16.
- Clarkson J.P., Staveley J., Phelps K., Young C.S., Whipps J.M. (2003). Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycology Research* 107: 213-222.
- Dillard H.R., Ludwig J.W., Hunter J.E. (1995). Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* for carpogenic germination. *Plant Disease* 79: 411-415.
- Di Rienzo JA, Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2008). InfoStat versión 2008, Grupo InfoStat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Huang H.C., Kozub G.C. (1989). A simple method for production of apothecia from sclerotia for *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Protection Bulletin* 31: 333-345.
- Huang H.C., Kozub G.C. (1991). Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 32: 279-286.
- Kohn L.M. 1979. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69: 881-886.
- Le Tourneau D. (1979). Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. *Phytopathology* 69: 887-890.
- Li Y.B., Yongli Z., Nian L.B. (1994). Study on the dissemination distance of sunflower stem rot fungus. *Plant Protection* 20: 12-13.
- Liu Y., Paul V.H. (2007). Studies on the germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Diseases and Protection* 114 (1): 14-19.
- Morrall R.A.A. (1977). Preliminary study of the influence of water potential on sclerotium germination in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Botany* 55: 8-11.
- Ploper, L.D. (2004). Economic importance of and control strategies for the major soybean disease in Argentina. En: VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Processing and Utilization Conference, III Congresso Brasileiro de Soja. 29 febrero - 5 marzo, Foz do Iguassu, Brasil. Pp. 606- 614.
- Vizgarra O., Espeche C., Mamani S., Velázquez D., Ploper D. (2012). Consideraciones generales de la campaña de poroto 2012 y resultados de los ensayos evaluados en el Noroeste Argentino. *EAAOC - Avance Agroindustrial* 33 (3): 29-34.
- Wegulo S.N., Sun P., Martinson C.A., Yang X.B. (2000). Spread of *Sclerotinia* stem rot two of soybean from area and point sources of apothecial inoculum. *Canadian Journal of Plant Science* 80: 389-402.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.). Academic Press, San Diego. Pp. 315- 322.
- Willetts H.J., Wong J.A.L. 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifolium*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *The Botanical Review* 46: 101-165.
- Wrather J.A., Anderson T.R., Arsyad D.M., Tan Y., Ploper L.D., Port-Puglia A., Ram H.H., Yorinori J.T. (2001). Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 23: 115- 121.