

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SALTA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

TESIS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Variabilidad fenotípica y genotípica de
aislamientos de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de
Bary, agente causal de la esclerotinia del poroto en
el NOA**

**Lic. Carla Luciana Abán
Tresista**

**Dra. Marta Galván
Directora**

Año 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SALTA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Avda. Bolivia 5150. Salta. Capital, República Argentina



**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO
ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTOR/A EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución N°: 746/13- CONEAU -13

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN

Dra. Adriana Álvarez

Dra. Eleonora Harries

JURADOS DE TESIS

Dra. Viviana Barrera

Dr. Atilio Castagnaro

Dra. Eleonora Harries



Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en:

Estación Experimental Agropecuaria Salta - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA EEA Salta) - Ruta Nac. 68 km 172 (4403) Cerrillos, Salta - Argentina.

El apoyo financiero para la realización de este trabajo de Tesis Doctoral provino del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de INTA - Proyecto Específico: PNHFA-1106075; y Proyectos Regionales con Enfoque Territorial: SALJU-1232307.

*A mi esposo Tito,
A mis padres Adriana y Miguel,
A mi hermana Marina
A mis abuelos Dinita y Ángel*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a INTA Estación Experimental Salta por brindarme la oportunidad y el espacio para realizar este postgrado.

A la Dra. Marta Galván, por guiarme y acompañarme a lo largo de esta tesis con gran dedicación y confianza, brindándome los consejos necesarios para el cumplimiento de mis objetivos.

A la Ing. Norma Casalderrey, por su enseñanza en el área de la fitopatología.

Al equipo de Sanidad Vegetal, Don Mario, Noe, Ale y Guada por tener siempre buena predisposición y ayudarme desinteresadamente.

Al Ing. Marcelo Salgado por su colaboración y sus valiosas sugerencias.

A los jurados, por las críticas constructivas que hicieron de esta tesis, un mejor trabajo.

A Gisel, Móni y Yami, amigas gracias por acompañarme desde el principio enseñándome el valor de la amistad y la complicidad. Gracias por las charlas compartidas, por las tardes de laboratorio, por estar siempre.

A mis amigos de toda la vida, Natalí, Natalia y Mariano, por sus consejos, cariño y motivación constante, aún en las distancias, que hacen más fácil este camino.

A mis padres, Adriana y Miguel, a mi hermana Marina y Pedro, a mis abuelos y a toda mi familia por su amor, por ser tan comprensivos, por su apoyo constante y por guiarme en todos los momentos de mi vida.

A mi esposo Tito, gracias por tu amor incondicional, por escucharme y apoyarme en cada decisión, por comprender mis tiempos y ausencias para poder hoy compartir con alegría esta meta alcanzada.

A todos aquellos que fui encontrando en este camino y colaboraron, de una manera u otra, para que este trabajo fuera posible.

A todos, muchas gracias!

Índice general

ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
Publicaciones.....	6
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
1.1 El poroto común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	8
1.1.1 Etapas de desarrollo de la planta de poroto.....	9
1.1.2 Importancia nutricional del poroto común.....	11
1.1.3 La producción mundial y nacional de poroto.....	12
1.1.4 Requerimientos culturales del cultivo de poroto	17
1.1.5 Problemática fitosanitaria del cultivo de poroto.....	18
1.2 Esclerotinia o moho blanco del poroto	19
1.2.1 Taxonomía	20
1.2.2 Sintomatología	22
1.2.3 Epidemiología y ciclo de vida.....	23
1.2.4 Manejo de la enfermedad	25
1.2.5 Variabilidad genética.....	26
1.3 Hipótesis	31
1.4 Objetivos	31
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	32
2.1 INTRODUCCIÓN	33
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.2.1 Obtención de aislados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	36
2.2.2 Caracterización morfológica	38
2.2.3 Test de compatibilidad micelial.....	38
2.2.4 Análisis de la diversidad de los MCG.....	39
2.2.5 Caracterización molecular	40
2.2.6 Análisis de los datos.....	42
2.2.7 Ensayo de patogenicidad.....	45
2.3 RESULTADOS	47

2.3.1 Caracterización morfológica	48
2.3.2 Grupos de compatibilidad micelial	51
2.3.3 Caracterización molecular	53
2.3.4 Análisis de la varianza molecular	58
2.3.5 Ensayo de patogenicidad	59
2.4 DISCUSIÓN	62
CAPÍTULO III: ANÁLISIS DE ESTRUCTURA POBLACIONAL Y COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DE <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	66
3.1 INTRODUCCIÓN	67
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	70
3.2.1 Genotipado empleando microsatélites	70
3.2.2 Diversidad genética.....	70
3.2.3 Análisis de agrupamientos y de coordenadas principales.....	72
3.2.4 Análisis de la varianza molecular.....	72
3.2.5 Estructura poblacional	73
3.2.6 Desequilibrio de ligamiento	73
3.2.7 Análisis de correlación	75
3.3 RESULTADOS	76
3.3.1 Diversidad genética.....	76
3.3.2 Análisis de agrupamientos y de coordenadas principales.....	81
3.3.3 Análisis de la varianza molecular.....	84
3.3.4 Análisis de diferenciación genética	85
3.3.5 Análisis de estructura poblacional	86
3.3.6 Desequilibrio de ligamiento	89
3.3.7 Desequilibrio de ligamiento entre pares de loci	95
3.3.8 Relación entre MLH y MCG	98
3.3.9 Análisis de correlación	101
3.4 DISCUSIÓN	102
CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DE GERMOPLASMA PARA LA RESISTENCIA A ESCLEROTINIA	107
4.1 INTRODUCCIÓN	108
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	111
4.2.1 Germoplasma de poroto	111

4.2.2 Aislados de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	112
4.2.3 Preparación del inóculo y evaluaciones en invernadero.....	113
4.2.4 Análisis de datos.....	115
4.3 Resultados.....	116
4.3.1 Evaluación de germoplasma durante 21 días post-inoculación.....	116
4.3.2 Evaluación de germoplasma a corto, mediano y largo plazo.....	118
4.3.3 Análisis de la respuesta a corto, mediano y largo plazo frente a cada uno de los cinco aislados de <i>S. sclerotiorum</i> utilizados.....	120
4.3.4 Análisis de la Varianza	124
4.3.5 Análisis de correlación	125
4.4 Discusión.....	126
CAPÍTULO V: CONSIDERACIONES FINALES.....	129
CAPÍTULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
ANEXO.....	148

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lotes muestrados, número y procedencia de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> obtenidos a partir del relevamiento de 13 lotes de cultivos comerciales de poroto de las provincias de Salta y Jujuy.....	36
Tabla 2. Lotes analizados, localidad, número y hospedante de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> de las principales zonas de producción de poroto del NOA.....	48
Tabla 3. Caracterización morfológica de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> , indicando nombre de identificación, localidad y provincia donde fue recolectado, color de micelio, distribución y número de esclerocios por placa.....	49
Tabla 4. Grupos de compatibilidad micelial (MCG) y diversidad de MCG (H_0) de las poblaciones de <i>S. sclerotiorum</i> de las diferentes localidades muestreadas.....	53
Tabla 5. Designaciones de los haplotipos URP y frecuencias asociadas con el grupo de compatibilidad micelial (MCG) de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> de lotes comerciales de poroto en el noroeste de Argentina.....	56
Tabla 6. Análisis de la varianza molecular de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> de 6 localidades productoras de poroto del NOA basado en los datos de marcadores URP.....	58
Tabla 7. Diferenciación poblacional medida por F_{ST} (diagonal inferior) y flujo de genes (N_m) (diagonal superior) entre 6 poblaciones de <i>S. sclerotiorum</i> en el noroeste Argentino basado en los datos de marcadores URP.....	59
Tabla 8. Análisis de correlación entre grupos de compatibilidad micelial (MCG), haplotipos URP y distancia geográfica entre localidades (r : diagonal inferior; P : diagonal superior)..	59
Tabla 9. Grupos de compatibilidad micelial (MCG), longitud de infección (LI), agresividad (A) y haplotipos URP (H) de los 116 aislados de <i>S. Sclerotiorum</i>	61
Tabla 10. Diversidad alélica en nueve loci de microsatélites utilizados para caracterizar aislados de <i>S. sclerotiorum</i> de Salta y Jujuy, Argentina.....	76
Tabla 11. Diversidad genotípica de los 109 aislados de <i>S. sclerotiorum</i> antes de la corrección de clones.....	79
Tabla 12. Diversidad genotípica de los 109 aislados de <i>S. sclerotiorum</i> después de la corrección de clones.....	80
Tabla 13. Análisis de la varianza molecular de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> de 6 localidades productoras de poroto del NOA basado en los datos de SSR sin corrección de clones.....	84

Tabla 14. Análisis de la varianza molecular de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> de 6 localidades productoras de poroto del NOA basado en los datos de SSR con corrección de clones.....	84
Tabla 15. Diferenciación poblacional medida por F_{ST} (bajo la diagonal) y flujo de genes (N_m) (sobre la diagonal) entre 6 poblaciones de <i>S. sclerotiorum</i> del noroeste Argentino basado en datos de SSR.....	85
Tabla 16. Índice de asociación (I_A), índice de asociación estandarizado (rd), valor de significancia (P) y tipo de reproducción (Repr.) de las poblaciones de <i>S. sclerotiorum</i> antes y después de la corrección clonal (CC).....	90
Tabla 17. Desequilibrio de ligamiento, calculado antes de la corrección de clones, entre pares de siete loci de microsatélites utilizados para caracterizar todos los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> . I_A (bajo la diagonal) y rd (sobre la diagonal).	95
Tabla 18. Desequilibrio de ligamiento después de la corrección de clones, calculado entre pares de siete loci de microsatélites utilizados para caracterizar todos los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> . I_A (bajo la diagonal); rd (sobre la diagonal).....	96
Tabla 19. Designaciones de los haplotipos SSR y frecuencias asociadas con el grupo de compatibilidad micelial (MCG) de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i>	100
Tabla 20. Análisis de correlación entre grupos de compatibilidad micelial (MCG), haplotipos MLH y distancia geográfica entre localidades (r : diagonal inferior; P : diagonal superior).....	101
Tabla 21. Tipo y tamaño de semilla, hábito de crecimiento, origen y respuesta a diferentes enfermedades de poroto de los 20 genotipos evaluados para resistencia a esclerotinia..	112
Tabla 22. Origen y características de los cinco aislados de <i>S. sclerotiorum</i> utilizados para evaluar germoplasma de poroto frente a esclerotinia.	113
Tabla 23. Valores medios del índice de severidad y ABCPE de la reacción de 20 genotipos de poroto a cinco aislados de <i>S. sclerotiorum</i> evaluados a los 7, 14 y 21 días post-inoculación (DPI).....	120
Tabla 24. Valores medios del índice de severidad de la reacción de 20 genotipos de poroto a los aislados SS8, SS154, SS87, SS22 and SS54 <i>S. sclerotiorum</i> a los 7, 14 y 21 días post-inoculación.	122
Tabla 25. Valores medios del índice de severidad de la reacción promedio de los 20 genotipos de poroto a los 7, 14 y 21 días post-inoculación con los aislados SS8, SS154, SS87, SS22 y SS54 de <i>S. sclerotiorum</i>	123
Tabla 26. Análisis de varianza de la respuesta de 20 genotipos de poroto a 5 aislados de <i>S. sclerotiorum</i> evaluados a los 7 días post-inoculación.....	124

Tabla 27. Análisis de varianza de la respuesta de 20 genotipos de poroto a 5 aislados de <i>S. sclerotiorum</i> evaluados a los 14 días post-inoculación.....	124
Tabla 28. Análisis de varianza de la respuesta de 20 genotipos de poroto a 5 aislados de <i>S. sclerotiorum</i> evaluados a los 21 días post-inoculación.....	124
Tabla 29. Coeficiente de correlación entre 20 genotipos de poroto y 5 aislados de <i>S. sclerotiorum</i> a los 7, 14 y 21 días post-inoculación.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los hábitos de crecimiento del poroto común (Debouck & Hidalgo, 1985).....	9
Figura 2. Etapas de desarrollo del cultivo de poroto (IICA, 2008).....	11
Figura 3. Promedio de la producción de poroto de los países productores en el mundo, período 2006-2016 (FAO, 2018).....	12
Figura 4. Producción mundial de porotos año 2016 (FAO, 2018). Elaboración propia con base en FAOSTAT.....	13
Figura 5. Ranking de los principales países exportadores de poroto, año 2016 (FAO, 2018).	14
Figura 6. Distribución por provincia de la producción de porotos Alubia, Negros y otros (MHyFP, 2016).....	15
Figura 7. Producción de porotos en Argentina durante los años 2010-2016 (FAO, 2018).	16
Figura 8. Superficie sembrada con poroto en Argentina por variedad durante el período 2010-2016 (MHyFP, 2016).....	17
Figura 9. Triángulo de la enfermedad.....	18
Figura 10. Representación esquemática de la región de ADNr y las secuencias ITS (<i>internal transcribed spacer</i>) (Schöch <i>et al.</i> , 2012).....	22
Figura 11. Síntomas de esclerotinia en plantas de poroto. A) Síntoma en tallo. B) Síntoma en hoja. C) Esclerocios en vainas. D) Esclerocios sobre tallos. E) Esclerocios dentro de vainas. F) Esclerocios dentro de tallos.....	23
Figura 12. Ciclo de vida de <i>S. sclerotiorum</i> (Negrillo <i>et al.</i> , 2009).....	24
Figura 13. A) Producción in vitro de apotecios de <i>S. sclerotiorum</i> . B) Liberación de ascosporas de <i>S. sclerotiorum</i> (Pethybridge <i>et al.</i> , 2015).....	25
Figura 14. Reacciones de compatibilidad e incompatibilidad micelial (Glass & Kaneko, 2003).....	27
Figura 15. Distribución de las poblaciones de <i>S. sclerotiorum</i> en las cuales se estudió su modo de reproducción utilizando marcadores RFLP (estrella) o SSR (círculo) (Lehner & Mizubuti, 2017a). La zona tropical está delimitada entre los trópicos de Cáncer y Capricornio. Las zonas subtropicales se delimitan entre los 23.5 y 40° de latitud, mientras que las regiones superiores a los 40° en ambos hemisferios se consideran zonas de clima templado. 1 = Cubeta <i>et al.</i> (1997); 2 = Kohli y Kohn (1998); 3 = Sexton y Howlett (2004); 4 = Atallah <i>et al.</i> (2004); 5 = Sexton <i>et al.</i> (2006); 6 = Winton <i>et al.</i> (2006); 7 = Malvárez <i>et al.</i>	

(2007); 8 = Hemmati <i>et al.</i> (2009); 9 = Ekins <i>et al.</i> (2011); 10 = Clarkson <i>et al.</i> (2013); 11 = Attanayake <i>et al.</i> (2013); 12 = Aldrich-Wolfe <i>et al.</i> (2015); y 13 = Lehner <i>et al.</i> (2015b)....30
Figura 16. Lotes comerciales muestreados en las principales zonas de producción de poroto de las provincias de Salta y Jujuy.36
Figura 17. a) y d) Relevamiento de lotes y obtención de muestras para el aislado del patógeno. b) y c) Plantas con síntoma de esclerotinia a partir de las cuales se realizó el aislado del patógeno.....37
Figura 18. Prueba de compatibilidad micelial entre aislados de <i>S. sclerotiorum</i> . Las flechas señalan una reacción incompatible (banda de micelio aéreo en la zona de interacción, presencia de una delgada línea roja) entre los aislados A-B y A-C. La reacción compatible (fusión de micelios sin zona de interacción) se visualiza entre los aislados B y C. En la imagen de la derecha se observa el revés de la placa de Petri.....39
Figura 19. Etapas del ensayo de patogenicidad utilizando el método <i>Straw Test</i> . A) Crecimiento de las plantas de poroto en invernadero. B) Inoculación con discos de micelio en los tips Eppendorf, sobre el tallo cortado. C) Cámara de crecimiento con las plantas de poroto inoculadas e incubadas en condiciones controladas de temperatura y humedad...46
Figura 20. Mapas que muestran las ubicaciones de los sitios de recolección de <i>S. sclerotiorum</i> en el noroeste de Argentina. (a) Mapa de Sudamérica que destaca la ubicación del noroeste de Argentina (b) Mapa del noroeste de Argentina que muestra la zona de muestreo. (c) Los círculos representan la ubicación de los sitios muestreados: PS (Palma Sola), O (Orán), PI (Pichanal), C (Campichuelo), GB (General Ballivián) y T (Tartagal).47
Figura 21. Variación en el color de micelio y patrones diferentes de distribución de esclerocios en placas con APG de aislados de <i>S. sclerotiorum</i> luego de 15 días de incubación a $20 \pm 22^{\circ}\text{C}$. a) Micelio de color blanco y patrón de esclerocio central. b) Micelio de color blanco y patrón de esclerocios central-periférico. c) Micelio de color beige y patrón de esclerocios periféricos. d) Micelio de color marrón y patrón de esclerocios periféricos....48
Figura 22. Histogramas de las frecuencias de los grupos de compatibilidad micelial entre los 116 aislados de <i>S. sclerotiorum</i>52
Figura 23. Histogramas de las frecuencias de 59 haplotipos URP entre 116 aislados de <i>S. sclerotiorum</i>52
Figura 24. Árbol de UPGMA que muestra las relaciones genéticas entre los 116 aislados de <i>S. sclerotiorum</i> según los datos de los marcadores URP (coeficiente de Dice). A) Localidad: O, Orán (color celeste); C, Campichuelo (color amarillo); PI, Pichanal (color verde); PS, Palma Sola (color rojo); GB, Gral. Ballivián (color rosa); T, Tartagal (color azul). B) MCG. C) Agresividad: AA (altamente agresivo) y DA (débilmente agresivo).....55

Figura 25. Análisis de coordenadas principales de 116 aislados de <i>S. sclerotiorum</i> del NOA en base a datos de marcadores URP. Los círculos marcan los grupos de aislados según los sitios de colecta.....	56
Figura 26. Plantas de poroto (Leales 24 INTA) luego de 21 días de ser inoculadas con aislados de <i>S. sclerotiorum</i> de diferente agresividad: a) Débilmente agresivo. b) Altamente agresivo. c) Planta control.....	60
Figura 27. Número de alelos por locus en las seis poblaciones de <i>S. sclerotiorum</i> . Locus: 1: 7-2, 2: 9-2, 3: 12-2, 4: 13-2, 5: 106-4, 6: 114-4, 7: 8-3.....	77
Figura 28. Histograma de las frecuencias de 30 haplotipos SSR de <i>S. sclerotiorum</i> , sin corrección clonal.....	78
Figura 29. Histograma de las frecuencias de 30 haplotipos SSR de <i>S. sclerotiorum</i> , con corrección clonal.....	80
Figura 30. Árbol de UPGMA que muestra las relaciones genéticas entre los 109 aislados de <i>S. sclerotiorum</i> según los datos de los marcadores SSR (Distancia de Bruvo). A) Localidad: O, Orán (color celeste); C, Campichuelo (color amarillo); PI, Pichanal (color verde); PS, Palma Sola (color rosado); GB, Gral. Ballivián (color rojo); T, Tartagal (color azul). B) MCG. C) Agresividad: AA (altamente agresivo) y DA (débilmente agresivo). Los colores indican diferentes sitios de colecta.....	82
Figura 31. Análisis de coordenadas principales de 109 aislados de <i>S. sclerotiorum</i> del noroeste argentino usando datos de microsatélites.....	83
Figura 32. Red mínima de expansión basada en la medida de distancia genética de Bruvo para poblaciones de <i>S. sclerotiorum</i> muestreadas en seis localidades de las provincias de Salta y Jujuy, Argentina. Cada nodo es un genotipo multilocus (MLH) y se divide según la proporción de aislados dentro de ese MLH que pertenecen a cada localidad. El tamaño de los nodos es proporcional a la cantidad de aislados. Las diferentes localidades están indicadas por colores. El color de las líneas que conectan los nodos es indicativo de la distancia de Bruvo (calculada con 999 permutaciones) entre los nodos, como se muestra en la escala. El grosor de las líneas es inversamente proporcional a la distancia de Bruvo, pero no corresponde directamente al grosor mostrado en la barra de escala.....	83
Figura 33. Mapa de Calor (heatmap) que muestra los valores de F_{ST} calculados entre pares de poblaciones. O: Orán. C: Campichuelo. PI: Pichanal. PS: Palma Sola. GB: Gral. Ballivián. T: Tartagal.....	86
Figura 34. Valores de Delta K calculados por el método de Evanno (2005) basado en datos de microsatélites antes de la corrección de clones analizados con el software STRUCTURE.....	87

Figura 35. Gráfico de barras que muestra la asignación de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> , para un K = 2, basado en datos de microsatélites analizados con el software STRUCTURE. Cada barra representa un solo aislado, dividido en segmentos de colores, donde los colores representan la pertenencia a un determinado agrupamiento (Rojo: K1; Amarillo: K2).....	87
Figura 36. Valores de Delta K calculados por el método de Evanno (2005) basado en datos de microsatélites después de la corrección de clones.....	88
Figura 37. Gráfico de barras que muestra la asignación de los aislados de <i>S. sclerotiorum</i> , para un K = 2, basado en datos de microsatélites analizados con el software STRUCTURE. Cada barra representa un solo aislado, dividido en segmentos de colores, donde los colores representan la pertenencia a un determinado agrupamiento (Amarillo: K1; Verde: K2)....	88
Figura 38. Visualizaciones de las pruebas de desequilibrio de ligamiento, donde los valores observados (líneas discontinuas azules) de I_A y rd se comparan con histogramas que muestran los resultados de 999 permutaciones. (A) Orán sin corrección clonal. (B1) Campichuelo sin corrección clonal (B2) Campichuelo con corrección clonal.....	91
Figura 39. Visualizaciones de las pruebas de desequilibrio de ligamiento, donde los valores observados (líneas discontinuas azules) de I_A y rd se comparan con histogramas que muestran los resultados de 999 permutaciones. (C1) Pichanal sin corrección clonal. (C2) Pichanal con corrección clonal. (D1) Palma Sola sin corrección clonal. (D2) Palma Sola con corrección clonal.....	92
Figura 40. Visualizaciones de las pruebas de desequilibrio de ligamiento, donde los valores observados (líneas discontinuas azules) de I_A y rd se comparan con histogramas que muestran los resultados de 999 permutaciones. (E1) Gral. Ballivián sin corrección clonal. (E2) Gral. Ballivián con corrección clonal. (F1) Tartagal sin corrección clonal. (F2) Tartagal con corrección clonal.	93
Figura 41. Visualizaciones de las pruebas de desequilibrio de ligamiento, donde los valores observados (líneas discontinuas azules) de I_A y rd se comparan con histogramas que muestran los resultados de 999 permutaciones. (G1) Tartagal K1 sin corrección clonal. (G2) Tartagal K1 con corrección clonal. (H1) Tartagal K2 sin corrección clonal. (H2) Tartagal K2 con corrección clonal.	94
Figura 42. Mapa de calor (heatmap) de los valores del desequilibrio de ligamento (rd) de los siete loci de microsatélites de <i>S. sclerotiorum</i> , antes de la corrección de clones. Dentro de los cuadrados figura el valor de P para su correspondiente rd.....	96
Figura 43. Mapa de calor (heatmap) de los valores del desequilibrio de ligamento (rd) de los siete loci de microsatélites de <i>S. sclerotiorum</i> , después de la corrección de clones. Dentro de los cuadrados figura el valor P para su correspondiente rd.....	97

- Figura 44.** Número de aislados de *S. sclerotiorum* (N), grupos de compatibilidad micelial (MCG) y haplotipos de microsatélites (MLH) observados en cada población..... 98
- Figura 45.** Mapas de la distribución de los MCG (izquierda) y los haplotipos MLH (derecha) por localidad muestreada. PS: Palma Sola, O: Orán, PI: Pichanal, C: Campichuelo, GB: Gral Ballivián, T: Tartagal. Los MCGs, específicos de su sitio, se representan por escalas monocromáticas, mientras que los MLH, compartidos entre sitios (excepto Palma Sola), se representan por diferentes colores..... 99
- Figura 46.** Índice de severidad de la reacción media a cinco aislados de *S. sclerotiorum* de 10 líneas de poroto evaluadas durante 21 días post-inoculación. Control resistente: A 195 (rojo); Control susceptible: Leales 24 INTA (verde). Severidad: genotipos resistentes ($1 \leq IS \leq 4$), intermedios ($4 < IS < 7$) y susceptibles ($7 \leq IS \leq 9$)..... 116
- Figura 47.** Índice de severidad de la reacción media de 9 variedades comerciales de poroto a cinco aislados de *S. sclerotiorum* evaluadas durante 21 días post-inoculación. Control resistente: A 195 (rojo); control susceptible: Leales 24 INTA (verde). Severidad: genotipos resistentes ($1 \leq IS \leq 4$), intermedios ($4 < IS < 7$) y susceptibles ($7 \leq IS \leq 9$)..... 117
- Figura 48.** Escala de severidad de la reacción media de todos los genotipos de poroto a cinco aislados de *S. sclerotiorum* evaluadas durante 7, 14 y 21 días post-inoculación en condiciones controladas de temperatura y humedad. Control resistente: A 195; control susceptible: Leales 24 INTA. Severidad: genotipos resistentes ($1 \leq IS \leq 4$), intermedios ($4 < IS < 7$) y susceptibles ($7 \leq IS \leq 9$)..... 119
- Figura 49.** Índice de severidad de los cinco aislados de *S. sclerotiorum* a los 7, 14 y 21 DPI (LSD Fisher; $\alpha=0,05$)..... 123

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABCPE	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad
ACoP	Análisis de Coordenadas Principales
ADNr	ADN ribosómico
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
AMOVA	Análisis de la varianza molecular
APG	Agar papa glucosado
BGMV	Bean Golden mosaic virus;
CCC	Correlación cofenética
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
DL	Desequilibrio de ligamiento
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DPI	Días post-inoculación
EDTA	Etilen-diamino-tetra-acetato
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
EL	Equilibrio de Ligamiento
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ITS	Espaciador transcripto interno
MCG	Grupo de compatibilidad micelial
MLH	Haplótipo multilocus
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NOA	Noroeste Argentino
OTUs	Unidades Taxonómicas Operativas
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Polimorfismo de ADNs amplificados al azar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
SSR	Secuencias simples repetidas
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
UPGMA	Método de promedio aritmético de pares no ponderados
URP	Universal Rice Primer

RESUMEN

El poroto común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa alimenticia más importante para el consumo humano a nivel mundial. La esclerotinia, causada por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, es una enfermedad devastadora que afecta al cultivo de poroto en todo el mundo. En Argentina, se ha detectado esta enfermedad en todas las áreas de producción de poroto, principalmente al norte de la provincia de Salta, produciendo pérdidas de rendimiento y calidad de hasta el 100% en variedades de poroto susceptibles y en condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue caracterizar la variabilidad fenotípica y genotípica de aislados de *S. sclerotiorum* provenientes de lotes comerciales de poroto ubicados en la principal área de producción de Argentina, empleando caracteres morfológicos, marcadores moleculares, y ensayos de patogenicidad para aportar conocimiento a los programas de mejoramiento. Se elevaron seis lotes comerciales de poroto y se recolectaron 116 aislados de *S. sclerotiorum*. Los aislados mostraron una alta variabilidad fenotípica, genética y patogénica. Se detectaron altos niveles de diversidad genotípica mediante grupos de compatibilidad micelial (MCG), marcadores moleculares URP (*Universal Rice Primers*) y microsatélites (SSR). Se identificaron 52 MCG, 59 haplotipos URP y 30 haplotipos MLH (*Multilocus Haplotype*). Todos los MCG fueron específicos de cada sitio, mientras que los haplotipos URP y MLH se compartieron entre lotes. Las distancias genéticas calculadas en base a los datos moleculares (URP y SSR) no se correlacionaron con las distancias geográficas. Más aún, el estudio con marcadores SSR no mostró diferenciación poblacional significativa en la muestra analizada, lo que se corroboró en los análisis de coordenadas principales y de agrupamientos. En concordancia, los resultados del análisis molecular de la varianza (AMOVA) y los valores de *Fst* de pares, sugirieron la existencia de un moderado a alto flujo génico entre las localidades. El estudio con microsatélites permitió inferir el comportamiento reproductivo de *S. sclerotiorum* a través del análisis del desequilibrio de ligamiento entre loci. Los resultados obtenidos revelaron un alto nivel de variabilidad entre los aislados y la ocurrencia de ambos tipos de reproducción, clonal y sexual, pero con predominancia de la recombinación sexual en la mayoría de las poblaciones analizadas. La falta de diferenciación y la existencia de flujo génico estarían influenciados por la dispersión de inóculo fúngico, en forma de esclerocios o semillas colonizadas con micelio, de un campo a otro, al transportar restos de la cosecha y suelo contaminado mediante la maquinaria agrícola. También, las ascosporas transportadas por el aire, que constituyen una fuente común de infección dentro de los campos, podrían ser un mecanismo para la dispersión de haplotipos entre las poblaciones a larga distancia. Las poblaciones con niveles altos de diversidad genética y reproducción sexual proporcionan un amplio espectro de genotipos

que pueden contribuir a una evolución rápida del patógeno aumentando la probabilidad de que el patógeno supere la resistencia de la planta hospedante y/o se seleccionen individuos con genes de resistencia a los fungicidas ampliamente utilizados, lo que implicaría un gran desafío en el manejo de la esclerotinia del poroto. Por otro lado, en invernadero, se evaluó la agresividad de los aislados mediante *Straw test* empleando la variedad Leales 24 INTA y la mayoría de los aislados resultaron altamente agresivos, sin variación entre las localidades. También, se evaluó la resistencia fisiológica de 20 genotipos de poroto contra cinco aislados genéticamente distintos con múltiples inoculaciones a corto, mediano y largo plazo y se determinó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE). Se observaron diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) entre los aislados, genotipos e interacción genotipo x aislado en las tres fechas de evaluación. A corto plazo y mediano plazo se encontraron genotipos resistentes, intermedios y susceptibles. Sin embargo, el único genotipo que resultó resistente a largo plazo a los cinco aislados fue la línea A 195. Esta línea, por sus características agronómicas y sanitarias, sería un candidato prometedor para ser utilizado para el mejoramiento de las líneas y variedades de poroto de Argentina. El presente estudio proporciona, por primera vez, información sobre la diversidad, estructura poblacional, comportamiento reproductivo de *S. sclerotiorum* e información sobre la resistencia fisiológica de genotipos de poroto. Estos resultados son valiosos para los programas regionales de mejoramiento genético de poroto destinados a obtener variedades ampliamente adaptadas con resistencia duradera, lo que contribuye al desarrollo de estrategias de manejo sostenible para minimizar las pérdidas de rendimiento debido a la esclerotinia en la producción de poroto.

ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most important food legume for human bean consumption worldwide. White mould, caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, is one of the most threatening fungal diseases occurring across major bean production regions around the world. In Argentina, this disease has been detected in all areas of bean production, mainly north of the province of Salta, producing yield and quality losses up to 100% on susceptible common bean cultivars and favourable weather conditions for the development of the disease. The aim of this study was to characterize the phenotypic and genotypic variability of *S. sclerotiorum* isolates from six dry bean fields in the main production area of Argentina by means of molecular, morphological and pathogenic approaches to contribute to breeding programs. A total of 116 isolates of *S. sclerotiorum* were collected in six dry bean fields. A high genotypic, phenotypic and pathogenic variability was observed among the isolates using mycelial compatibility groups (MCG), URP molecular markers (*Universal Rice Primers*) and microsatellites (SSR). A total of 52 MCG, 59 URP and 30 multilocus haplotypes (MLH) were found. All the MCG were location specific, while URP and MLH haplotypes were shared among locations. Based on molecular data (URP and SSR), genetic distances were not correlated with geographical distances. Moreover, significant population differentiation was not observed using SSR markers, which was corroborated in the analysis of principal coordinates and UPGMA clustering. In agreement, the results of the analysis of molecular variance (AMOVA) and pairwise *Fst* values suggested the existence of a moderate to high gene flow between some locations. Microsatellites markers allowed to inferred the reproductive behaviour of *S. sclerotiorum* through the linkage disequilibrium analysis between loci. The results generated in this study suggested high levels of variability between isolates and the occurrence of both types of reproduction, clonal and sexual, but with predominance of sexual recombination in most of the analysed populations. The lack of differentiation and the existence of gene flow may occur through spreading fungal inoculum in the form of sclerotia or seeds colonized with mycelium, from one field to another, by transporting crop residues and contaminated soil in agricultural machinery. In addition, airborne ascospores, which constitute a common source of infection within fields, might be a mechanism for long-distance dispersal of haplotypes among populations.

Populations with high levels of genetic diversity and sexual reproduction provide a broad spectrum of genotypes that tend to evolve faster increasing the probability of the pathogen to overcome the resistance of the host plant and to select individuals with resistance to widely used fungicides, which implies a great challenge in the management of White Mould. On the other hand, the aggressiveness of the isolates towards Leales 24 INTA bean seedlings was assessed using the modified straw test in the greenhouse. Most of the isolates were

highly aggressive, while no variation among locations was observed. The physiological resistance of 20 common bean genotypes was screened against five genetically distinct isolates of *S. sclerotiorum* with multiple inoculations at short, medium and long-term evaluations, and the area under disease progress curve (AUDPC) was determined. Highly significant differences ($P < 0.001$) were observed between isolates, genotypes and genotype x isolate interaction at the three evaluations dates. In the short- and medium-term evaluations, resistant, intermediate and susceptible genotypes were found. However, line A 195 was the only white mould resistant genotype in the long-term evaluation. This line, due to its agronomic and sanitary characteristics, would be a promising candidate to be used by breeders to improve the lines and varieties of common bean in Argentina. The present study provides, for the first time, information on the diversity, population structure, reproductive behaviour of *S. sclerotiorum* and information of the physiological resistance of common bean genotypes. This work represents a valuable contribution to regional breeding programmes aimed to obtain cultivars with durable resistance, which contributes to the development of sustainable management strategies in bean production aimed to minimize yield losses due to white mould.

Publicaciones derivadas de la presente Tesis

Publicaciones en congresos

Abán C, Taboada G, Spedaletti Y, Aparicio M, Casalderrey NB, Chocobar MO, Curti RN, Galván M. Patogenicidad de aislamientos de *Sclerotinia sclerotiorum* asociados a moho blanco en poroto. Actas XLVI Congreso Argentino de Genética, p. 71. San Fernando del valle de Catamarca, Catamarca, Argentina. 1-4 octubre 2017.

Abán C, Taboada G, Spedaletti Y, Aparicio M, Casalderrey NB, Chocobar MO, Curti RN, Galván M. Variabilidad genotípica de aislamientos de *Sclerotinia sclerotiorum* en lotes de cultivo de poroto en Salta y Jujuy. Actas XLVI Congreso Argentino de Genética, p. 71. San Fernando del valle de Catamarca, Catamarca, Argentina. 1-4 octubre 2017.

Publicaciones en revistas científicas

Abán, C. L., Taboada, G., Spedaletti, Y., Aparicio, M., Curti, R., Casalderrey, N., Maggio, M., Chocobar, M., Salgado, M., & Galván, Z. (2018). Molecular, morphological and pathogenic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from common bean (*Phaseolus vulgaris*) fields in Argentina. *Plant Pathology*, 67, 1740-1748.

Abán, C. L., Taboada, Casalderrey, N., Maggio, G., M., Chocobar, M., Spedaletti, Y., Aparicio, M., Vizgarra, O. & Galván, Z. (2018). Screening common bean germplasm for resistance to genetically diverse *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Argentina. *Acta Scientiarum Agronomy*, en prensa.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN

1.1 El poroto común (*Phaseolus vulgaris*)

El poroto común (*Phaseolus vulgaris* L.), es una leguminosa anual herbácea perteneciente a la familia Leguminosae, subfamilia Papilioideae, tribu Phaseoleae, subtribu Phaseolinae. Es una especie diploide ($2n=2x=22$) y autógama con tallos y hojas pubescentes, amplias, de 7 a 12 cm de longitud, trifolioladas, membranosas, con folíolos ovado-acuminados, laterales asimétricos y el terminal distante. Las flores se presentan en racimos usualmente axilares, generalmente con pocas flores, que son papilionáceas con 10 estambres. La corola puede ser violácea, lila o blanca, con estandarte centimétrico suborbicular y reflejo, las alas obovadas adheridas a la quilla, también centimétrica y con ápice espiralmente retorcido. La fecundación es generalmente de tipo autógama. El fruto es una legumbre péndula acuminada, cilíndrica o comprimida, delgada en la base, de forma y color diferente según las variedades (Burkart, 1943) y contiene un número variable de semillas que presentan grandes variaciones en la forma, el color de la testa y en la distribución de manchas y rayas (Singh *et al.*, 1992; Voysest, 2000). El poroto común es una especie muy polimórfica desde el punto de vista morfológico habiéndose descrito numerosas variedades con particulares fenotipos de semilla, vaina, flor o hábito de crecimiento (Voysest, 2000; Pérez-Vega *et al.*, 2009).

Las variedades de poroto se pueden clasificar de acuerdo a diferentes criterios, como ser las características del grano, duración entre el periodo de siembra y cosecha, reacción a la duración del día, por su origen y hábitos de crecimiento (Voysest, 2000).

De acuerdo a las características del grano se consideran tres criterios: tamaño, forma y color. El tamaño se determina por el peso de 100 granos y se clasifican en pequeños (hasta 25 g/100 semillas), medianos (entre 25 y 40 g /100 semilla) y grandes (desde 40 g/100 semillas). La forma puede ser elíptica, cilíndrica, arriñonada (Kidney), romboidea, oval o redonda. Según el color pueden ser blancos, negros, rojos, rosados, cremas, amarillos, pardos y morados. Además, puede presentar manchas, rayas, vetas, moteado, etc.

Los días desde la germinación a la madurez pueden variar de 70 a 200 (Singh *et al.*, 1992).

El poroto común, según el acervo génico del cual proviene, puede clasificarse en mesoamericano o andino. Estos acervos fueron divididos en 6 razas. El acervo andino se constituye por las razas Nueva Granada, Chile y Perú y el mesoamericano está integrado por las razas Jalisco, Durango y Mesoamérica (Singh *et al.*, 1991).

El hábito de crecimiento es una de las características más importantes para clasificar las variedades desde el punto de vista agronómico. Los parámetros utilizados para

caracterizar e identificar el hábito de crecimiento son: el tipo de crecimiento de la yema terminal (determinado o indeterminado), el número y la longitud de los entrenudos, la altura de la planta y el grado y tipo de ramificación. Existen cuatro tipos de hábitos de crecimiento: tipo I o determinado arbustivo; tipo II o indeterminado arbustivo (IIa: sin aptitud para trepar; IIb con aptitud para trepar); tipo III o indeterminado postrado (IIIa semitrepador; IIIb trepador); tipo IV o indeterminado trepador (Figura 1).

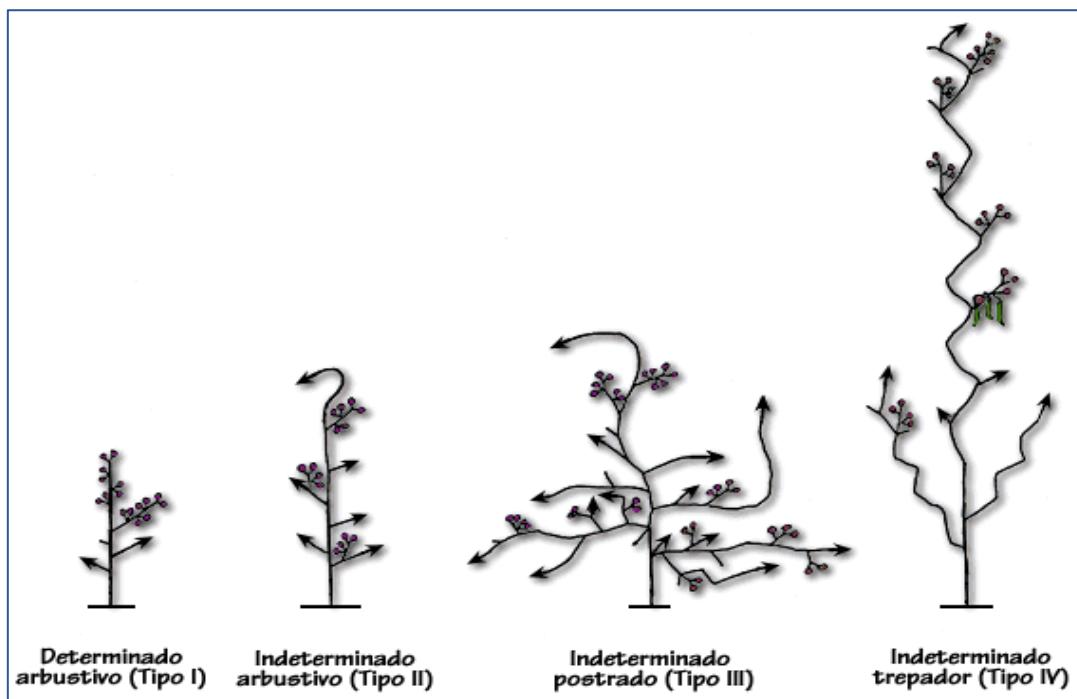


Figura 1. Esquema de los hábitos de crecimiento del poroto común (Debouck & Hidalgo, 1985).

1.1.1 Etapas de desarrollo de la planta de poroto

El ciclo de vida del poroto comprende dos fases sucesivas: la fase vegetativa y la fase reproductiva. Según el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), el transcurso de estas fases se desarrollan en diez etapas bien diferenciadas (Figura 2). La duración de las fases depende del hábito de crecimiento, el clima, el suelo y el genotipo.

La fase vegetativa se inicia en el momento en que la semilla dispone de condiciones favorables para germinar y termina cuando aparecen los primeros botones florales.

- **V0 (Germinación):** La germinación de la semilla comienza con la absorción de agua, esta se hincha y hace emerger la raíz primaria (radícula) para luego dar paso a las raíces secundarias. El hipocótilo formado se elonga para dar lugar a la siguiente etapa.
- **V1 (Emergencia):** Los cotiledones aparecen a nivel del suelo y el hipocótilo se endereza para continuar su elongación.

- **V2 (Hojas primarias):** Las hojas primarias se despliegan en el 50 % de las plantas, son simples unifoliadas y opuestas. La yema principal del tallo se puede distinguir entre las dos hojas primarias.
- **V3 (Primer trifoliada):** Se despliega la primera hoja trifoliada. La primera rama general se forma a partir de la yema de la primera hoja trifoliada.
- **V4 (Tercer trifoliada):** Se despliega la tercera hoja trifoliada. Las yemas de los nudos que están por debajo de la tercera hoja trifoliada se desarrollan como ramas. Esta es la etapa más larga del ciclo por lo que se divide en sub-etapas, las cuales corresponden al momento en que se completa el despliegue de la cuarta hoja trifoliada (V4.4), quinta hoja trifoliada (V4.5), sexta hoja trifoliada (V4.6), etc., sobre el tallo principal del 50% de las plantas del cultivo.

La fase reproductiva se inicia con la aparición de los primeros botones o racimos florales y termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la cosecha; a pesar de ser esta fase eminentemente reproductiva, durante ella las variedades indeterminadas (Tipos I, II y IV) continúan produciendo estructuras vegetativas.

- **R5 (Pre-floración):** Se inicia cuando en el 50% de las plantas aparecen los primeros botones florales o los primeros racimos según sea el hábito de crecimiento.
- **R6 (Floración):** Esta etapa se da por iniciada con la apertura de la primera flor. La primera flor abierta corresponde al primer botón formado.
- **R7 (Formación de vainas):** Con la fecundación de la flor, la corola se marchita y la vaina empieza a crecer. El inicio de esta etapa se considera cuando aparece la primera vaina dándose por finalizada cuando las vainas han alcanzado su máxima longitud en el 50% de las plantas del cultivo.
- **R8 (Llenado de vainas):** Comienza cuando en el 50% de las plantas del cultivo, la primera vaina detiene su crecimiento y empieza a llenarse debido al crecimiento de las semillas.
- **R9 (Maduración):** Se inicia cuando la primera vaina cambia su color verde por amarillo o pigmentado. Las hojas, en orden ascendente, se tornan amarillas y se caen. La planta en general y en particular, las semillas se secan, tomando su color final y la planta está lista para cosecharse.

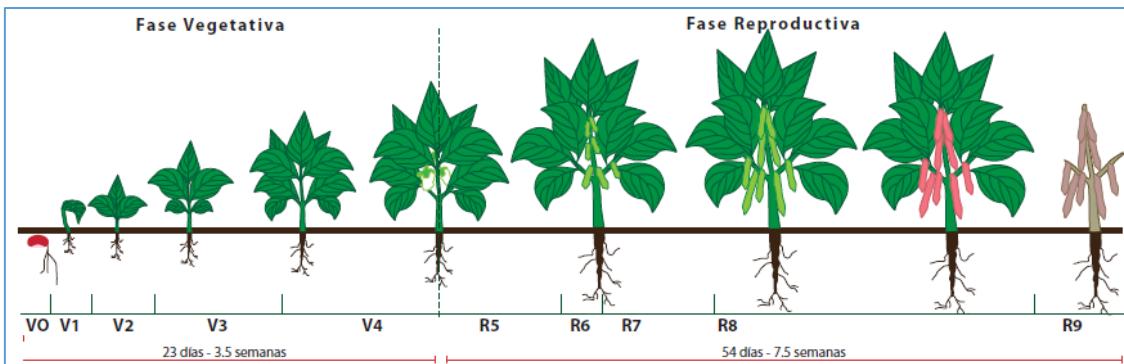


Figura 2. Etapas de desarrollo del cultivo de poroto (IICA, 2008).

1.1.2 Importancia nutricional del poroto común

El poroto común forma parte de la dieta de la población de varios países latinoamericanos. El valor nutricional que tiene el poroto es destacable, fundamentalmente debido a su alto contenido de proteínas y en menor medida de carbohidratos. Además, posee vitaminas (A, B2, B3, B6, B9), minerales (calcio, magnesio, fosforo, potasio, sodio, zinc) y fibras, convirtiéndolo en un alimento de preferencia (Romero-Arenas *et al.*, 2013; Suarez Martinez *et al.*, 2016). Los porotos son ideales para controlar la diabetes debido a que sus carbohidratos complejos se absorben más lentamente que los simples (azúcar, dulces, mieles), por lo tanto, ayudan a prevenir aumentos abruptos en los niveles de azúcar en sangre. Tienen alto contenido de tiamina, riboflavina y niacina que son necesarias para la producción de energía, y de ácido fólico, el cual es primordial para la formación y maduración de las células, siendo fundamental en el embarazo, para prevenir defectos del tubo neural (Mazzi Gonzales de Prada, 2013). Otra característica importante es la cantidad de fibra por gramo de poroto, donde 100 gramos de porotos contienen aproximadamente 17 gramos de fibra. Las fibras ayudan a reducir los niveles de colesterol en sangre, disminuyendo el riesgo de enfermedades crónicas, tales como obesidad, diabetes y cáncer (Sgarbieri & Whitaker, 1982; Geil & Anderson, 1994; Marín-Martinez *et al.*, 2009). El uso de esta planta como terapia alternativa aumenta en gran medida su importancia para el consumo por su valor nutricional y por ser una fuente con valor terapéutico (Romero-Arenas *et al.*, 2013).

En Argentina, la carne vacuna es una de las principales fuentes de proteínas, pero con elevados niveles de grasas saturadas que son perjudiciales para la salud si se consumen con alta frecuencia. La incorporación de porotos y otras legumbres en la alimentación diaria sería una buena alternativa para mejorar la calidad de vida por sus numerosas propiedades nutricionales. Sin embargo, la población argentina no tiene el hábito de incluirlo en su

alimentación. Se consume muy poco y principalmente durante los meses de invierno, ya que se utilizan en preparaciones de platos calientes.

1.1.3 La producción mundial y nacional de poroto

1.1.3.1 Mercado global

De acuerdo con la FAO (*Food and Agricultural Organization*), el poroto común es la leguminosa alimenticia más importante en el consumo humano a nivel mundial. La producción mundial de porotos secos se encuentra diversificada entre los continentes (Figura 3), alcanzando un total de 26,8 millones de toneladas en el año 2016 (FAO, 2018). En un análisis por continente, el 43% de los porotos se producen en Asia, el 30% en América y el 24% en África. Oceanía y Europa tienen una participación menor. La producción de los países africanos ha tenido un incremento considerable, del 16 al 24%, en los últimos 20 años.

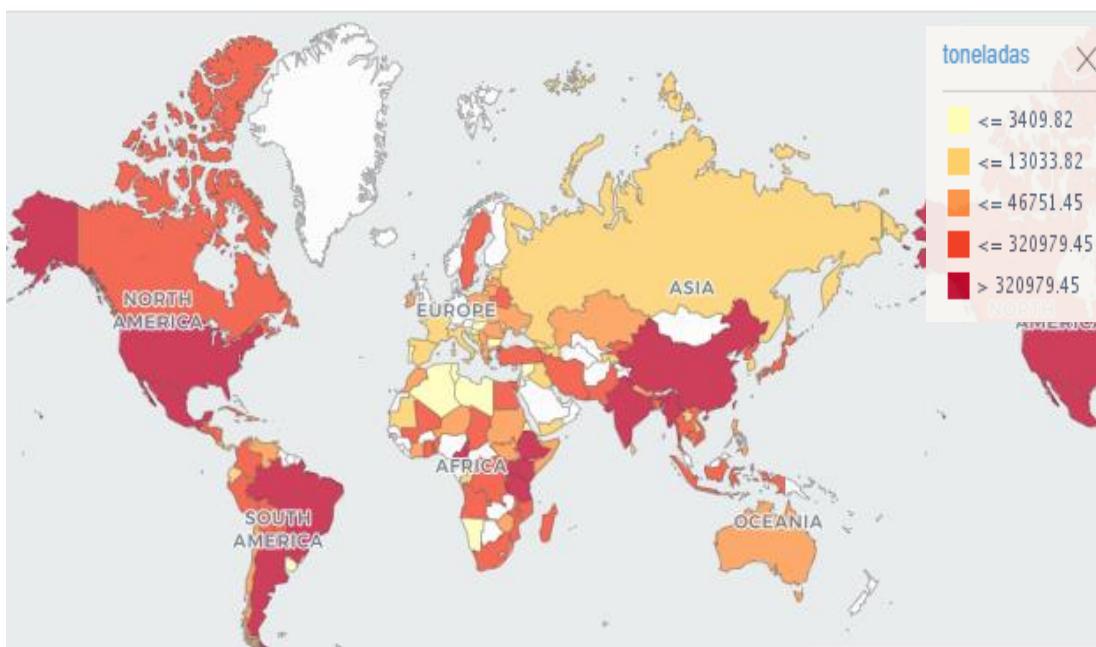


Figura 3. Promedio de la producción de poroto de los países productores en el mundo, período 2006-2016 (FAO, 2018).

El 52,5% de la producción mundial de poroto está concentrada en 5 países. Myanmar es el principal productor y consumidor de legumbres, participa con el 19,3% (5,2 millones de toneladas) de la producción mundial. Le siguen India y Brasil, los cuales producen el 14,5% (3,8 millones de toneladas) y 9,7% (2,6 millones de toneladas) de la producción mundial, respectivamente. Estados Unidos ocupa el cuarto lugar en el ranking, con el 4,7%

(1,3 millones de toneladas) y China se posiciona en el quinto lugar con el 4,20% (1,1 millones de toneladas) (FAO, 2018). Argentina se ubica en la posición doceava, participando con el 1,37% (367.000 toneladas) de la producción mundial (Figura 4).

En los últimos 20 años, Myanmar se encuentra en proceso de expansión con una tasa media anual de crecimiento del 10%. De manera similar, Estados Unidos y México han crecido un 0,8% y 0,4% anual, respectivamente. En contraste, la producción de China ha descendido a un ritmo del 0,2% anual, por la competencia que existe con otros cultivos. Con respecto a Uganda, Kenia y Etiopía su producción se ha expandido con una tasa de crecimiento del 14% anual (Figura 4).

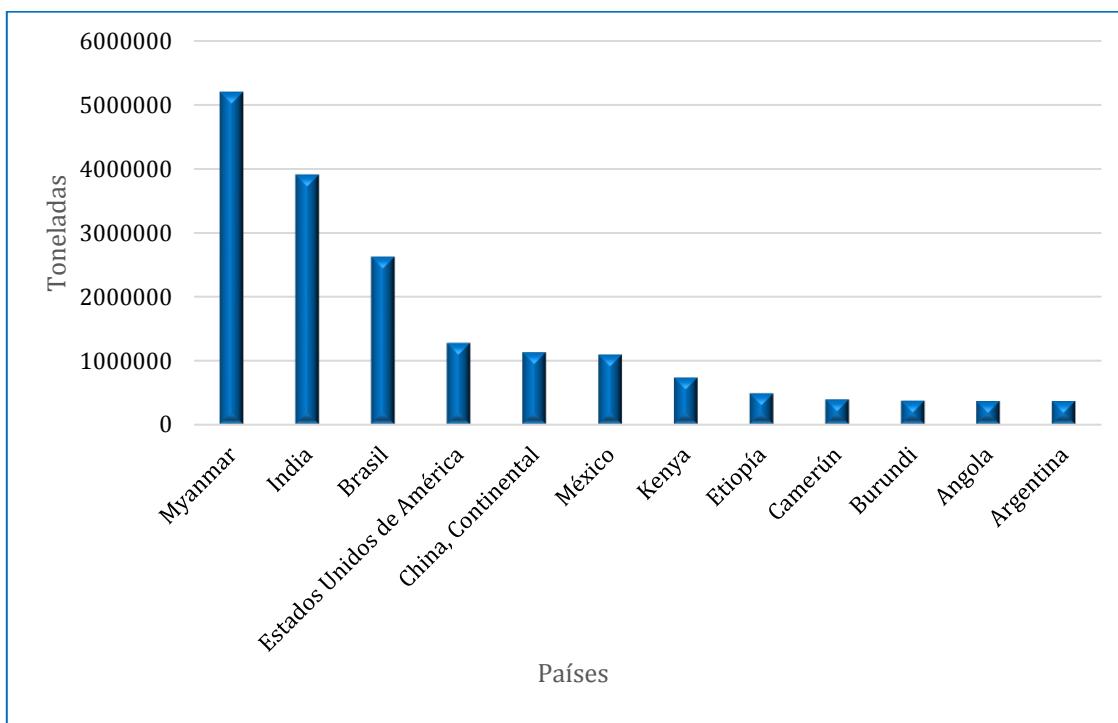


Figura 4. Producción mundial de porotos año 2016 (FAO, 2018). Elaboración propia con base en FAOSTAT.

Los países líderes de producción son también aquellos que tienen los mercados de consumo más importantes. En efecto, según la FAO, India consume aproximadamente 4,2 millones de toneladas de poroto al año; Brasil, 3,2 millones de toneladas; Myanmar, 2,0 millones; Estados Unidos, 0,9 millones y en Tanzania, 0,6 millones. Los países que más porotos consumen por habitante por año son Myanmar (37 kg), Ruanda (28 kg) y Nicaragua (20 kg). Los países africanos con mayor consumo (entre 8 y 12 kg/hab/año) se encuentran Tanzania, Camerún, Kenia y Angola. Con respecto a los países europeos los de mayor

consumo en un rango de 1 a 3 kg/hab/año se encuentran Grecia, Italia, Portugal y España. De los países asiáticos sobresalen Corea del Norte e India con 11,3 y 3 kg/hab/año, respectivamente. Por el contrario, China tiene un consumo de sólo 0,1 kg por habitante por año. Con respecto a los países de América Latina, los de mayor consumo por habitante por año son; El Salvador (15,8 kg), Brasil (15,6 kg) y Cuba (15,5 kg). En general, los grandes consumidores son países de bajo nivel de ingreso, donde los porotos, junto con otras legumbres, constituyen la base proteica diaria de la población.

En Argentina, el consumo interno de legumbres es marginal respecto a los niveles de consumo mundial. Se estima que no superaría los 200 g/hab/año. Por este motivo, aproximadamente el 97% de la producción de poroto seco se destina a exportación. A nivel mundial, Argentina se encuentra entre los cinco principales países exportadores de porotos secos. Los principales competidores son Myanmar, China, EE.UU. y Canadá (Figura 5). Entre los principales destinos de las exportaciones se encuentra Brasil (23,6%), seguido por Venezuela (13,9%), Argelia (9,7%), España (10,7%) e Italia (9,3%) (MHyFP, 2016).

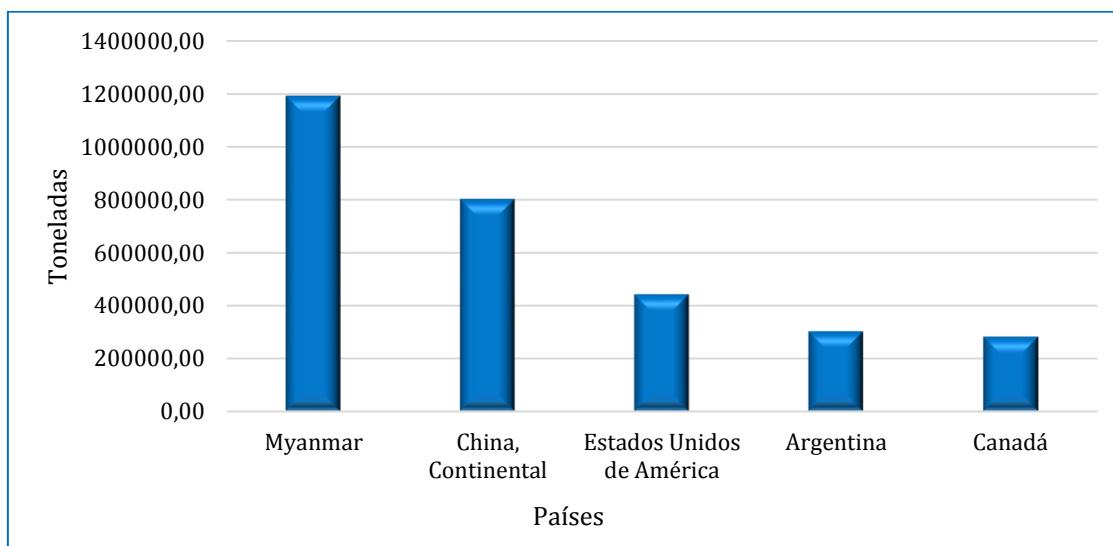


Figura 5. Ranking de los principales países exportadores de poroto, año 2016 (FAO, 2018).

En la actualidad el cultivo de poroto se encuentra expandido al noroeste argentino desde el límite con Bolivia hasta el norte de la provincia de Córdoba (Figura 6). La producción se concentra en la región del noroeste argentino (NOA), principalmente en la provincia de Salta (66,7%) y, en menor medida, en Santiago del Estero (23,1%), Jujuy (5,4%) y Tucumán (4,5%). El 0,6% restante se distribuye entre Catamarca y Córdoba.

En la campaña 2016/2017, la superficie total sembrada alcanzó las 423.833 hectáreas. La provincia de Salta concentra el 75,8% de la superficie sembrada con poroto, con 333.100 hectáreas (estimaciones agrícolas), de las cuales el 85% se concentra en los departamentos de Orán y San Martín, en el norte de la provincia (Paoli *et al.*, 2017). Le siguen en importancia, Santiago del Estero con el 10,4% (44.100 hectáreas), Jujuy con el 6,9% (29.283 hectáreas) y Tucumán que participa con el 3,6% (15.350 hectáreas). Con menor relevancia se encuentra Catamarca, que participa con el 0,4% del total nacional (1.800 hectáreas) y Córdoba donde se sembraron 200 hectáreas.

El área de siembra de poroto en la provincia de Salta se ha mantenido relativamente estable en los últimos 20 años, entre 260.000 y 380.000 ha, con excepción de la campaña 2014/2015 en la que se registró el pico máximo con 438.140 hectáreas sembradas.

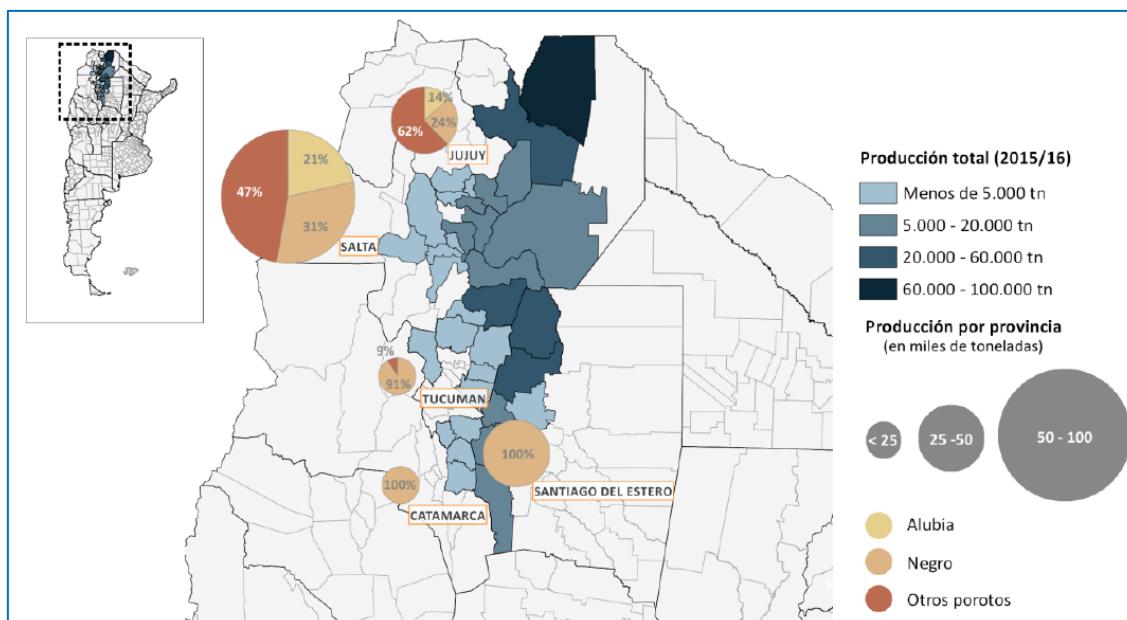


Figura 6. Distribución por provincia de la producción de porotos Alubia, Negros y otros (MHyFP, 2016).

En Argentina, la producción total de porotos creció un 8,4% entre 2010 y 2016, a una tasa anual acumulada del 2,3%. Sin embargo, presenta alta variabilidad anual, fundamentalmente por la influencia de las condiciones climáticas. La campaña 2012/2013 se vio seriamente afectada por la crisis hídrica de las principales provincias productoras, por lo que la producción registró el valor más bajo de la serie (Figura 7). El estrés hídrico provocó que no se alcancen los niveles esperados, siendo el rendimiento promedio de 665 kg/ha y con un nivel de calibre menor, pasando de mediano a chico. A esta realidad productiva, se le sumaron enfermedades fúngicas, como la Mancha Angular y Mustia

Hilachosa, que se vieron altamente favorecidas por períodos alternos de altas y bajas temperaturas, y alta y baja humedad relativa. La situación climática comprometió el contexto económico en la totalidad de los productores dedicados a este cultivo. La producción registró una caída de 73%, al haber pasado de 361.153 toneladas en 2012 a 96.109 toneladas en 2013 (FAO, 2018).

En la siguiente campaña 2014/2015, la situación de sequía fue superada y se pudo volver a la senda de crecimiento registrada hasta 2012. Durante 2014 se obtuvo una cosecha récord al alcanzar las 430 mil toneladas, 347% superior a 2013 y 19% más que en 2012.

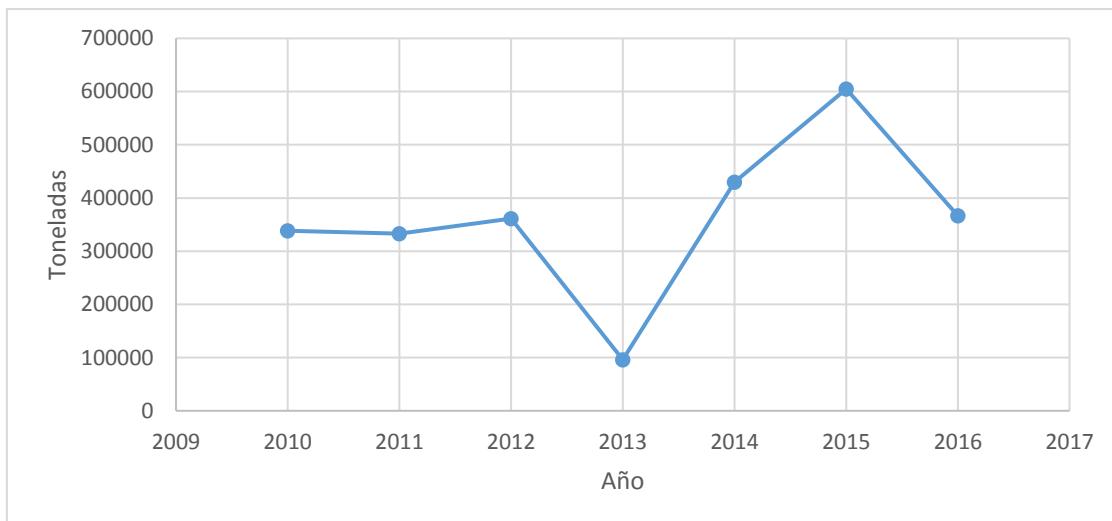


Figura 7. Producción de porotos en Argentina durante los años 2010-2016 (FAO, 2018).

Argentina es fundamentalmente productor de porotos blancos y porotos negros. El 80% se reparte en partes iguales entre poroto “Alubia” (blanco de alta calidad y valor destinado a países europeos del Mediterráneo) y poroto “Negro” (destinado principalmente a países latinoamericanos y africanos). El 20% restante corresponde a porotos de color Cranberry y colorados destinados a países europeos y Estados Unidos (MHyFP, 2016). En la campaña 2015/2016, de la superficie total sembrada, el 41,6% correspondió a poroto negro, el 40,6% a poroto alubia y el resto a otros porotos (Figura 8).

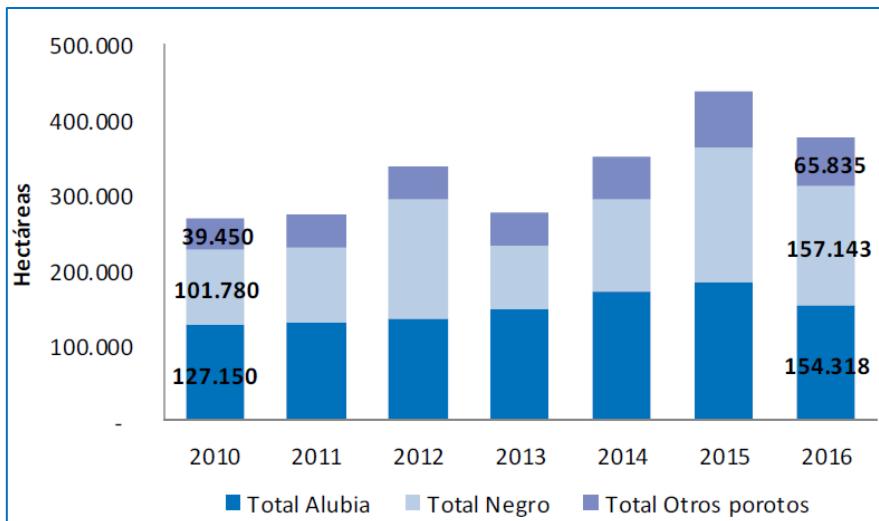


Figura 8. Superficie sembrada con poroto en Argentina por variedad durante el período 2010-2016 (MHyFP, 2016).

Las condiciones favorables para la producción de poroto se encuentran al norte del país (Salta, Jujuy, Santiago del Estero, Tucumán, Norte de Córdoba). En Salta, Tucumán y zonas de influencia (Valles templados, Umbral de Chaco y sur de Salta, oeste de Santiago del Estero y sudeste de Catamarca) la siembra de poroto se concentra a partir de la segunda quincena de febrero, ya que antes de ese momento el suelo no tiene humedad suficiente para efectuar la siembra. Es importante mencionar que para ésta zona, la época de siembra es considerada tardía para el cultivo, porque el período de llenado de grano se acerca a las fechas probables de ocurrencia de heladas tempranas (Mamaní González *et al.*, 2015).

1.1.4 Requerimientos culturales del cultivo de poroto

El cultivo de poroto requiere suelos bien drenados, permeabilidad moderada, con buen contenido de materia orgánica, ausente de salinidad y de alcalinidad. En Argentina, la producción se realiza en suelos de desmonte en áreas llanas de las provincias antes mencionadas. El cultivo de poroto es muy sensible a factores climáticos como la humedad del suelo, las temperaturas y los vientos. Las épocas de lluvia se aprovechan para el desarrollo del cultivo y la sequía en la época de cosecha. El requerimiento óptimo de agua durante el cultivo oscila entre 350 a 400 mm, distribuidos uniformemente (García Medina, 2004). La deficiencia hídrica es perjudicial principalmente en las fases de germinación, floración y llenado de grano. El exceso de agua también es perjudicial, ya que ocasiona graves daños en la producción principalmente por enfermedades fúngicas. El poroto es una especie termófila, con un rango de temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 35°C (Volante *et al.*, 2004). Con respecto a los requerimientos lumínicos, el cultivo es indiferente al fotoperiodo, aunque responde a días cortos y por lo cual los días largos causan demoras

en la floración y en la madurez. El desarrollo vegetativo normal no tolera vientos fríos ni heladas.

El cultivo de poroto es susceptible al ataque de plagas, enfermedades y malezas lo que provoca oscilaciones en los rendimientos anuales. Además, el gran incremento en las áreas de cultivo de soja ha desplazado al poroto al este de la provincia de Salta hacia zonas menos favorables surgiendo nuevas limitantes bióticas y abióticas.

1.1.5 Problemática fitosanitaria del cultivo de poroto

Entre los diversos problemas fitosanitarios que afectan la producción de poroto en Argentina se encuentran las enfermedades (Casalderrey, 2013). Las enfermedades en las plantas se definen como la serie de respuestas invisibles y visibles de las células y tejidos vegetales a un organismo patógeno o factor ambiental, que da lugar a cambios adversos en la forma, función o integridad de la planta, lo que puede conducir al deterioro y/o muerte parcial o total de la planta. En los cultivos, para que se produzca la enfermedad deben coincidir por un determinado tiempo, un hospedante susceptible, un patógeno virulento y condiciones ambientales favorables. Además, el hombre también participa actuando como modificador del ambiente a través de sus prácticas agrícolas (Figura 9).

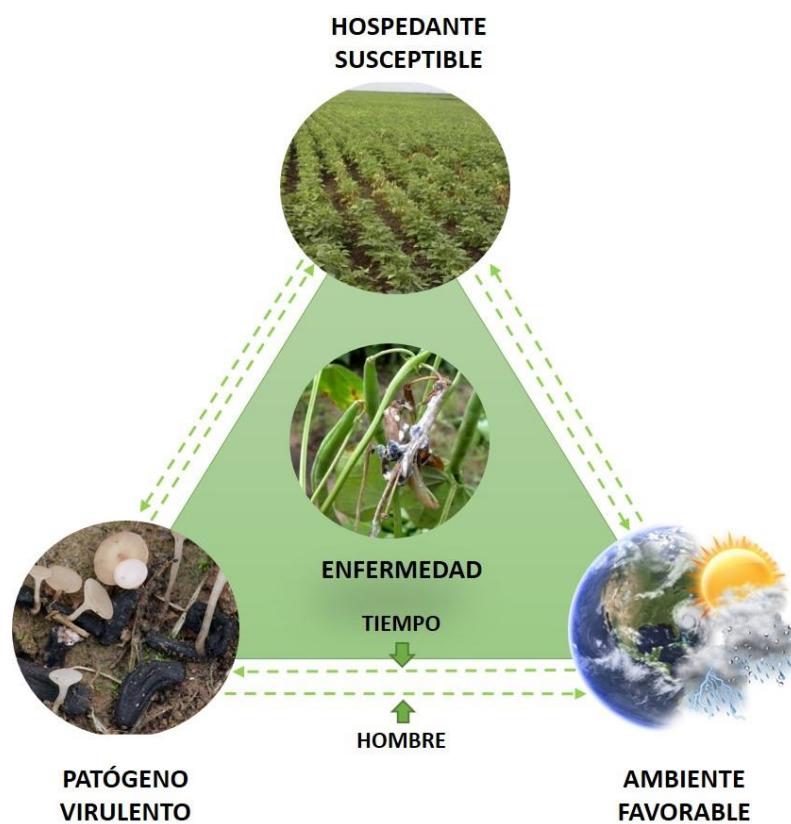


Figura 9. Triángulo de la enfermedad.

El cultivo de poroto presenta a lo largo de su ciclo de vida diferentes problemas sanitarios causados por hongos, bacterias y virus. Pero también existen problemas de origen abiótico (o no infeccioso), generados por algún factor del ambiente como heladas tempranas o tardías, exceso o déficit del agua en el suelo, contaminación del aire o agua, déficit o exceso de fertilizantes, toxicidad de productos agroquímicos y prácticas agronómicas inadecuadas. La distribución geográfica de cada enfermedad es variable, estando relacionada con las condiciones ambientales prevalentes en cada zona donde se lo cultiva. Las enfermedades causan perdidas económicas por disminución de la cantidad y calidad de los productos, y por los incrementos en los costos de producción por la necesidad de utilizar productos agroquímicos o semillas más costosas por su resistencia a agentes patógenos (Vizgarra *et al.*, 2016).

Entre las enfermedades causadas por bacterias se puede mencionar la causada por el complejo compuesto por los agentes: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye (Andersen, 1985; Vauterin *et al.*, 1995) y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, donde las enfermedades responden individualmente a los nombres Bacteriosis común y Halo bacteriano, respectivamente (De Simone & Failde, 2002). La enfermedad de etiología viral más importante para este cultivo es la llamada Mosaico dorado del poroto (*Bean Golden mosaic virus*; BGMV), su epidemia abarca las áreas productoras de Brasil y grandes zonas de Argentina.

Entre las enfermedades fúngicas de mayor impacto en el NOA, se encuentra la esclerotinia o moho blanco del poroto (agente etiológico *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), que ocasiona daños anuales superiores al 80% en condiciones climáticas favorables para la enfermedad. Las enfermedades fúngicas que le siguen en importancia son la mancha angular (agente etiológico *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun), la mustia hilachosa y podredumbre radicular (agente etiológico *Rhizoctonia solani* Kühn). Todas éstas patologías representan la mayor pérdida económica, dado su nivel de dispersión en las distintas zonas de producción (Vizgarra *et al.*, 2012).

En los últimos años, se ha detectado un incremento en el área de incidencia de estas enfermedades (Vizgarra *et al.*, 2016), posiblemente debido al cambio climático, al sistema de monocultivo y a la estrecha base genética de las variedades de poroto (Galván *et al.*, 2001; Stenglein, 2007). El abordaje de la enfermedad provocada por *S. sclerotiorum* en la producción del cultivo de poroto fue objeto de estudio de este trabajo de tesis.

1.2 Esclerotinia o moho blanco del poroto

La esclerotinia o moho blanco es una de las principales enfermedades asociadas al cultivo de poroto a nivel mundial. *Sclerotinia sclerotiorum* es un hongo extremadamente polífago

(Boland & Hall, 1994) que causa podredumbre y muerte de plantas en cultivos intensivos y extensivos, malezas y especies silvestres. A nivel mundial (Bolton *et al.*, 2006; Saharan & Mehta, 2008) y nacional (Mitidieri, 1980; Casalderrey, 2013; Vizgarra *et al.*, 2016) está entre los patógenos de mayor importancia económica. La esclerotinia se desarrolla especialmente en regiones con temperaturas moderadas y elevada humedad (Schwartz & Pastor-Corrales, 1988).

En el NOA la enfermedad es endémica y es la responsable de mermas significativas en la producción de poroto. El sistema de producción de poroto es principalmente de monocultivo, lo cual tiene consecuencias nefastas ya que la mayoría de las variedades son altamente susceptibles a esclerotinia. Las pérdidas del rendimiento producidos por esta enfermedad pueden alcanzar el 100%, particularmente bajo condiciones ambientales favorables para el desarrollo del patógeno en variedades sensibles, como fue el caso de Argentina en el año 2011 (Schwartz & Singh, 2013) y en la campaña 2017 en los departamentos de Orán y San Martín (Comunicación personal M. Salgado), donde la epidemia fue muy severa ocasionando pérdidas del rendimiento del 100%, sobre el 20% del total de lotes productivos. Como consecuencia, los productores debieron realizar una gran inversión monetaria para poder controlar la epidemia importando un total de 140.000 litros de fungicidas, lo que equivale alrededor de 6 millones de dólares de inversión (Comunicación personal M. Salgado).

Las grandes pérdidas ocasionadas al cultivo de poroto por la falta de altos niveles de resistencia del huésped y la dificultad general para manejar la enfermedad causada por *S. sclerotiorum*, formaron parte del impulso para realizar el presente trabajo de investigación sobre este patógeno.

1.2.1 Taxonomía

Dentro del género *Sclerotinia* existen tres especies de interés fitopatológico y económico: *S. sclerotiorum* (Lib.) De Bary, *S. trifoliorum* Erikss y *S. minor* Jagger. De las tres especies *S. sclerotiorum* es la más cosmopolita y versátil. Es un hongo polífago con un amplio rango de hospedantes y de amplia difusión mundial, que afecta a 75 familias conteniendo 278 géneros y 408 especies, entre las cuales se encuentran cultivos de importancia económica y malezas (Boland & Hall, 1994). La mayoría son dicotiledóneas herbáceas, pero también puede afectar a las monocotiledóneas. *S. sclerotiorum* presenta esclerocios irregulares de 2 a 20 mm (Kohn, 1979; Bardin & Huang, 2001). Los esclerocios se forman en posición terminal en las hifas y tienen ocho cromosomas haploides (Willetts & Wong, 1980). Cada esclerocio puede germinar carpogénicamente, produciendo de uno a varios apotecios en forma de copa (Sansford & Coley-Smith, 1992; Gracia-Garza *et al.*, 2002). *S. trifoliorum*

también se encuentra disperso en todo el mundo, pero tiene un rango de hospedantes más estrecho, limitado principalmente a las especies de la familia de las leguminosas y particularmente a las leguminosas forrajeras como la alfalfa (*Medicago sativa L.*), el trébol rojo (*Trifolium pretense L.*) y el trébol blanco (*Trifolium repens L.*) (Kohn, 1979). El tamaño de los esclerocios es de 2 a 20mm de diámetro, similar a los esclerocios de *S. sclerotiorum*. Por otro lado, *S. minor* es un patógeno principalmente de cultivos florales y vegetales y se limita a regiones frías y húmedas (Melzer *et al.*, 1997). La mayoría de los hospedantes de *S. minor* son dicotiledóneas, pero hay dos casos documentados de *S. minor* en monocotiledóneas (Melzer *et al.*, 1997). Produce numerosos esclerocios pequeños de 0.5 a 2 mm de diámetro.

Los principales criterios para distinguir entre estas especies se basan en: características morfológicas, como el tamaño de los esclerocios y dimensiones de ascosporas y ascas y el rango de hospedantes (Kohn, 1979; Boland & Hall, 1994).

A pesar de que el proceso de identificación de las especies del género *Sclerotinia* a través de los esclerocios y otras características morfológicas se ha perfeccionado con el tiempo (Kohn, 1979), existen limitantes. *S. minor* se puede diferenciar de las otras dos especies con relativa facilidad ya que produce esclerocios mucho más pequeños y más numerosos (Kohn, 1979). Sin embargo, la diferenciación entre *S. trifoliorum* y *S. sclerotiorum* basada en los esclerocios es difícil debido a su similitud morfológica y a la inestabilidad de algunas características de los esclerocios en los sub-cultivos posteriores (Cother, 1977). La diferenciación inequívoca entre *S. sclerotiorum* y *S. trifoliorum* requiere de la observación de la morfología de las ascosporas. *S. trifoliorum* tiene las ascas con ascosporas dimórficas (dos ascosporas de diferentes tamaños dentro de un solo asco), mientras que las ascosporas de *S. sclerotiorum* no muestran dimorfismo (Kohn, 1979). Sin embargo, la inducción de la germinación carpogénica de esclerocios es un proceso que lleva mucho tiempo y puede demorar varios meses. Además, algunos aislados de *S. trifoliorum* son heterotálicos y requieren aparearse con una cepa compatible para dar lugar a la germinación carpogénica con producción de ascosporas (Uhm, 1983; Uhm & Fujii, 1983). Es por ello que para facilitar la identificación de *S. trifoliorum* y *S. sclerotiorum*, se han realizado esfuerzos en la búsqueda de técnicas moleculares que sean confiables y de fácil aplicación. Actualmente, se utiliza la amplificación de las regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*) para diferenciar las especies del género (Holst-Jensen *et al.*, 1999; Hirschhäuser & Fröhlich, 2007; Abd-Elmagid *et al.*, 2013).

La amplificación de las regiones ITS o espaciadores transcriptos internos son regiones variables que se transcriben junto con los genes de ADN ribosómico (ADNr) (Figura 10). Dichas secuencias son zonas no codificantes del ADNr nuclear, lo que las hace más

susceptibles a acumular mutaciones y, por lo tanto, resultan de gran interés en la identificación de especies fúngicas y en estudios evolutivos (Schoch *et al.*, 2012). El polimorfismo de la región ITS y las diferencias de nucleótidos se utilizaron en diferentes estudios para diferenciar las tres especies de *Sclerotinia* (Holst-Jensen *et al.*, 1999; Hirschhäuser & Fröhlich, 2007; Abd-Elmagid *et al.*, 2013).

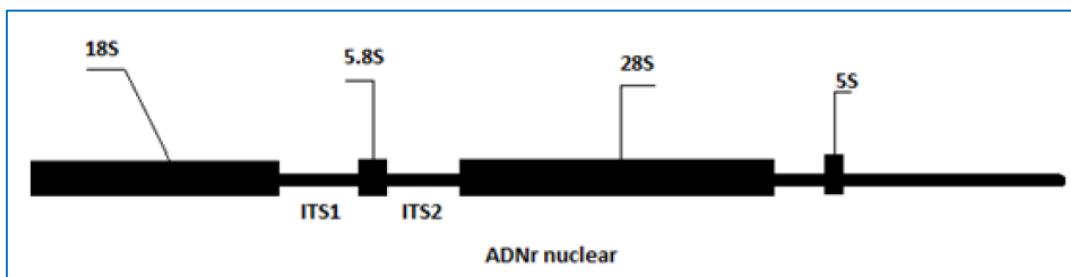


Figura 10. Representación esquemática de la región de ADNr y las secuencias ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Schoch *et al.*, 2012).

1.2.2 Sintomatología

Los síntomas característicos de esclerotinia se observan inicialmente como manchas irregulares acuosas a partir de infecciones iniciadas por ascosporas liberadas por los apotecios, que en condiciones de bajas temperaturas y elevada humedad aumentan de tamaño y se extienden observándose un crecimiento algodonoso que corresponde al micelio del hongo (Steadman, 1983). A menudo, se visualizan manchas marrones con anillos en las hojas (Figura 11, B). Los tallos se tornan blanquecinos y quebradizos (Figura 11, A). Las plantas con estos síntomas se marchitan y mueren. Las vainas, en particular las que están en contacto con el suelo, se infectan rápidamente cubriendose con micelio blanco (Figura 11, C). Finalmente, este micelio se torna grisáceo y se visualizan cuerpos negros denominados esclerocios, que adoptan la forma del lugar donde se originan, pudiendo ser alargados (interior de tallo) (Figura 11, F), redondeados (exterior de la planta) o adoptando formas irregulares dentro de las vainas. Los esclerocios son estructuras de resistencia que le permiten al hongo sobrevivir por largos períodos de tiempo ante condiciones adversas. Una vez que éstos se forman en las plantas infectadas pueden: caer al suelo, permanecer en el campo como restos de cultivo, o ser removidos con las semillas cosechadas (Dueck & Sedun, 1983; Mueller *et al.*, 1999).

La enfermedad también puede iniciarse a partir de los esclerocios presentes en el suelo. Los esclerocios producen micelio que penetra a través del sistema radicular, el cual se debilita disminuyendo gradualmente su función ocasionando marchitamiento que puede llevar a la muerte de la planta. Las plantas infectadas se quiebran fácilmente debido a la

destrucción de tejidos. En condiciones de alta humedad ambiental, las bases de las plantas se cubren de micelio blanquecino sobre el que se producen los esclerocios, aumentando la densidad de inóculo en el suelo.

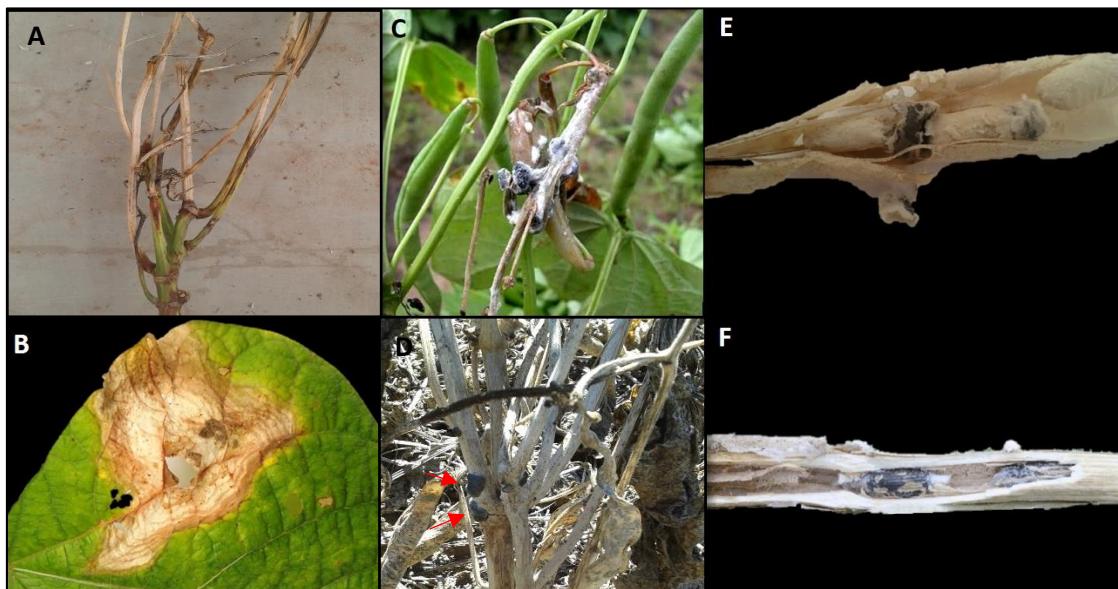


Figura 11. Síntomas de esclerotinia en plantas de poroto. A) Síntoma en tallo. B) Síntoma en hoja. C) Esclerocitos en vainas. D) Esclerocitos sobre tallos. E) Esclerocitos dentro de vainas. F) Esclerocitos dentro de tallos.

1.2.3 Epidemiología y ciclo de vida

S. sclerotiorum es un hongo necrotrófico con habilidad de competencia saprofítica y puede, en ausencia de antagonistas, permanecer en el suelo ya sea como hifa colonizando materia orgánica, o a través de esclerocitos. Los esclerocitos son la fuente de inóculo más importante (por su capacidad de supervivencia ante condiciones adversas). La pérdida de viabilidad y degradación de los mismos depende de factores como ser altas temperaturas, condiciones extremas de alternancia de humedad y profundidad a la que se encuentran en el suelo (Steadman, 1983).

El ciclo de vida de *S. sclerotiorum* consta de una fase asexual y una fase sexual, siendo la última la de mayor importancia epidemiológica (Figura 12). En la etapa asexual los esclerocitos, bajo condiciones de elevada humedad y moderada temperatura, germinan produciendo un micelio blanco de aspecto algodonoso. El micelio penetra en las plantas, generalmente a la altura del suelo, a través de heridas o aperturas. El hongo se desarrolla sobre la planta infectada y produce nuevos esclerocitos que caen fácilmente al suelo, comenzando de nuevo el ciclo. Los esclerocitos tienen la capacidad de sobrevivir durante 5 años o más (Steadman & Boland, 2005), siendo el principal modo de propagación de la enfermedad.

La fase sexual del ciclo también comienza a partir de los esclerocios. Sobre los esclerocios se desarrollan uno o varios apotecios (Figura 13). Los apotecios son discos carnosos que miden de 2 mm a 10 mm de diámetro, en cuyo interior se albergan las ascas, que contienen ocho ascosporas hialinas ($110-160 \mu\text{m} \times 6-10 \mu\text{m}$) (Kohn, 1979). Cada apotecio puede liberar hasta 10 millones de ascosporas durante un período de varios días en el medio ambiente. La mayoría de las ascosporas se dispersan fácilmente con el viento en un radio de 100 m, y algunas inclusive pueden viajar hasta 3 o 4 km (Cubeta *et al.*, 1997) donde se depositan sobre diferentes órganos de la planta. Las ascosporas no infectan los tejidos vivos directamente, sino que colonizan tejidos senescentes o muertos. En la mayor parte de los casos las estructuras florales proveen el material para la colonización inicial. La penetración del hongo se produce por presión mecánica y por disolución enzimática de los tejidos. Una vez iniciada la infección micelial, el micelio blanco de aspecto algodonoso se extiende rápidamente al resto de la planta. Avanzada la etapa de colonización, el micelio se anastomosa formando los esclerocios, reiniciándose el ciclo. Las plantas afectadas producen esclerocios que quedan en los rastrojos, caen al suelo o se diseminan con la semilla.

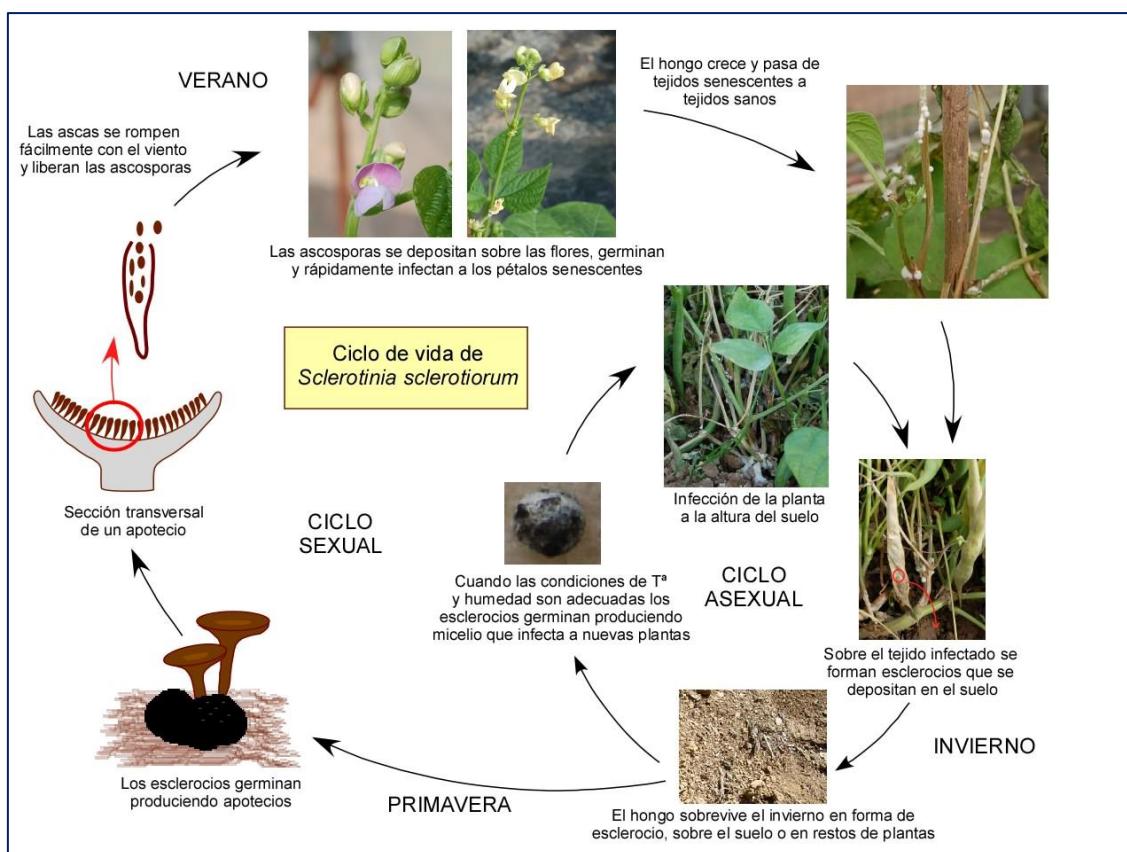


Figura 12. Ciclo de vida de *S. sclerotiorum* (Negrillo *et al.*, 2009).

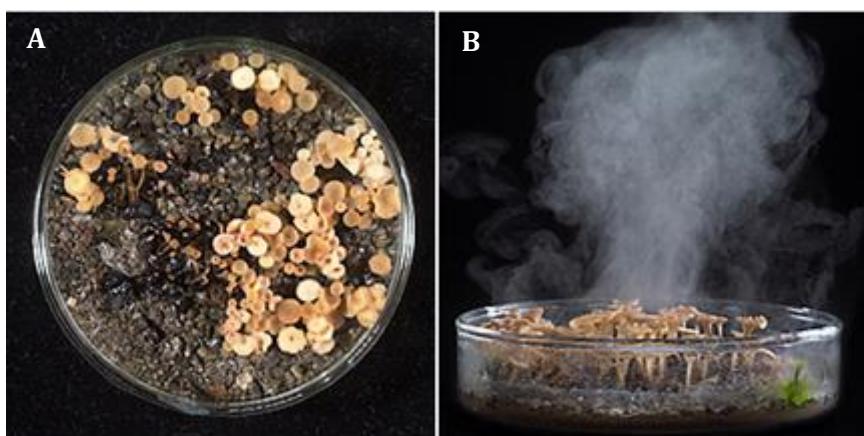


Figura 13. A) Producción in vitro de apotecios de *S. sclerotiorum*. B) Liberación de ascosporas de *S. sclerotiorum* (Pethybridge *et al.*, 2015).

1.2.4 Manejo de la enfermedad

El manejo de la esclerotinia es complejo y se deben emplear diferentes estrategias para un control eficaz. Los métodos de control deben reducir el inóculo de esclerocios presente en el suelo, ya sea mediante prácticas culturales, control químico o biológico, y utilizando variedades con resistencia genética. En lo que se refiere a buenas prácticas en el cultivo, se recomienda utilizar semilla sana, eliminar los residuos de cosechas anteriores para evitar la propagación por medio de esclerocios y rotar con cultivos resistentes o no hospedantes. Además, para favorecer la circulación de aire es recomendable aumentar la distancia de siembra de manera de establecer condiciones microclimáticas adversas para el desarrollo del hongo. El control químico puede ser efectivo siempre que se apliquen cuidadosas técnicas de pulverización, con volúmenes adecuados y en el momento correcto. Se recomienda la aplicación antes de la producción de ascosporas y sobre pétalos vivos. El control químico efectivo tiene como consecuencia un alto rendimiento económico. Sin embargo, los químicos usualmente solo previenen el incremento de la enfermedad durante períodos de alto riesgo, dado que la erradicación de la esclerotinia es extremadamente difícil (Bardin & Huang, 2001). El control biológico se realiza mediante el uso de hongos antagonistas como *Coniothyrium minitans* (Whipps *et al.*, 2008), *Trichoderma* y *Gliocadium* (Zeng *et al.*, 2012). También se han utilizado bacterias como *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Burkholderia cepacia* (Sid Ahmed *et al.*, 2003; Saharan & Mehta, 2008). Se recomienda la aplicación en las etapas donde el patógeno tiene poca movilidad (estado de esclerocio) o en la etapa de germinación donde el patógeno es más vulnerable.

Los cultivos con resistencia genética son cruciales para el control adecuado de brotes epidémicos de esclerotinia, y para reducir o eliminar el uso de fungicidas (Miklas *et al.*, 2013). La fuentes de resistencia fisiológica a esclerotinia son de origen andino,

mesoamericano, silvestre, y de las especies de *Phaseolus* del pool génico secundario, como *Phaseolus coccineus*, *P. dumosus* y *P. costaricensis* (Miklas *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 2006; Maxwell *et al.*, 2007; Terpstra & Kelly, 2008; Singh *et al.*, 2009a,b; Terán & Singh, 2009a; Pascual *et al.*, 2010; Mkwaila *et al.*, 2011). La falta de niveles altos de resistencia fisiológica combinado con la baja a moderada heredabilidad de caracteres, limita el progreso en la producción de cultivos de poroto con resistencia mejorada a esclerotinia (Schwartz & Singh, 2013). El desarrollo de marcadores moleculares estrechamente ligados a los genes de resistencia ha sido una herramienta de gran utilidad en el mejoramiento genético haciendo más eficiente y confiable al proceso de selección.

La integración de las diferentes estrategias indicadas puede ayudar en el control de esta enfermedad, aunque no garantiza la ausencia de daños. Sin embargo, el uso de variedades resistentes, o con elevados niveles de resistencia, sería la forma más económica y sustentable para el control de esta enfermedad. En este sentido, en todo programa de mejoramiento genético que tenga como objetivo desarrollar cultivos resistentes frente a un determinado patógeno, y que se encuentren adaptados a un área geográfica particular, es fundamental conocer la variabilidad del patógeno en la zona, para luego identificar potenciales fuentes de resistencia, como también conocer la determinación genética de la resistencia al patógeno (cualitativa o cuantitativa).

1.2.5 Variabilidad genética

La comprensión adecuada de cómo la variabilidad genética de las poblaciones de *S. sclerotiorum* se ve estructurada y afectada por los diferentes mecanismos evolutivos, puede ser útil para optimizar las estrategias de control, particularmente el desarrollo de variedades resistentes (McDonald & Linde, 2002). El estudio de la variabilidad de *S. sclerotiorum* se ha logrado mediante el uso de grupos de compatibilidad micelial (*Micelial Compatibility Groups* o MCG), marcadores moleculares y morfológicos (Atallah *et al.*, 2004; Sexton & Howlett, 2004; Mert-Türk *et al.*, 2007; Attanayake *et al.*, 2013; Lehner *et al.*, 2015a; Kamvar *et al.*, 2017).

Los MCG se utilizan como el primer método para identificar la variación intraespecífica dentro de las poblaciones de un campo de cultivo (Kohn *et al.*, 1991). La prueba de MCG es un ensayo fenotípico macroscópico basado en la habilidad que tienen dos aislados de fusionarse para dar lugar a la formación de un heterocarión estable (Figura 14), es decir una única colonia (Kohn *et al.*, 1990). Si los aislados son incompatibles, no se produce el intercambio genético y en la zona de interacción se produce la muerte de la célula. Como consecuencia se forman grupos de individuos (subpoblaciones) que difieren

entre sí en los grupos de genes que pueden afectar los rasgos ecológicos, fisiológicos y patológicos (Remesal *et al.*, 2012), mientras que los aislados de un mismo grupo poseen mayor similitud genética (Carbone *et al.*, 1999). De esta manera, este método permite clasificar a los aislados de *S. sclerotiorum* en MCG. Este sistema de reconocimiento en hongos está controlado por múltiples loci (Leslie, 1993). Por lo tanto, esta metodología permite caracterizar la variabilidad genética en una población, establecer la presencia de heterogeneidad y probar la clonalidad.

Cuando los aislados de un MCG comparten el mismo conjunto de marcadores, como los marcadores moleculares, probablemente derivan de una cepa parental común (Leslie, 1993). En consecuencia, los aislados de un MCG están estrechamente relacionados y el MCG se concibe como un linaje clonal (Leslie, 1993).

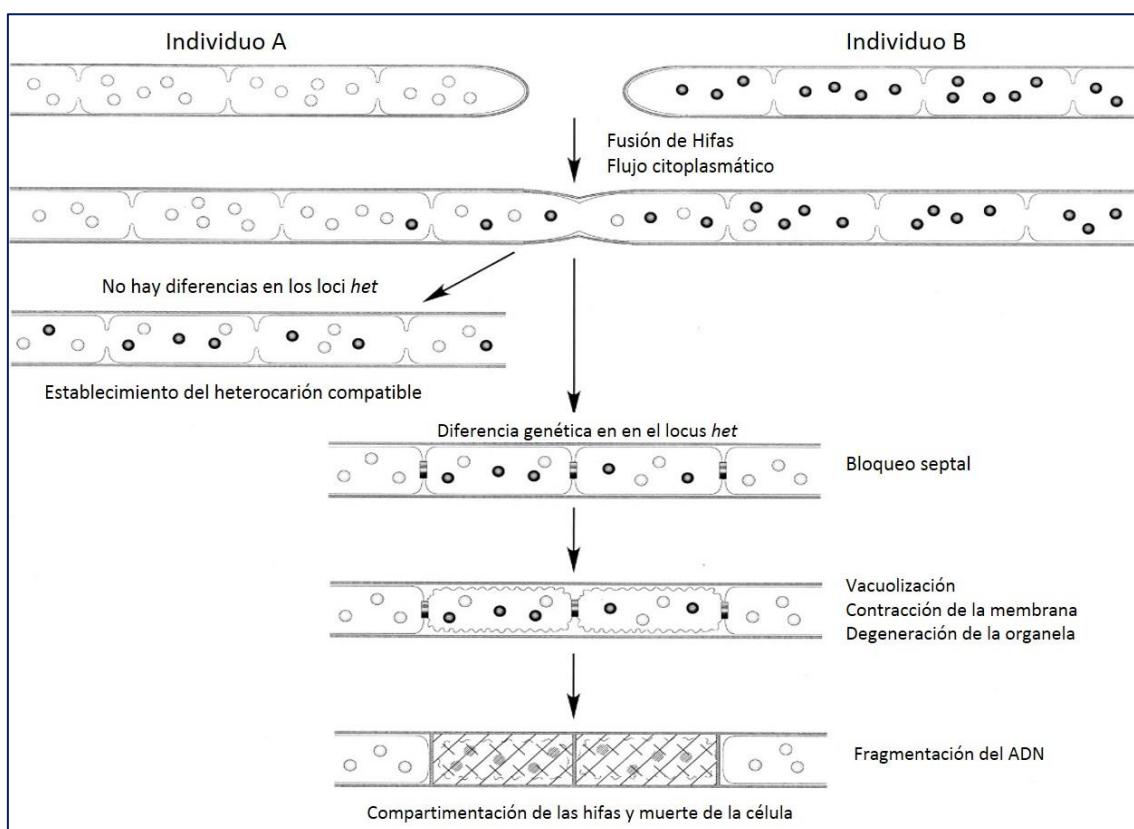


Figura 14. Reacciones de compatibilidad e incompatibilidad micelial (Glass & Kaneko, 2003).

Los marcadores moleculares, son segmentos de ADN que permiten identificar variaciones entre individuos y son herramientas valiosas para estudiar la diversidad genética en hongos. Diversos tipos de marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se han utilizado para estudiar la diversidad genética en patógenos de plantas. Los marcadores comúnmente utilizados son los RAPD

(*Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Sequence Simple Repeat*) y los SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Njambere *et al.*, 2010).

Los marcadores SSR, también llamados microsatélites, son secuencias de ADN constituidas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases. Son marcadores codominantes y están presentes tanto en las regiones codificantes como en las no codificantes, y generalmente se caracterizan por un alto grado de polimorfismo en cuanto a su longitud, por lo que son regiones adecuadas para usarse como marcadores a nivel poblacional (Zane *et al.*, 2002). Este alto grado de polimorfismo es consecuencia de una elevada tasa de mutación (desde 10^{-6} hasta 10^{-2} mutaciones por sitio por generación), que se atribuye a eventos de inserción y delección durante la replicación del ADN (Schlotterer, 2000).

Los primeros estudios realizados con marcadores moleculares para estudiar las poblaciones de *S. sclerotiorum* surgieron a fines de la década de 1980 (Kohn, 1988; Kohn *et al.*, 1990) en climas templados. La variabilidad genética se estimó basándose en el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y/o en la clasificación de aislados de acuerdo con sus grupos de compatibilidad micelial (MCG). En la mayoría de los estudios genéticos realizados con marcadores RFLP hubo predominancia de poblaciones clonales (Kohli *et al.*, 1992; Anderson & Kohn, 1995; Kohli & Kohn, 1998; Hambleton *et al.*, 2002). Aunque la clonalidad era evidente en estas poblaciones, las pruebas de desequilibrio de ligamiento indicaron una asociación aleatoria de alelos en más del 40% de los pares de loci, lo que sugirió al menos algún grado de recombinación (Kohli & Kohn, 1998).

En el año 2001, Sirjusingh y Kohn (2001) desarrollaron 20 cebadores de microsatélites para *S. sclerotiorum* y fueron ampliamente utilizados en numerosos estudios destinados a evaluar la variabilidad genética de *S. sclerotiorum*. Debido a que los marcadores SSR generalmente tienen altas tasas de mutación y una naturaleza multi-alélica, permiten la detección de polimorfismos incluso entre aislados que comparten el mismo patrón de bandas o *fingerprint* de RFLP (Sirjusingh & Kohn, 2001).

En los últimos años, la variabilidad genética de las poblaciones de *S. sclerotiorum* ha sido investigada en muchos países con diferentes marcadores moleculares y, consecuentemente, bajo diferentes condiciones ecológicas. Los estudios que utilizaron marcadores RFLP y/o MCG revelaron una gran prevalencia de poblaciones clonales de *S. sclerotiorum* basadas en la alta frecuencia de algunos genotipos (Cubeta *et al.*, 1997; Hambleton *et al.*, 2002). Sin embargo, con la introducción de los marcadores microsatélites para evaluar la variación genética en *S. sclerotiorum* surgieron muchos estudios que informan una elevada variabilidad del patógeno (Atallah *et al.*, 2004; Sexton & Howlett,

2004; Mert-Türk *et al.*, 2007; Hemmati *et al.*, 2009; Litholdo Junior & Gomes, 2011; Attanayake *et al.*, 2013) y solo algunos que revelan la existencia de escasa variabilidad genética (Clarkson *et al.*, 2013; Lehner *et al.*, 2015a). Algunos autores argumentan que las poblaciones de *S. sclerotiorum* de regiones subtropicales y tropicales son más diversas que las poblaciones de regiones templadas. Sin embargo, Lehner y Mizubuti (2017a) sostienen que los estudios que informan alta variabilidad en las poblaciones de *S. sclerotiorum* en regiones tropicales o subtropicales pueden deberse a un aumento en el número de estudios realizados con marcadores de SSR en estas regiones, ya que el 64% de estos estudios utilizaron marcadores SSR, el 27% utilizó otros marcadores, y sólo el 9% utilizó RFLP. Asimismo, en el 63% de los artículos de regiones templadas que informaron estructura genética clonal, el 70% de estos estudios se realizaron con marcadores de RFLP.

A pesar de las altas tasas de mutación de los SSR, estudios recientes sugieren que la alta variabilidad observada en algunas poblaciones de EE. UU. (clima templado) o China (clima subtropical) se debe a recombinación meiótica y no a altas tasas de mutación en las regiones SSR (Attanayake *et al.*, 2014). Estos resultados apoyan la falta de correlación entre la zona climática y la variabilidad genética o la contribución diferencial de los mecanismos evolutivos en las poblaciones de *S. sclerotiorum*. Además, confirman los hallazgos previos de que la estructura genética del patógeno puede verse influenciada por la reproducción mixta.

La evidencia de exogamia en poblaciones de *S. sclerotiorum* fue sugerida en ambas regiones, subtropical y templada (

Figura 15). Los principales elementos de prueba son: los marcadores moleculares en equilibrio de ligamiento, las ascosporas hermanas que son genéticamente distintas, la falta de correlación entre los MCG y los marcadores moleculares, y la alta variabilidad genotípica. Todas las características son consistentes con poblaciones recombinantes (Milgroom, 1996). Sin embargo, la especulación de que en las regiones tropicales *S. sclerotiorum* se reproduce predominantemente por vía sexual (Litholdo Junior & Gomes, 2011; Abreu *et al.*, 2015) necesita más análisis.

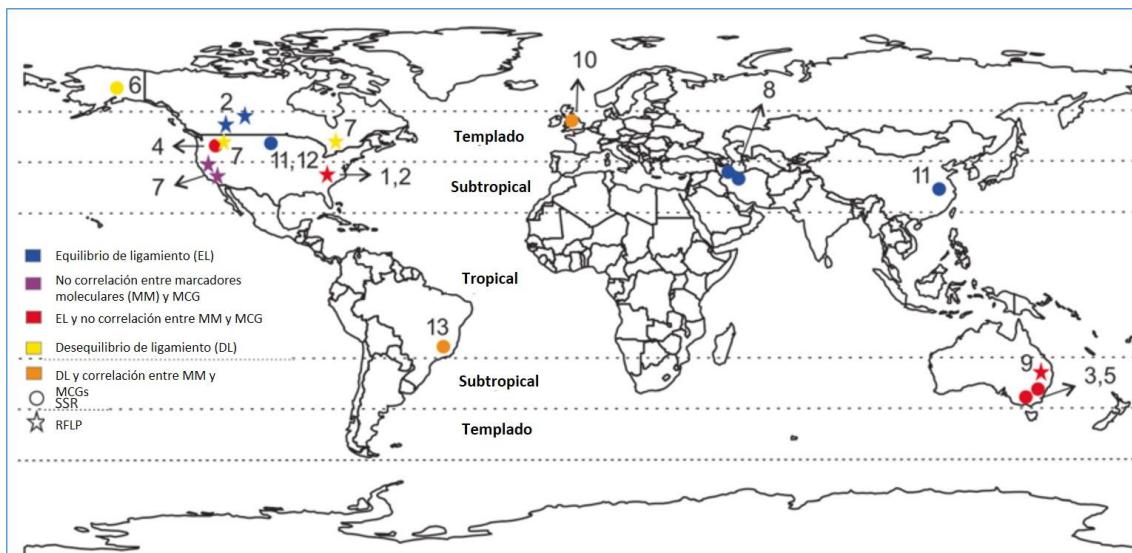


Figura 15. Distribución de las poblaciones de *S. sclerotiorum* en las cuales se estudió su modo de reproducción utilizando marcadores RFLP (estrella) o SSR (círculo) (Lehner & Mizubuti, 2017a). La zona tropical está delimitada entre los trópicos de Cáncer y Capricornio. Las zonas subtropicales se delimitan entre los 23.5 y 40° de latitud, mientras que las regiones superiores a los 40° en ambos hemisferios se consideran zonas de clima templado. 1 = Cubeta *et al.* (1997); 2 = Kohli y Kohn (1998); 3 = Sexton y Howlett (2000); 4 = Atallah *et al.* (2004); 5 = Sexton *et al.* (2006); 6 = Winton *et al.* (2006); 7 = Malvárez *et al.* (2007); 8 = Hemmati *et al.* (2009); 9 = Ekins *et al.* (2011); 10 = Clarkson *et al.* (2013); 11 = Attanayake *et al.* (2013); 12 = Aldrich-Wolfe *et al.* (2015); y 13 = Lehner *et al.* (2015b).

La ocurrencia de recombinación representa un desafío para el control de las epidemias de esclerotinia, dado que *S. sclerotiorum* tiene un amplio rango de hospedantes, una elevada tasa de supervivencia mediante los esclerocios y un modo de colonización altamente agresivo, a lo que además se suma la variabilidad genética de la población.

A pesar de la relevancia de las epidemias de esclerotinia en la agricultura argentina, no se han realizado estudios previos para conocer la variabilidad del patógeno, lo que limita el mejoramiento para la obtención de variedades resistentes adaptadas a la zona. Considerando los antecedentes planteados, la temática propuesta en el presente trabajo de tesis resulta de suma relevancia para el mejoramiento genético del poroto en la región del NOA.

1.3 Hipótesis

1. Los aislados de *S. sclerotiorum* obtenidos de las principales zonas de producción de poroto de Argentina presentan variabilidad fenotípica.
2. Existe estructuración de la variabilidad genética de *S. sclerotiorum*, la cual queda determinada por el tipo de reproducción predominantemente clonal de la especie.
3. Los diferentes grupos de MCG de *S. sclerotiorum* pueden diferenciarse a partir del análisis molecular con marcadores URP y SSR.
4. Los aislados de diferentes MCG de *S. sclerotiorum* presentan agresividad diferencial frente a determinados genotipos de poroto.

1.4 Objetivos

Objetivo general

Conocer la variabilidad fenotípica y genotípica mediante la caracterización morfológica y molecular del patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* en las principales zonas de cultivo de poroto de la Argentina para aportar conocimiento a los programas de mejoramiento.

Objetivos específicos

1. Obtener aislados de *Sclerotinia sclerotiorum* a partir del relevamiento de lotes comerciales en la principal zona de cultivo de poroto de la Argentina.
2. Identificar los aislados de *S. sclerotiorum* mediante el análisis de secuencias ITS-ADNr.
3. Analizar la variabilidad fenotípica y genotípica de los aislados obtenidos de *S. sclerotiorum* empleando caracteres morfológicos y marcadores moleculares.
4. Estudiar la estructura poblacional de *S. sclerotiorum* mediante marcadores microsatélites (SSR).
5. Evaluar la agresividad de los aislados empleando diferentes genotipos de poroto (variedades comerciales y líneas avanzadas).

CAPÍTULO II

Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Sclerotinia sclerotiorum*

2.1 INTRODUCCIÓN

En Argentina, se ha detectado esclerotinia en todas las áreas de producción de poroto, principalmente al norte de Salta, en los departamentos de Orán y San Martín, donde las condiciones climáticas de la zona propician la prevalencia de las epidemias. Además, en la zona predomina el sistema de monocultivo lo que lleva a consecuencias nefastas cuando se dan las condiciones favorables para el desarrollo del patógeno, ya que la mayoría de las variedades, sino todas, son altamente susceptibles (Schwartz & Pastor-Corrales, 1988; Schwartz & Singh, 2013). A pesar de la relevancia de las epidemias de esclerotinia en la agricultura argentina, no hay estudios previos del patógeno en la región. Considerando que en el NOA los programas de mejoramiento para la resistencia a esclerotinia en poroto son recientes, antes de desarrollar nuevas variedades resistentes es necesario caracterizar a los aislados de *S. sclerotiorum* de la principal área de producción de poroto, ya que la comprensión adecuada de la variabilidad genética del patógeno en la zona es útil para optimizar las estrategias de control (McDonald & Linde, 2002).

La variabilidad genética se puede estimar mediante el estudio de la compatibilidad micelial, similar a la compatibilidad vegetativa, un rasgo fúngico controlado por varios genes independientes que permiten la fusión e hibridación de dos hifas como una sola unidad (Leslie, 1993; Schafer & Kohn, 2006). Como se mencionó anteriormente, debido a la conexión genética con la compatibilidad vegetativa, se consideran clones a dos o más aislados que pertenecen al mismo MCG y tienen el mismo genotipo (Leslie, 1993). Sin embargo, la correlación con marcadores genéticos ha mostrado resultados inconsistentes (Ford *et al.*, 1995; Attanayake *et al.*, 2012; Lehner & Mizubuti, 2017a). Por lo tanto, la relación entre los grupos de compatibilidad micelial y los genotipos clonales sigue sin estar clara.

Estudios previos demostraron que la metodología de PCR utilizando marcadores moleculares URP (*Universal Rice Primer*) es eficiente para la diferenciación rápida de aislados fúngicos (Kang *et al.*, 2002; Manjunatha *et al.*, 2014; Mann *et al.*, 2014). Los marcadores URP (Kang *et al.*, 2002) son marcadores moleculares dominantes que se han utilizado ampliamente en estudios de variabilidad para muchos patógenos (González *et al.*, 2012; Mann *et al.*, 2014). Esta técnica tiene la ventaja de ser rentable y no requerir el conocimiento previo del genoma de la especie en estudio. Además, los marcadores URP son más reproducibles que los RAPD ya que se emplean condiciones rigurosas de PCR con altas temperaturas de hibridación y cebadores de mayor longitud (Kang *et al.*, 2002). Debido a que poseen múltiples loci polimórficos, los marcadores URP son adecuados para el análisis

de individuos estrechamente relacionados (Kang *et al.*, 2002; González *et al.*, 2012; Mann *et al.*, 2014). Existe sólo un estudio previo que consideró la utilidad de los marcadores URP para el análisis de aislados de *S. sclerotiorum*, sin embargo, el número de marcadores empleado fue bajo (Manjunatha *et al.*, 2014).

Además de la variabilidad genética, también es de gran interés conocer si el patógeno presenta variación en cuanto a su agresividad o virulencia, es decir, la capacidad del patógeno para causar enfermedad en un huésped de un modo diferencial, produciendo diferentes grados de severidad según el genotipo del patógeno. Estudios previos analizaron la agresividad de *S. sclerotiorum* en soja (Kull *et al.*, 2004), papa (Atallah *et al.*, 2004), canola (Sexton & Howlett, 2004; Attanayake *et al.*, 2013), girasol (Ekins *et al.*, 2007; Irani *et al.*, 2011) y poroto (Pascual *et al.*, 2010; Otto-Hanson *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014; Lehner *et al.*, 2015a; Kamvar *et al.*, 2017). Se demostró que la agresividad de los aislados varía dentro de los grupos de compatibilidad micelial ampliamente dispersos. Sin embargo, no se observó variación en la agresividad en los MCG detectados en campos o lotes individuales (Kull *et al.*, 2004). La existencia de variantes patogénicas debe ser tenida en cuenta cuando se evalúan variedades presumiblemente resistentes a la enfermedad utilizando diferentes aislados en los test de resistencia.

Debido a que *S. sclerotiorum* es un hongo homotálico que se reproduce asexualmente por medio de esclerocios o sexualmente por auto fertilización (Amselem *et al.*, 2011), el conocimiento del tipo de reproducción predominante del patógeno en una región geográfica particular y la evaluación de su variabilidad genética en una región es de carácter fundamental para encontrar la mejor estrategia de control de la enfermedad y para los programas de mejoramiento que apuntan a desarrollar nuevas variedades resistentes.

A pesar de la relevancia de las epidemias de esclerotinia en la agricultura argentina, no se han realizado estudios previos para investigar la variabilidad y diversidad genética de *S. sclerotiorum* en cultivos de poroto, así como tampoco se evaluó la agresividad de los aislados de *S. sclerotiorum* obtenidos de diferentes lotes de poroto del NOA.

En el presente capítulo se realizó el relevamiento de lotes comerciales de poroto de la provincia de Salta para observar síntomas y daño producido por *S. sclerotiorum* con el objetivo de aislar el patógeno de plantas con síntoma de esclerotinia. Los aislados obtenidos se caracterizaron morfológica y molecularmente para analizar la variabilidad fenotípica y genotípica del patógeno en la región. Para ello se analizaron caracteres morfológicos, se identificaron los aislados mediante secuencias ITS-ADNr y se estimó la variabilidad genética mediante grupos de compatibilidad micelial y marcadores moleculares URP. Además, se

estudió la agresividad de los aislados de *S. sclerotiorum* y se realizaron análisis multivariados para determinar si existe correlación entre las diferentes variables.

Las preguntas a responder en este capítulo fueron las siguientes:

- ¿Existe variabilidad genética y fenotípica entre los aislados de *S. sclerotiorum* identificados en la zona?
- ¿Existe diferencia en la agresividad de los aislados de *S. sclerotiorum* entre y dentro de los lotes de cultivo relevados?
- ¿Los aislados de *S. sclerotiorum* genéticamente diferentes y que provienen de distinta ubicación geográfica presentan variación en agresividad?
- ¿Los marcadores URP son útiles para analizar la variabilidad genética y estructura poblacional de las poblaciones de *S. sclerotiorum* estudiadas?
- ¿Existe correlación entre los MCGs, los haplotipos URP y la agresividad de los aislados de *S. sclerotiorum*?

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Obtención de aislados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Durante la campaña 2014, se relevaron 13 lotes comerciales de poroto en las principales áreas de producción de las provincias de Salta y Jujuy (Tabla 1). En cada lote se realizó un diseño de muestreo en “W”, extrayendo aproximadamente 5 plantas con síntomas de esclerotinia por punto de muestreo (Figura 16).

Tabla 1. Lotes muestreados, número y procedencia de los aislados de *S. sclerotiorum* obtenidos a partir del relevamiento de 13 lotes de cultivos comerciales de poroto de las provincias de Salta y Jujuy.

Lote	N.º de aislados	Localidad/Provincia	Hospedante	Latitud	Longitud
LOTE 1	24	Orán/Salta	Poroto Negro	-23° 18' 28,4"	-64° 11' 98,1"
LOTE 2	18	Campichuelo/Salta	Poroto Negro	-23° 06' 83,0"	-64° 01' 16,9"
LOTE 3	2	Gral. Mosconi/Salta	Poroto Blanco	-22° 39' 30,4"	-63° 48' 66,7"
LOTE 4	0	Güemes/Salta	Poroto Blanco	-24° 36' 78,9"	-65° 04' 62,9"
LOTE 5	18	Pichanal/Salta	Poroto Negro	-23° 22' 09,0"	-64° 03' 27,0"
LOTE 6	20	Palma Sola/Jujuy	Poroto Blanco	-23° 47' 47,3"	-64° 26' 48,9"
LOTE 7	4	Capital/Salta	Poroto Blanco	-24° 46' 37,5"	-65° 19' 15,5"
LOTE 8	0	Palma Sola/Jujuy	Poroto Blanco	-23° 49' 16,5"	-64° 25' 43,3"
LOTE 9	37	Gral. Ballivián/Salta	Poroto Blanco	-22° 59' 23,6"	-63° 52' 57,9"
LOTE 11	5	Tartagal/Salta	Poroto Blanco	-22° 53' 28,7"	-63° 40' 56,9"
LOTE 12	9	Tartagal/Salta	Poroto Colorado	-22° 53' 28,7"	-63° 40' 56,9"
LOTE 13	4	Tartagal/Salta	Poroto Negro	-22° 53' 36,0"	-63° 46' 01,4"
LOTE 14	36	Tartagal/Salta	Poroto Blanco	-22° 39' 45,7"	-63° 33' 45,9"

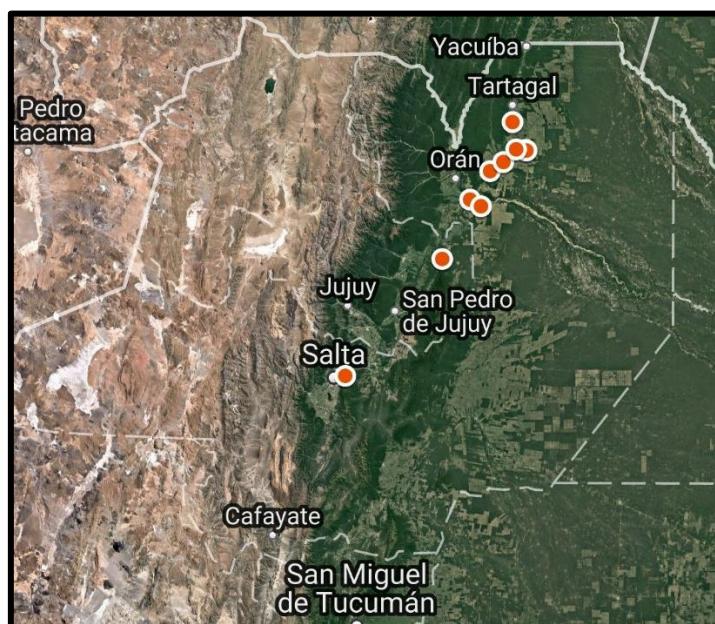


Figura 16. Lotes comerciales muestreados en las principales zonas de producción de poroto de las provincias de Salta y Jujuy.



Figura 17. a) y d) Relevamiento de lotes y obtención de muestras para el aislado del patógeno. b) y c) Plantas con síntoma de esclerotinia a partir de las cuales se realizó el aislado del patógeno.

Los aislados de *S. sclerotiorum* se obtuvieron a partir de esclerocios del interior de los tallos de plantas enfermas. Cada aislado derivó de un único esclerocito, con sólo un aislado obtenido de cada planta muestreada. Los esclerocios se esterilizaron superficialmente por inmersión en etanol al 70% (2 minutos), hipoclorito de sodio 3% (1 minuto) y agua destilada estéril (3 veces durante 1 minuto cada vez). Se dejaron secar sobre toallas de papel absorbente estériles. Una vez secos, se cortaron los extremos de cada esclerocito con un bisturí estéril y se sembraron en placas de Petri con agar papa glucosado (APG). Las placas se incubaron a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad. Después de 72 h, se realizó un repique de cada aislado con ansa estéril tomando las hifas del extremo y transfiriéndolas a una nueva placa con APG que fue mantenida durante dos semanas en oscuridad a temperatura ambiente. Se

extrajeron los esclerocios formados en cultivo y se almacenaron en bolsas de papel a 4 °C para su posterior empleo.

2.2.2 Caracterización morfológica

Los aislados fueron caracterizados morfológicamente mediante la observación de los cultivos desarrollados en placas de Petri con medio de cultivo APG a 20 ± 2 °C en oscuridad durante 15 días. Para cada aislado se registró el color del micelio, el patrón de distribución de esclerocios y el número de esclerocios desarrollados por placas de Petri. Se realizaron tres repeticiones por aislado.

2.2.3 Test de compatibilidad micelial

Los grupos de compatibilidad micelial (MCG) de los aislados se determinaron según Kohn *et al.* (1991) contrastando cada aislado con sí mismo y contra todos los demás en placas de Petri con medio APG modificado con colorante rojo de alimentos (Schafer & Kohn, 2006). Para ello, se tomaron discos miceliales (5 mm de diámetro) de cada aislado provenientes del extremo de una colonia en crecimiento activo y se colocaron triangularmente (4 cm uno del otro) en una placa de Petri con APG de 9 cm de diámetro modificada con 175 μ l/l de colorante rojo. Cada emparejamiento se realizó tres veces. Como control de compatibilidad, cada aislado se enfrentó con sí mismo. Las placas se incubaron a 20 ± 2 °C en oscuridad durante 14 días. Los emparejamientos se evaluaron observando la zona de interacción entre los aislados enfrentados (Figura 18). Las reacciones miceliales se registraron como compatibles cuando dos cepas se fusionaron para formar una colonia (Kohn *et al.*, 1991). Las reacciones miceliales se clasificaron como incompatibles cuando se observó una banda de micelio aéreo en la zona de interacción y, en el revés de las placas de Petri, se observó una delgada línea roja entre los aislados enfrentados (Schafer & Kohn, 2006) (Figura 18). Los resultados se registraron en una matriz binaria, (1: reacción compatible, 0: reacción incompatible). Los aislados se consideraron pertenecientes al mismo MCG cuando fueron compatibles entre sí y mostraron incompatibilidad con miembros de otros MCG. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones.

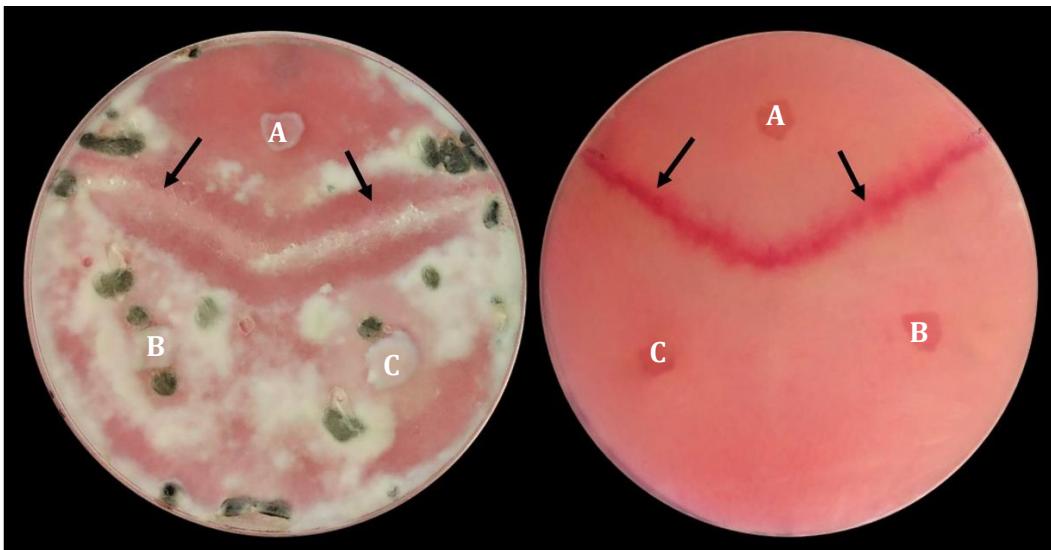


Figura 18. Prueba de compatibilidad micelial entre aislados de *S. sclerotiorum*. Las flechas señalan una reacción incompatible (banda de micelio aéreo en la zona de interacción, presencia de una delgada línea roja) entre los aislados A-B y A-C. La reacción compatible (fusión de micelios sin zona de interacción) se visualiza entre los aislados B y C. En la imagen de la derecha se observa el revés de la placa de Petri.

2.2.4 Análisis de la diversidad de los MCG

El índice de Shannon toma en cuenta la frecuencia y la uniformidad de la distribución de un fenotipo en particular. Para analizar la diversidad de los MCG se utilizó el índice de diversidad de Shannon & Weaver (1963) que representa la diversidad dentro de cada ubicación. Para cada lote muestreado, el índice de diversidad se calculó de la siguiente manera:

$$h_o = - \sum (p_i \ln p_i)$$

Donde p_i es la frecuencia del i-ésimo MCG. La frecuencia p_i se definió como el cociente entre el número de aislados que pertenecen al i-ésimo MCG y el número de aislados en la muestra.

Dado que el tamaño de las muestras fue diferente entre las ubicaciones muestreadas, los valores de diversidad de MCG se normalizaron según la diversidad máxima en cada población de la siguiente manera:

$$H_0 = h_o / \ln k$$

Donde k es el tamaño de la muestra. La diversidad total de MCG (H_{tot}) se partió dentro y entre los componentes de la población (Goodwin *et al.*, 1992). Para ellos se calculó:

$$H_{\text{pop}} = \sum H_0 / n$$

Donde n es el número de poblaciones analizadas. La proporción de la diversidad total debida a la variación entre individuos dentro de una misma población se calculó como:

$$H_{\text{pop}}/H_{\text{tot}}$$

Donde H_{tot} es el Índice de Shannon calculado para todas las muestras consideradas como una sola población. La proporción de la diversidad total debida a las diferencias entre poblaciones se calculó como:

$$(H_{\text{tot}} - H_{\text{pop}})/H_{\text{tot}}$$

Por último, se calculó la fracción clonal para cada población como $1 - [(número \ de \ genotipos \ diferentes) / (\número \ total \ de \ aislados)]$ (Zhan *et al.*, 2003).

2.2.5 Caracterización molecular

2.2.5.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de tejido micelial siguiendo un protocolo con SDS (dodecilsulfato sódico). Se molieron 300 mg de micelio, obtenido de placas de Petri con APG de 6 días de crecimiento, en morteros previamente congelados y estériles. Se adicionaron 700 μl de buffer de extracción [670 μl de buffer (100 mM Tris-HCl + 20 mM EDTA + 1.4 M ClNa), 80 μL de SDS y 0,62 μL de β -mercaptoetanol] se molió nuevamente la muestra y se transfirió la mezcla a un tubo Eppendorf de 2 ml. Se incubó a 5 °C por 10 minutos y luego se incorporaron 200 μL de acetato de potasio 5 M. Se mantuvieron los tubos en heladera durante 20 minutos y luego se centrifugaron 30 minutos a 4 °C a 10.000 rpm en una centrifuga Eppendorf 5415R. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se incorporaron 500 μL de isopropanol frío. Luego de mezclar suavemente, se centrifugó 15 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El pellet fue lavado con 250 μL de etanol 70% y se volvió a centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente, repitiendo dos veces este paso de lavado. Se descartó el sobrenadante y posteriormente se dejó secar el pellet bajo flujo laminar durante 4 h. Finalmente, se resuspendió en 50 μL de buffer TE (10 mM Tris pH 8 + 1 mM EDTA pH 8) y se guardó en freezer a -20 °C.

2.2.5.2 Reacciones de amplificación mediante PCR

La amplificación de la región ITS-ADNr de los aislados de *S. sclerotiorum* se realizó con los cebadores ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') como describen White *et al.* (1990). La amplificación por

PCR se realizó en un volumen final de 50 μ L que contenía 12-15 ng de ADN genómico, buffer de reacción 1X [100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 500 mM KCl, 1% Triton® X-100], 0,1 μ M de cada cebador (Genbiotech SRL Buenos Aires, Argentina), 200 μ M de cada dNTP, 3,0 mM de Cl₂Mg y 1,0 unidad de *Taq* ADN polimerasa (Highway-Inbio, Tandil, Argentina). Las amplificaciones de ADN se realizaron usando un termociclador Eppendorf Master Cycler Gradient (Hamburgo, Alemania) programado con una etapa de desnaturación inicial a 94 °C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 15 s, 58 °C durante 15 s y 72 °C durante 15 s, y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Una alícuota de 10 μ L del producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) a 90 V en buffer TBE 1X durante 1 h a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron con GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, EE. UU.). Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador de luz U.V. (UVP Model M-20, INC. Upland, EEUU). El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de ADN de 100 a 1000 pb (pares de bases) (Highway-Inbio, Tandil, Argentina). Los fragmentos se purificaron y se sometieron a secuenciación en ambas direcciones usando los cebadores ITS1 e ITS4 en el secuenciador 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) en el Instituto de Biotecnología del INTA-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Castelar, Buenos Aires, Argentina). Los fragmentos secuenciados fueron alineados usando Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) y se ajustaron manualmente con BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999). Los aislados fueron identificados mediante la utilización de la herramienta de búsqueda BLAST de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias se enviaron al GenBank en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y se obtuvieron los números de acceso.

2.2.5.3 Amplificación de ADN empleando marcadores URP

El ADN de los 116 aislados se amplificó utilizando 11 cebadores de URP como describen Kang *et al.* (2002). Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 μ L que contenía 50-100 ng de ADN molde, 1X tampón de reacción (Tris-HCl 100 mM [pH 9], KCl 500 mM, Triton® X-100 al 1%), 0,1 μ M de cada cebador (Genbiotech SRL Buenos Aires, Argentina), 200 μ M de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂ y 1,25 unidades de ADN polimerasa Taq (Highway-Inbio, Tandil, Argentina). El programa de amplificación comenzó con una etapa de desnaturación inicial a 94 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 1 min, hibridación durante 1 min a 55 °C, extensión a 72 °C durante 2 min y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis como se describió anteriormente. Cada reacción se repitió al menos dos veces.

2.2.6 Análisis de los datos

2.2.6.1 Técnicas de análisis multivariado

Para el análisis de los datos se aplicaron técnicas de análisis multivariado (Sneath & Sokal, 1973) mediante el programa NTSYS-PC ver. 2.0 (Rohlf, 1998).

2.2.6.1.1 Construcción de la matriz básica de datos

En primer lugar, se definieron las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) como los aislados de *S. sclerotiorum* pertenecientes a las distintas localidades. En segundo lugar, se definieron los caracteres. Carácter se define como cualquier propiedad que varía entre las OTUs. Los posibles valores que ese carácter pueda presentar se los considera sus estados (Sneath & Sokal, 1973) y describirán las OTUs.

A partir de lo observado en las amplificaciones con los cebadores URP de todos los aislados se construyó la matriz básica de datos (MBD). Esta es una matriz **n** x **t** donde las **n** filas representan las bandas URP (caracteres) y las **t** columnas representan los genotipos de *S. sclerotiorum* (OTUs) (Sneath & Sokal, 1973).

Los datos de la MBD son datos de tipo binario o doble estado. Para cada cebador se consideró presencia (1) y ausencia (0) de bandas.

2.2.6.1.2 Construcción de la matriz de similitud

A partir de los datos de la MBD, se cuantificó la similitud entre los genotipos y se construyó una matriz de similitud entre los distintos OTUs aplicando el coeficiente de asociación de Dice (Dice, 1945; Nei & Li, 1979). Este coeficiente mide las coincidencias y diferencias entre los estados de los caracteres de ambos genotipos (Legendre & Legendre, 1983), confiriéndole mayor peso a las coincidencias.

El coeficiente de Dice se expresa de la siguiente manera: $S_{ij} = 2a/(2a+b+c)$ (Dice, 1945; Nei & Li, 1979), donde S_{ij} es la similitud entre dos individuos, i y j ; a es el número de bandas presentes en ambos i y j ; b es el número de bandas presentes en i y ausentes en j ; c es el número de bandas presentes en j y ausentes en i , y d es el número de bandas ausentes en ambos. Los valores de similitud oscilan entre 1 y 0, que equivalen a la máxima y mínima similitud, respectivamente.

Las matrices de similitud se generaron utilizando el módulo SimQual del programa NTSYS-PC ver.2.0 (Rohlf, 1998).

2.2.6.1.3 Análisis de agrupamientos

A fin de permitir el reconocimiento de las relaciones entre la totalidad de las OTU, se analizó la matriz de similitud con la técnica de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*). En cada etapa del proceso de agrupamiento se obtiene una matriz

derivada. En dicha matriz, el valor de similitud de la unidad a incorporarse a un grupo o núcleo es igual al promedio de los valores de similitud entre la unidad y cada uno de los integrantes del núcleo, retornando en cada paso a la matriz de similitud original (Crisci & López Armengol, 1983).

La estructura obtenida a través del análisis de agrupamiento se representó gráficamente mediante un dendrograma que muestra la relación de similitud entre las OTUs. Para evaluar la medida en que el dendrograma representa los valores de la matriz de similitud, se obtuvo el coeficiente de correlación cofenética (CCC). Para ello se construyó, a partir de la matriz del dendrograma obtenida con el programa SAHN-clustering de NTSYS-pc ver. 2.0, una nueva matriz simétrica conocida como matriz cofenética (Rohlf & Sokal, 1981), mediante el programa COPH de NTSYS-pc ver. 2.0 (Rohlf, 1998). Posteriormente se empleó el programa MXCOMP de NTSYS-pc ver. 2.0 para calcular la correlación cofenética existente entre la matriz de valores cofenéticos y la correspondiente matriz de similitudes, mediante el coeficiente de correlación momento-producto (r) y la prueba de Mantel (estadístico Z), que sirven para medir el grado de relación que existe entre las matrices comparadas (Mantel, 1967). Generalmente los valores obtenidos oscilan entre 0,6 y 0,95, de modo que valores superiores a 0,8 indican una escasa distorsión o una buena representación de la matriz de similitud por parte del dendrograma (Sneath & Sokal, 1973).

[*2.2.6.1.4 Análisis de Coordenadas Principales \(ACoP\)*](#)

El Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) es un método de ordenación que permite analizar una matriz de asociación Q (matriz que describe las relaciones entre los objetos, OTU x OTU) dentro de un espacio euclíadiano, situando a los objetos dentro de una dimensión reducida, preservando bien las relaciones de distancia entre ellos (Gower, 1966). El ACoP define un nuevo conjunto de ejes ortogonales (independientes entre sí) que son función de las variables originales. Las nuevas variables se denominan Coordenadas Principales y son combinaciones lineales de las variables originales que tienen independencia y no están correlacionadas, sintetizando la máxima variabilidad contenida en los datos. Este análisis sitúa a los individuos en un espacio factorial reducido, preservando entre ellos las relaciones de distancia descriptas por la medida de similitud. Así, la representación de estos objetos dentro del espacio de las primeras coordenadas principales es la mejor aproximación posible de estas distancias dentro del espacio reducido (Legendre & Legendre, 1998). El primer eje es el más importante. El agrupamiento de las OTU determinado por este eje es el que concentra la mayor variación.

En términos generales la técnica se basa en la representación gráfica de los genotipos en un espacio multidimensional donde todos los caracteres contribuyen de manera diferencial a todos los ejes.

En primer lugar, se realizaron las comparaciones por pares usando el coeficiente de similitud de Dice (Sneath & Sokal, 1973). Utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014), se realizó el ACoP para resolver los patrones de variación entre y dentro de las ubicaciones.

2.2.6.2 Análisis de la varianza molecular

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) se utilizó para medir la estructura genética basada en la correlación entre haplotipos. En este estudio, se analizó la variabilidad entre individuos de diferentes localidades y dentro de localidades. Para establecer el nivel de significancia de los componentes de la varianza se obtuvo el estadístico Φ (similar al estadístico F) mediante permutaciones al azar. La probabilidad de obtener por azar un estadístico mayor que el observado se toma como el nivel de significancia estadística.

Para analizar la diferenciación genética de las poblaciones se utilizó el estadístico F_{ST} que representa la correlación de los alelos elegidos al azar dentro de una población en relación con toda la población. Toma valores desde 0 hasta 1, donde un valor de 0 implica panmixia total y un valor de 1 implica que las dos poblaciones están genéticamente aisladas por completo. La diferenciación genética se estimó entre cada par de poblaciones utilizando el F_{ST} de Wright como describen Weir & Cockerham (1984), empleando 1023 permutaciones en el programa Arlequín 3.5.2.2. (Excoffier *et al.*, 2005).

2.2.6.3 Estimación indirecta del flujo génico

El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe un elevado flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente.

Los métodos indirectos para estimar el flujo de genes se basan en el análisis de las frecuencias de los alelos en las poblaciones. La distribución de las frecuencias genéticas depende de los efectos del flujo de genes promediados a lo largo del tiempo.

El flujo génico por pares (M) se estimó para todas las poblaciones en base a los valores de F_{ST} (McDermott & McDonald, 1993). Se calculó de la siguiente manera, en base a la relación simple en el equilibrio entre la migración y la deriva:

$$F_{ST} = 1/(2M + 1)$$

Por lo tanto, M , que es el número absoluto de migrantes intercambiados entre las dos poblaciones, se puede estimar por

$$M = 1 - F_{ST}/2F_{ST}$$

Si uno fuera a considerar que las dos poblaciones solo intercambian entre sí y no con otras poblaciones, entonces se debe dividir la cantidad M por un factor 2 para obtener un estimador $M' = N_m$ para poblaciones haploides.

En general, si $N_m < 1$, existe diferenciación local de las poblaciones, y si $N_m > 1$, hay poca diferenciación entre las poblaciones.

2.2.6.4 Análisis de correlación

Para determinar si existe correlación entre las matrices de MCG, URP y distancias geográficas entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales se realizó el test estadístico de Mantel (Mantel, 1967), utilizando la función MXCOMP del programa NTSYS-pc 2.0 (Rohlf, 1998).

2.2.7 Ensayo de patogenicidad

La variabilidad patogénica de los aislados se determinó utilizando el método conocido como “Straw test” propuesto por Petzoldt y Dickson (1996) con modificaciones (Terán *et al.*, 2006).

Se sembraron 3 semillas de poroto negro (cv. Leales 24 INTA) en macetas de 15 cm de diámetro y se mantuvieron en invernadero a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (día) y $18 \pm 2^\circ\text{C}$ (noche) con un fotoperíodo de 12 h. Aproximadamente 30 días después de la siembra, el tallo principal se cortó por encima del cuarto nudo, dejando intacto un entrenudo de 3 cm (Terán *et al.*, 2006). A partir de un cultivo del hongo de 48 h de crecimiento en APG, se tomaron dos discos de micelio con un tip Eppendorf de 200 μl previamente esterilizado. Inmediatamente, se colocó el tip sobre el tallo cortado con la cara micelial del disco hacia abajo, de modo que el tallo cortado y el hongo queden en contacto. Como controles se utilizaron plantas inoculadas con discos puros de APG sin el patógeno. Las plantas inoculadas se incubaron en una cámara de crecimiento durante 8 días con humidificadores para mantener la humedad en valores iguales o superiores al 80%. La agresividad de la enfermedad se evaluó midiendo la longitud de infección (LI) en el tallo principal.

Se realizó un diseño en bloques completos al azar con tres repeticiones por aislado. Una repetición consistió en tres plantas por maceta.

Para el análisis de los datos se realizó el análisis de la varianza y las medias se compararon mediante la prueba de DGC ($P = 0,05$) utilizando el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014).



Figura 19. Etapas del ensayo de patogenicidad utilizando el método *Straw Test*. A) Crecimiento de las plantas de poroto en invernadero. B) Inoculación con discos de micelio en los tips Eppendorf, sobre el tallo cortado. C) Cámara de crecimiento con las plantas de poroto inoculadas e incubadas en condiciones controladas de temperatura y humedad.

2.3 RESULTADOS

En total se obtuvieron 177 aislados de 13 lotes comerciales de poroto (blanco, negro y colorado) muestreados en las principales zonas productoras de las provincias de Salta y Jujuy (Figura 16). En algunos lotes muestreados, la incidencia y severidad de la enfermedad fueron bajas, por lo cual se seleccionaron los lotes donde se observó mayor incidencia (Lotes 1, 2, 5, 6, 9 y 14). De estos lotes, se eligieron entre 15 y 25 aislados por lote para la realización de todos los análisis, resultando un total de 116 aislados (Tabla 2). La ubicación geográfica de los lotes seleccionados se puede observar en la Figura 20. En adelante se hará referencia a la localidad muestreada, sin mencionar el número de lote al que corresponde. El total de los aislados recolectados forman parte del cepario del Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Estación Experimental Agropecuaria de INTA Salta (EEA INTA Salta).

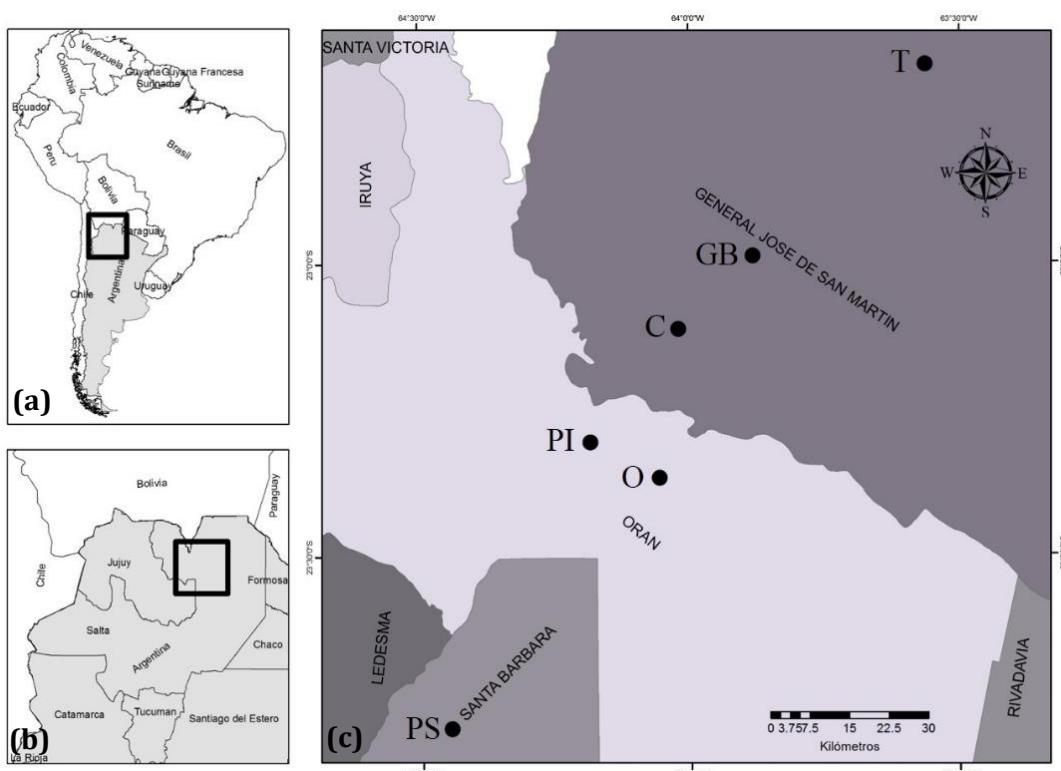


Figura 20. Mapas que muestran las ubicaciones de los sitios de recolección de *S. sclerotiorum* en el norte de Argentina. (a) Mapa de Sudamérica que destaca la ubicación del norte de Argentina (b) Mapa del norte de Argentina que muestra la zona de muestreo. (c) Los círculos representan la ubicación de los sitios muestreados: PS (Palma Sola), O (Orán), PI (Pichanal), C (Campichuelo), GB (General Ballivián) y T (Tartagal).

Tabla 2. Lotes analizados, localidad, número y hospedante de los aislados de *S. sclerotiorum* de las principales zonas de producción de poroto del NOA.

Lote	Provincia	Localidad	Nº de aislados	Hospedante
LOTE 1	Salta	Orán	21	Poroto negro
LOTE 2	Salta	Pichanal	14	Poroto negro
LOTE 5	Salta	Campichuelo	14	Poroto negro
LOTE 6	Jujuy	Palma Sola	15	Poroto blanco
LOTE 9	Salta	Gral. Ballivián	26	Poroto blanco
LOTE 14	Salta	Tartagal	26	Poroto blanco

2.3.1 Caracterización morfológica

Entre los 116 aislados analizados, el color del micelio observado fue blanco (71,6%), beige (25%) y marrón (3,4%) (Figura 21). Con respecto a los patrones de formación de esclerocitos (Figura 21), se observó que el 54% de los aislados mostró un patrón de esclerocitos periféricos, mientras que el 27,6% mostró esclerocitos periféricos centrales y el 18,1% produjo un patrón de esclerocitos centrales (Tabla 3). Se encontraron diferencias significativas en el número promedio de esclerocitos por placa entre todos los aislados, entre y dentro de las diferentes localidades ($P < 0,001$).

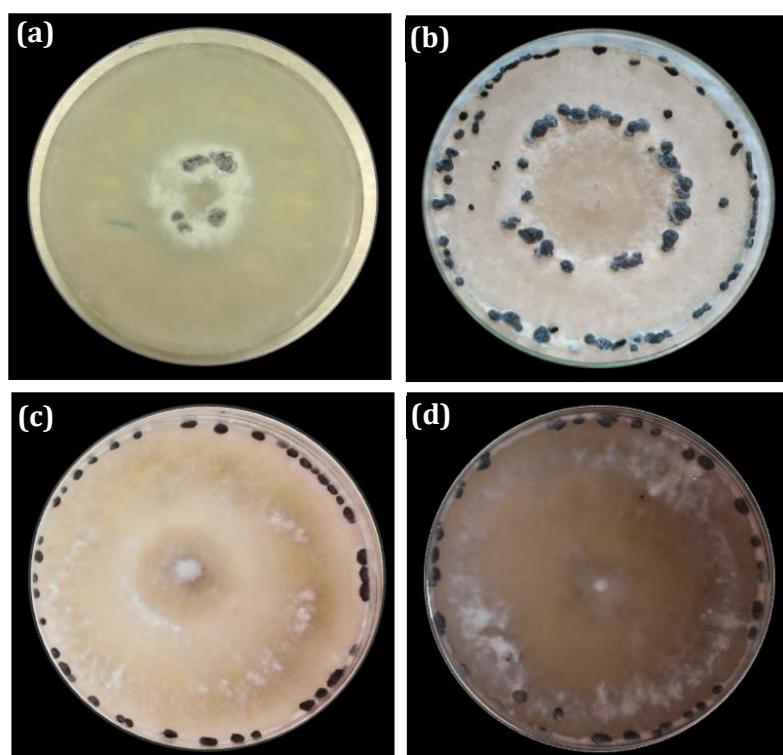


Figura 21. Variación en el color de micelio y patrones diferentes de distribución de esclerocitos en placas con APG de aislados de *S. sclerotiorum* luego de 15 días de incubación a $20 \pm 22^{\circ}\text{C}$. a) Micelio de color blanco y patrón de esclerocio central. b) Micelio de color blanco y patrón de esclerocitos central-periférico. c) Micelio de color beige y patrón de esclerocitos periféricos. d) Micelio de color marrón y patrón de esclerocitos periféricos.

Tabla 3. Caracterización morfológica de los aislados de *S. sclerotiorum*, indicando nombre de identificación, localidad y provincia donde fue recolectado, color de micelio, distribución y número de esclerocios por placa.

Aislado	Localidad/ Provincia	Color de micelio	Distribución de esclerocios	Número de esclerocios (p/placa)
SS1	Orán, Salta	blanco	central	17,67
SS2	Orán, Salta	blanco	periférico	12,33
SS3	Orán, Salta	blanco	periférico	21,33
SS4	Orán, Salta	blanco	periférico	8,67
SS5	Orán, Salta	blanco	periférico	14,33
SS6	Orán, Salta	beige	central	22,33
SS7	Orán, Salta	blanco	periférico	14,33
SS8	Orán, Salta	blanco	periférico/central	6,67
SS9	Orán, Salta	blanco	periférico	19,67
SS10	Orán, Salta	blanco	periférico	18,33
SS11	Orán, Salta	blanco	periférico	18,00
SS12	Orán, Salta	blanco	periférico	27,33
SS13	Orán, Salta	blanco	periférico	11,33
SS14	Orán, Salta	blanco	periférico	11,67
SS15	Orán, Salta	blanco	periférico	12,00
SS16	Orán, Salta	blanco	periférico	10,67
SS17	Orán, Salta	blanco	periférico/central	14,67
SS18	Orán, Salta	blanco	periférico	12,67
SS19	Orán, Salta	blanco	periférico/central	4,00
SS20	Orán, Salta	blanco	periférico/central	32,67
SS21	Orán, Salta	blanco	periférico/central	18,33
SS22	Campichuelo, Salta	blanco	periférico	13,67
SS23	Campichuelo, Salta	blanco	periférico	19,00
SS24	Campichuelo, Salta	blanco	periférico/central	7,00
SS25	Campichuelo, Salta	beige	periférico	13,33
SS26	Campichuelo, Salta	blanco	periférico	16,67
SS27	Campichuelo, Salta	beige	periférico	20,67
SS28	Campichuelo, Salta	blanco	periférico	30,00
SS29	Campichuelo, Salta	blanco	periférico	28,67
SS30	Campichuelo, Salta	marrón	periférico	14,00
SS31	Campichuelo, Salta	marrón	periférico/central	17,67
SS32	Campichuelo, Salta	blanco	periférico	4,67
SS33	Campichuelo, Salta	blanco	periférico	29,67
SS34	Campichuelo, Salta	blanco	periférico	13,33
SS35	Campichuelo, Salta	blanco	periférico/central	22,67
SS37	Pichanal, Salta	blanco	periférico	22,33
SS38	Pichanal, Salta	beige	central	25,33
SS39	Pichanal, Salta	beige	periférico	25,00
SS40	Pichanal, Salta	blanco	periférico/central	14,67
SS41	Pichanal, Salta	beige	periférico	21,67
SS42	Pichanal, Salta	blanco	periférico	10,33
SS43	Pichanal, Salta	beige	periférico	34,33
SS44	Pichanal, Salta	blanco	periférico	24,67
SS45	Pichanal, Salta	beige	periférico	15,33
SS46	Pichanal, Salta	blanco	central	7,67

Tabla 3. (Continuación).

Aislado	Localidad/ Provincia	Color de micelio	Distribución de esclerocios	Número de esclerocios (p/placa)
SS47	Pichanal, Salta	blanco	periférico	27,33
SS48	Pichanal, Salta	blanco	central	13,67
SS49	Pichanal, Salta	beige	periférico	17,67
SS50	Pichanal, Salta	blanco	periférico/central	14,67
SS51	Palma Sola, Jujuy	blanco	periférico/central	21,00
SS52	Palma Sola, Jujuy	blanco	periférico/central	14,00
SS53	Palma Sola, Jujuy	blanco	periférico/central	12,33
SS54	Palma Sola, Jujuy	blanco	central	5,33
SS55	Palma Sola, Jujuy	blanco	periférico	12,00
SS56	Palma Sola, Jujuy	blanco	periférico	23,67
SS57	Palma Sola, Jujuy	blanco	periférico/central	12,33
SS58	Palma Sola, Jujuy	blanco	periférico	19,67
SS59	Palma Sola, Jujuy	blanco	central	28,33
SS60	Palma Sola, Jujuy	blanco	central	4,33
SS61	Palma Sola, Jujuy	blanco	periférico	8,33
SS62	Palma Sola, Jujuy	beige	periférico	16,33
SS63	Palma Sola, Jujuy	blanco	periférico/central	14,67
SS64	Palma Sola, Jujuy	blanco	periférico	32,67
SS65	Palma Sola, Jujuy	beige	periférico	15,67
SS87	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico/central	14,67
SS89	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico/central	19,33
SS90	Gral. Ballivián, Salta	beige	periférico/central	39,33
SS93	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico/central	16,67
SS95	Gral. Ballivián, Salta	marrón	periférico/central	30,33
SS97	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico/central	20,67
SS99	Gral. Ballivián, Salta	blanco	central	15,67
SS100	Gral. Ballivián, Salta	beige	periférico/central	24,00
SS101	Gral. Ballivián, Salta	beige	periférico/central	10,67
SS102	Gral. Ballivián, Salta	beige	periférico	25,00
SS103	Gral. Ballivián, Salta	beige	central	12,67
SS104	Gral. Ballivián, Salta	beige	periférico	27,67
SS105	Gral. Ballivián, Salta	beige	central	14,00
SS106	Gral. Ballivián, Salta	beige	periférico	26,00
SS107	Gral. Ballivián, Salta	beige	periférico	20,33
SS109	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico	14,33
SS110	Gral. Ballivián, Salta	blanco	central	19,67
SS111	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico	21,67
SS112	Gral. Ballivián, Salta	blanco	central	28,00
SS113	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico	13,67
SS114	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico	22,67
SS115	Gral. Ballivián, Salta	blanco	central	13,00
SS116	Gral. Ballivián, Salta	beige	periférico	31,67
SS117	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico	15,00
SS118	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico/central	14,67
SS122	Gral. Ballivián, Salta	blanco	periférico	23,67
SS142	Tartagal, Salta	blanco	periférico	21,67

Tabla 3. (Continuación).

Aislado	Localidad/ Provincia	Color de micelio	Distribución de esclerocios	Número de esclerocios (p/placa)
SS143	Tartagal, Salta	beige	periférico/central	25,33
SS144	Tartagal, Salta	beige	periférico/central	28,67
SS145	Tartagal, Salta	beige	periférico	32,33
SS146	Tartagal, Salta	blanco	central	33,00
SS149	Tartagal, Salta	blanco	periférico/central	26,00
SS150	Tartagal, Salta	marrón	periférico	26,00
SS151	Tartagal, Salta	blanco	central	24,00
SS152	Tartagal, Salta	blanco	periférico	16,67
SS154	Tartagal, Salta	blanco	central	19,33
SS155	Tartagal, Salta	blanco	central	24,33
SS156	Tartagal, Salta	beige	periférico/central	27,33
SS157	Tartagal, Salta	beige	periférico	31,33
SS158	Tartagal, Salta	blanco	periférico	24,67
SS160	Tartagal, Salta	blanco	central	25,00
SS164	Tartagal, Salta	beige	periférico	24,33
SS165	Tartagal, Salta	blanco	central	13,67
SS168	Tartagal, Salta	blanco	periférico/central	15,33
SS169	Tartagal, Salta	blanco	periférico	32,00
SS170	Tartagal, Salta	beige	periférico	23,00
SS171	Tartagal, Salta	blanco	periférico/central	15,67
SS172	Tartagal, Salta	blanco	periférico/central	29,67
SS173	Tartagal, Salta	beige	periférico	24,67
SS174	Tartagal, Salta	blanco	periférico	13,00
SS175	Tartagal, Salta	blanco	periférico/central	26,67
SS176	Tartagal, Salta	blanco	central	15,33

2.3.2 Grupos de compatibilidad micelial

Entre los 116 aislados de *S. sclerotiorum* se identificaron 52 MCG. Todos los aislados fueron auto-compatibles, lo que se evidenció por un micelio continuo entre colonias emparentadas. El número de aislados dentro de cada MCG varió de 1 a 18 (Figura 22). Diecinueve de los MCG identificados consistieron en dos o más aislados, e incluyeron 83 (72%) de los aislados analizados, mientras que los 33 MCG restantes fueron únicos, es decir un MCG representado por un solo aislado observado en una sola localidad (Figura 22). La fracción clonal, que describe la proporción de aislados originados en la reproducción asexual fue del 55,2 %.

Se observó una importante incompatibilidad micelial entre los campos o lotes ya que todos los MCG observados fueron intransitivos, es decir no se compartió ningún MCG entre los campos evaluados. Además, se observó una alta incompatibilidad dentro de los campos, con un rango de tres a 20 MCG por campo, a excepción de Orán, que tuvo la mayoría de los aislados compatibles (Tabla 4).

El índice de diversidad de Shannon (H_o) de todos los MCG evaluados fue de 0,248 (H_{tot}), y varió de 0,100 para Campichuelo a 0,301 para Tartagal (Tabla 4), con una media de 0,196 (H_{pop}). La partición de la diversidad total (H_{tot}) mostró que el 79,2% correspondió a la variación de diversidad dentro de las poblaciones de *S. sclerotiorum*, mientras que sólo el 20,8% de la diversidad fue responsable de la variabilidad entre las poblaciones. Los lugares más diversos fueron Gral. Ballivián y Tartagal.

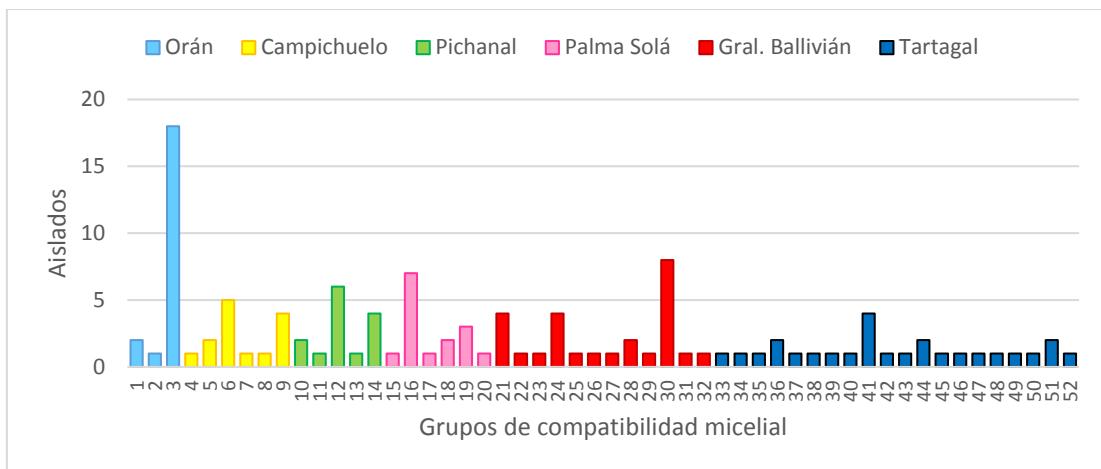


Figura 22. Histogramas de las frecuencias de los grupos de compatibilidad micelial entre los 116 aislados de *S. sclerotiorum*.

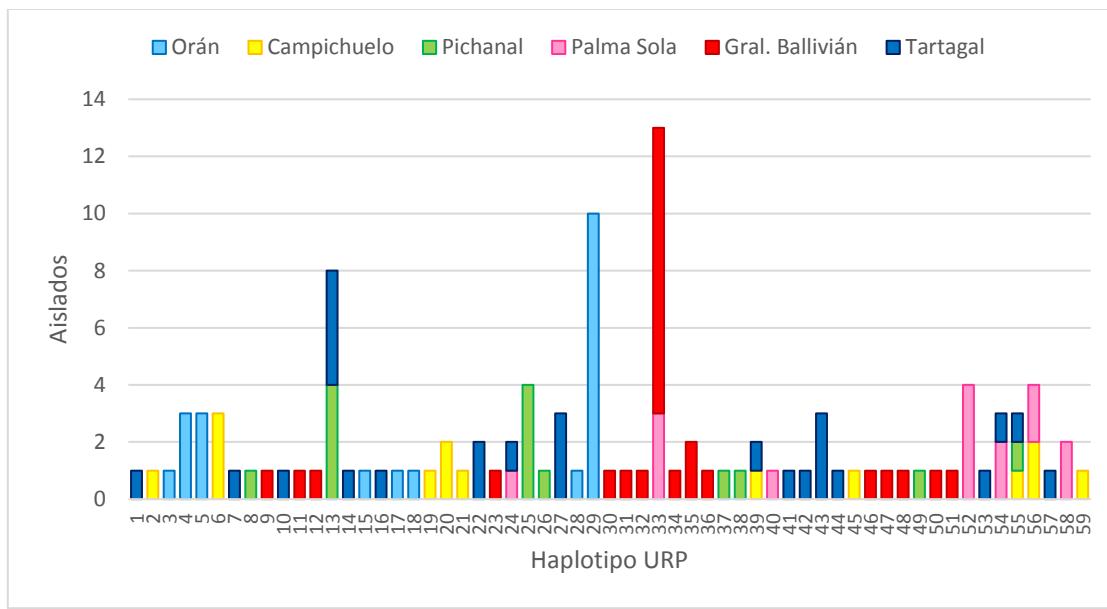


Figura 23. Histogramas de las frecuencias de 59 haplotipos URP entre 116 aislados de *S. sclerotiorum*.

Tabla 4. Grupos de compatibilidad micelial (MCG) y diversidad de MCG (H_o) de las poblaciones de *S. sclerotiorum* de las diferentes localidades muestreadas.

Localidad	MCGs	Muestras	H_o^a	H_{pop}^b	H_{pop}/H_{tot}^c	$(H_{tot}-H_{pop})/H_{tot}^d$
Orán	1, 2, 3	21	0,131			
Campichuelo	4, 5, 6, 7, 8, 9	14	0,168			
Pichanal	10, 11, 12, 13, 14	14	0,100			
Palma Sola	15, 16, 17, 18, 19, 20	15	0,227			
Gral. Ballivián	21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32	26	0,250			
Tartagal	33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52	26	0,301			
Total		116	0,248	0,196	0,792	0,208

^a H_o , Diversidad de MCG normalizada.^b H_{pop} , promedio de H_o .^c H_{pop}/H_{tot} , proporción de la diversidad total de MCG atribuidas a las variaciones entre individuos dentro de una población.^d $(H_{tot}-H_{pop})/H_{tot}$, proporción de la diversidad total de MCG atribuida a diferencias entre poblaciones.

2.3.3 Caracterización molecular

2.3.3.1 Identificación molecular de *S. sclerotiorum*

La amplificación de la región ITS produjo un único fragmento de ADN de 540 pb aproximadamente con un tamaño uniforme entre todos los aislados analizados. Del total de aislados, se secuenció un grupo de 108 productos de PCR elegidos al azar, y las secuencias de ITS se depositaron en GenBank (MG516601-MG516708). Los aislados tuvieron un 100% de similitud en comparación con las secuencias de control de *S. sclerotiorum* disponibles en NCBI (JN012606.1, EF091807.1, AB233346.1, DQ329537.1).

2.3.3.2 Amplificación de ADN por URP-PCR

De los 11 cebadores URP evaluados, solo cinco (URP-2R, URP-6R, URP-9F, URP-17R, URP-38F) mostraron diferentes niveles de polimorfismo generando un total de 13 bandas polimórficas. Las bandas de ADN amplificado variaron de 290 a 2000 pb para cada aislado.

2.3.3.3 Diversidad genética

Se obtuvieron patrones únicos de bandas para el 51% de los aislados, con un total de 59 haplotipos identificados (Figura 23). De los 59 haplotipos, 40 (68%) fueron únicos, es decir que un haplotipo estuvo representado por un único aislado en una sola ubicación (Tabla 5). Los 19 haplotipos restantes (32%) incluyeron 76 aislados (66%), siete haplotipos de los

cuales se encontraron en al menos dos lugares (Tabla 5). El haplotipo 33 fue el más abundante, representado por 13 aislados de dos ubicaciones, Gral. Ballivián (10) y Palma Sola (3).

2.3.3.4 Análisis de agrupamiento

En base a los datos de los marcadores URP, los aislados de *S. sclerotiorum* se agruparon en 4 grupos (Figura 24). El 83% de los aislados se incluyeron en el grupo II con una similitud genética > 75% entre ellos. Dentro del grupo II se formaron dos subgrupos. En uno de los subgrupos se encontraron todos los aislados de Gral. Ballivián. Mientras que el otro subgrupo mostró una gran similitud genética entre diferentes aislados obtenidos de diferentes sitios. El grupo I incluyó seis aislados, tres de Orán y tres de Campichuelo y mostraron un 68% de similitud genética con el grupo II. El grupo III incluyó solo cuatro aislados de Orán. El grupo IV agrupó exclusivamente aislados obtenidos de Tartagal y presentó una similitud genética > 70% entre ellos. El coeficiente de similitud genética varió de 0,30 a 1,00. La bondad del ajuste del dendrograma UPGMA fue altamente significativa con un coeficiente de correlación cofenético (CCC) de 0,80.

2.3.3.5 Análisis de coordenadas

Algunos de los grupos generados por el análisis de agrupamiento basado en los datos URP fueron confirmados por el ACoP (Figura 25). Las dos primeras coordenadas principales explicaron el 38,8% de la variación acumulada. Se encontró una clara separación de los aislados de Gral. Ballivián y Tartagal en la primera coordenada principal. El 96% (25) de los aislados de Gral. Ballivián tendieron a tener valores más negativos a lo largo de la primera coordenada principal, mientras que el 31% (8) de los aislados de Tartagal mostraron valores positivos altos. Estos aislados se incluyeron en los grupos II y IV del dendrograma, respectivamente. Además, la mayoría de los aislados de Orán (91%) mostraron valores más positivos en la primera coordenada principal en comparación con los aislados de Campichuelo, Pichanal y Palma Sola. La fracción clonal fue 49,14%.

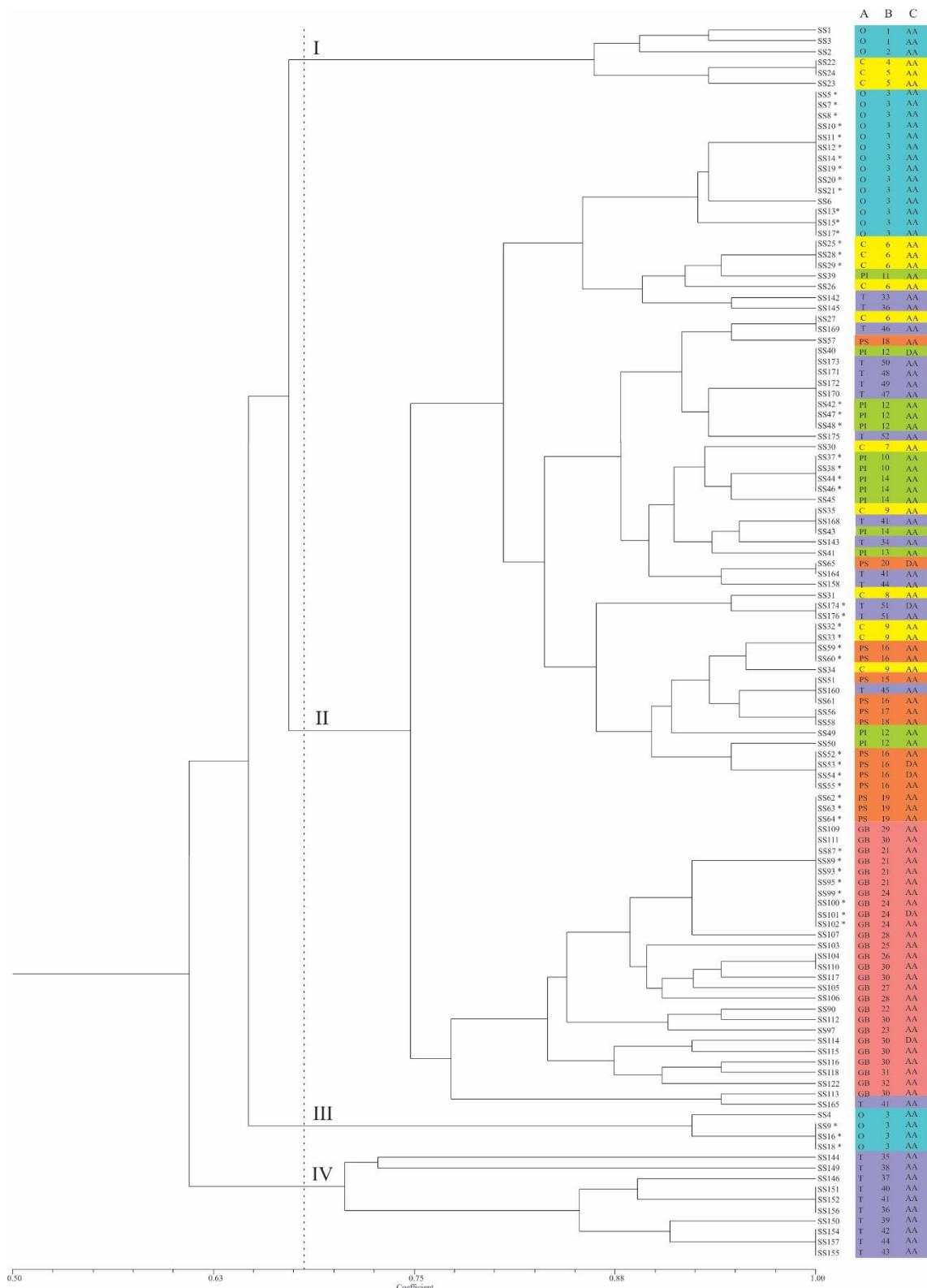


Figura 24. Árbol de UPGMA que muestra las relaciones genéticas entre los 116 aislados de *S. sclerotiorum* según los datos de los marcadores URP (coeficiente de Dice). A) Localidad: O, Orán (color celeste); C, Campichuelo (color amarillo); PI, Pichanal (color verde); PS, Palma Sola (color rojo); GB, Gral. Ballivián (color rosa); T, Tartagal (color azul). B) MCG. C) Agresividad: AA (altamente agresivo) y DA (débilmente agresivo).

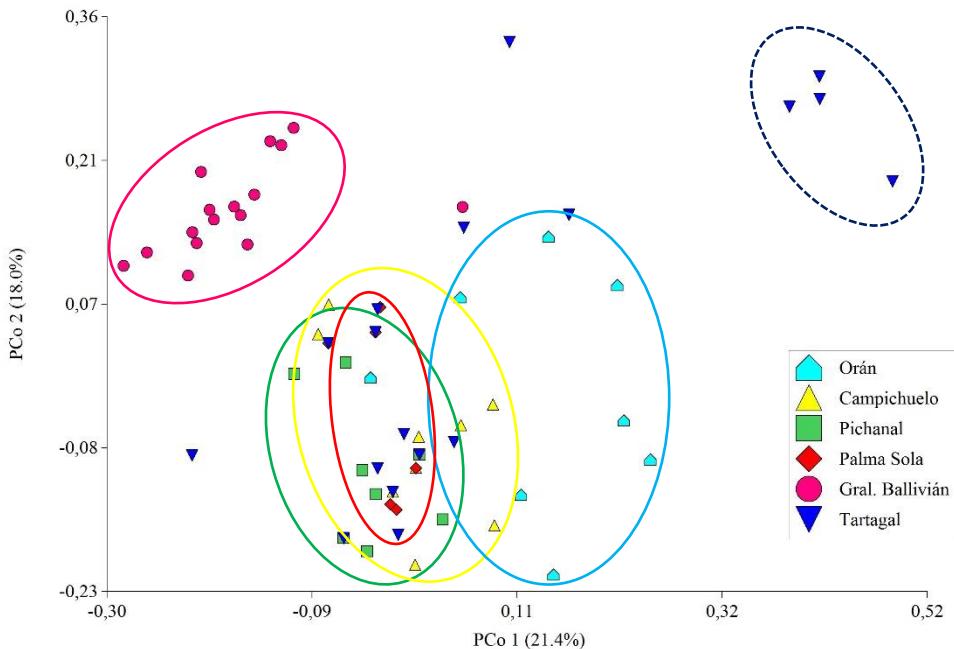


Figura 25. Análisis de coordenadas principales de 116 aislados de *S. sclerotiorum* del NOA en base a datos de marcadores URP. Los círculos marcan los grupos de aislados según los sitios de colecta.

Tabla 5. Designaciones de los haplotipos URP y frecuencias asociadas con el grupo de compatibilidad micelial (MCG) de los aislados de *S. sclerotiorum* de lotes comerciales de poroto en el noroeste de Argentina.

MCG	Frecuencia y designación de haplotipos URP ^a					
	Orán	Campichuelo	Pichanal	Palma Sola	Gral. Ballivián	Tartagal
1	17(1) ^a	18(1)				
2	15(1)					
3	3(1) 4(3) 5(3)					
	28(1) 29(10)					
4		20 ^b (1)				
5		19(1) 20(1)				
6		2(1) 6(3) 39(1)				
7		21(1)				
8		45(1)				
9		55(1) 56(2) 9(1)				
10			25(2)			
11			8(1)			
			13(4)			
12			37(1)			
			38(1)			
13			49(1)			
			25(2)			
14			26(1)			
			55(1)			
15				54(1)		
16				52(4) 54(1)		
				6(2)		
17					58 (1)	
18					40(1) 58(1)	

Tabla 5. (Continuación).

Frecuencia y designación de haplotipos URP ^a						
MCG	Orán	Campichuelo	Pichanal	Palma Sola	Gral. Ballivián	Tartagal
19				33(3)		
20				24(1)		
21					33(4)	
22					48(1)	
23					23(1)	
24					33(4)	
25					12(1)	
26					35(1)	
27					51(1)	
28					30(1) 32(1)	
29					33(1)	
					9(1) 31(1)	
30					33(1) 34(1)	
					35(1) 36(1)	
					46(1) 47(1)	
31					50(1)	
32					11(1)	
33						41(1)
34						57(1)
35						42(1)
36						7(1) 27(1)
37						1(1)
38						14(1)
39						16(1)
40						27(1)
41						24(1) 27(1)
						44(1) 55(1)
42						43(1)
43						43(1)
44						43(1) 53(1)
45						54(1)
46						39(1)
47						13(1)
48						13(1)
49						13(1)
50						13(1)
51						22(2)
52						10(1)
<i>n</i> ^c	21	14	14	15	26	26
<i>h</i> ^d	8	10	8	7	16	18
<i>I_A</i> ^e	0,792*	0,341	-0,120	-0,018	-0,070	0,703**
<i>r̄d</i> ^f	0,113*	0,049	-0,017	-0,003	-0,012	0,071**

^a La frecuencia de haplotipos URP es la cantidad de aislados muestreados con un único haplotipo que pertenece al MCG designado. Las frecuencias están entre paréntesis, por ejemplo, para el MCG 1 en Orán, un aislado tuvo el haplotipo 17 y otro aislado tuvo el haplotipo 18.

^b Los números en negrita indican cada uno de los 13 haplotipos asociados con más de un MCG, por ejemplo, el haplotipo 20 se asoció con MCG 4 y MCG 5.

^c Tamaño de la muestra.

^d Número total de haplotipos URP para cada localidad.

^e *I_A* = Índice de asociación para los datos con corrección clonal.

^f *r̄D* = Índice de asociación estandarizado de los datos con corrección clonal. Los asteriscos indican un valor significativo de *r̄d* después de 999 permutaciones *(*P* ≤ 0,01); **(*P* ≤ 0,001).

2.3.4 Análisis de la varianza molecular

El análisis de la varianza mostró una diferenciación significativa entre las poblaciones ($F_{ST} = 0,341; P < 0,0001$) con una variación significativa entre y dentro de las poblaciones (Tabla 6). El 66% de la variación genética total se asoció con diferencias dentro de las poblaciones, mientras que el 34% observado se debió a la variación entre poblaciones (Tabla 6). En base a los valores de F_{ST} en las comparaciones de a pares, las poblaciones fueron genéticamente distintas con valores que van desde un mínimo de 0,126 para una comparación de Campichuelo y Tartagal a un máximo de 0,557 para Orán y Gral. Ballivián ($P \leq 0,0001$) (Tabla 7). La única comparación que mostró un valor de F_{ST} no significativo ($P = 0,058$) fue entre las poblaciones de Pichanal y Campichuelo. En consecuencia, los valores más altos de flujo génico (N_m) se observaron entre las poblaciones de Pichanal y Campichuelo (Tabla 7). El valor de N_m fue bajo (<1) entre Gral. Ballivián y todas las demás poblaciones. Asimismo, se observaron valores bajos de N_m (<1) entre Orán y Pichanal, y entre Orán y Palma Sola (Tabla 7). En contraste, se observaron valores altos de N_m (> 1) para las otras comparaciones, lo que sugiere la existencia de un flujo de genes moderado. Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados obtenidos con el análisis de coordenadas principales.

Tabla 6. Análisis de la varianza molecular de los aislados de *S. sclerotiorum* de 6 localidades productoras de poroto del NOA basado en los datos de marcadores URP.

Fuente de variación	gl ^a	SC ^b	CM ^c	Var. Est. ^d	% Var. ^e	Φ_{ST}	P^f
Entre poblaciones	5	75,639	15,128	0,721	34%	0,32	< 0,0001
Dentro de poblaciones	110	153,439	1,395	1,395	66%		
Total	115	229,078		2,116	100%		

^a Grados de libertad. ^b Suma de cuadrados. ^c Cuadrado medio. ^d Varianza estimada.

^e Porcentaje total de varianza. ^f Valor de P basado en 999 permutaciones.

Tabla 7. Diferenciación poblacional medida por F_{ST} (diagonal inferior) y flujo de genes (N_m) (diagonal superior) entre 6 poblaciones de *S. sclerotiorum* en el noroeste Argentino basado en los datos de marcadores URP.

	O^a	PI	C	PS	GB	T
O	-	0,679	1,103	0,520	0,398	1,566
PI	0,424**	-	5,673	1,338	0,482	2,476
C	0,312**	0,081	-	2,217	0,649	3,468
PS	0,490**	0,272**	0,184**	-	0,696	1,674
GB	0,557**	0,509**	0,435**	0,418**	-	1,006
T	0,242**	0,168*	0,126*	0,230**	0,332**	-

^a Poblaciones: O: Orán, PI: Pichanal, C: Campichuelo, PS: Palma Sola, GB: Gral. Ballivián, T: Tartagal. Niveles significativos se basan en valores P determinados por 1023 permutaciones de los datos. Los valores calculados fueron significativamente diferentes de cero en $P \leq 0,05$ (*) y $P \leq 0,0001$ (**). El flujo de genes se estimó como $N_m = (1-Fst)/2Fst$ (McDermott y McDonald, 1993).

La prueba de Mantel se realizó para determinar la relación entre la variación genética medida por las matrices de distancia MCG y URP. La correlación fue significativa, aunque de baja magnitud ($r = 0,25; P < 0,0001$). La comparación entre ambas matrices y la distancia geográfica entre ubicaciones reveló una baja correlación (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de correlación entre grupos de compatibilidad micelial (MCG), haplotipos URP y distancia geográfica entre localidades (*r*: diagonal inferior; *P*: diagonal superior).

	MCG^a	URP^b	Distancia geográfica^c
MCG	-	0,001*** ^c	< 0,0001****
URP	0,25	-	0,014*
Distancia geográfica	0,27	0,13	-

^a Grupos de compatibilidad micelial. ^b Datos URP. Valores significativos en: **** $P \leq 0,0001$; *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$

2.3.5 Ensayo de patogenicidad

Todos los aislados analizados resultaron patogénicos para la variedad de poroto Leales 24 INTA y produjeron síntomas típicos de esclerotinia luego de ocho días de la inoculación. Las longitudes de infección entre los aislados fueron significativamente diferentes, con un rango de 4,64 cm a 16,19 cm y una media de 12,31 cm (Tabla 9). Como resultados de la prueba de

DGC, los aislados se agruparon en dos grupos: aislados débilmente agresivos (DA) y altamente agresivos (AA) (Figura 26).

El 93,8% de los aislados evaluados fueron AA y estuvieron presentes en todos los campos muestreados. Mientras que los siete aislados restantes fueron DA y se encontraron solamente en cuatro localidades: Gral. Ballivián (2), Palma Sola (3), Tartagal (1) y Pichanal (1). Por el contrario, en los campos de Orán y Campichuelo sólo se encontraron aislados AA (Tabla 9).

El aislado SS116 (recolectado en Gral. Ballivián) fue el de menor agresividad con 4,64 cm de longitud de infección. Por otro lado, el aislado SS8 (recolectado en Orán) fue el de mayor agresividad con una longitud de infección de 16,19 cm (Tabla 9).

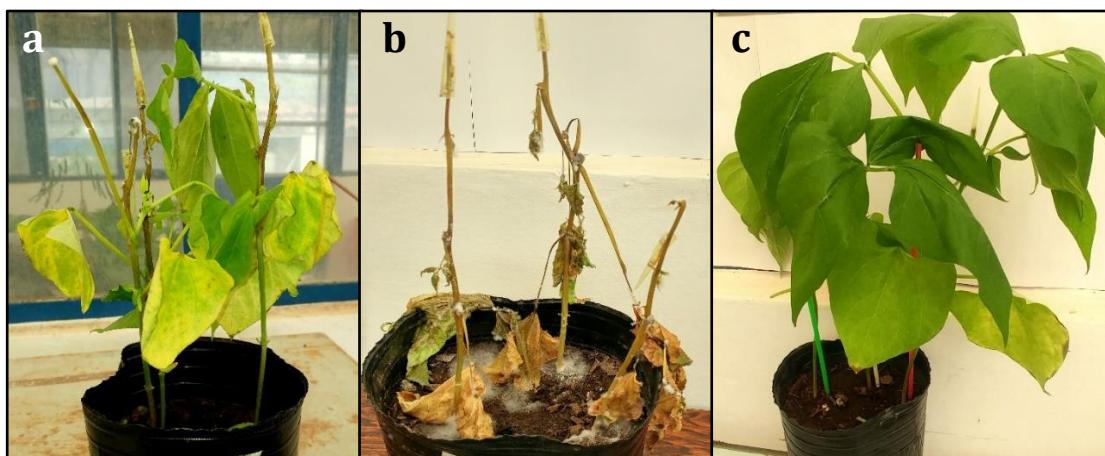


Figura 26. Plantas de poroto (Leales 24 INTA) luego de 21 días de ser inoculadas con aislados de *S. Sclerotiorum* de diferente agresividad: a) Débilmente agresivo. b) Altamente agresivo. c) Planta control.

Tabla 9. Grupos de compatibilidad micelial (MCG), longitud de infección (LI), agresividad (A) y haplotipos URP (H) de los 116 aislados de *S. Sclerotiorum*.

Aislado	MCG	LI (cm)	A	H	Aislado	MCG	LI (cm)	A	H
SS1	1	10,04	AA	18	SS60	16	13,19	AA	56
SS2	2	12,61	AA	15	SS61	16	10,03	AA	54
SS3	1	14,65	AA	17	SS62	19	14,73	AA	33
SS4	3	12,67	AA	3	SS63	19	14,52	AA	33
SS5	3	14,19	AA	29	SS64	19	13,91	AA	33
SS6	3	12,75	AA	28	SS65	20	8,71	DA	24
SS7	3	15,23	AA	29	SS87	21	14,42	AA	33
SS8	3	16,19	AA	29	SS89	21	12,00	AA	33
SS9	3	12,96	AA	4	SS90	22	13,08	AA	48
SS10	3	12,89	AA	29	SS93	21	12,00	AA	33
SS11	3	14,69	AA	29	SS95	21	13,19	AA	33
SS12	3	14,83	AA	29	SS97	23	14,07	AA	23
SS13	3	12,49	AA	5	SS99	24	14,20	AA	33
SS14	3	13,67	AA	29	SS100	24	13,31	AA	33
SS15	3	12,63	AA	5	SS101	24	7,59	DA	33
SS16	3	15,55	AA	4	SS102	24	13,04	AA	33
SS17	3	15,51	AA	5	SS103	25	9,31	AA	12
SS18	3	15,14	AA	4	SS104	26	10,55	AA	35
SS19	3	11,93	AA	29	SS105	27	12,15	AA	51
SS20	3	14,44	AA	29	SS106	28	11,10	AA	32
SS21	3	14,20	AA	29	SS107	28	11,54	AA	30
SS22	4	14,05	AA	20	SS109	29	13,82	AA	33
SS23	5	13,72	AA	19	SS110	30	11,25	AA	35
SS24	5	ND	ND	20	SS111	30	12,52	AA	33
SS25	6	14,29	AA	6	SS112	30	12,20	AA	47
SS26	6	12,06	AA	2	SS113	30	12,37	AA	46
SS27	6	10,27	AA	39	SS114	30	13,66	AA	9
SS28	6	11,81	AA	6	SS115	30	10,26	AA	31
SS29	6	12,92	AA	6	SS116	30	4,64	DA	34
SS30	7	11,51	AA	21	SS117	30	12,39	AA	36
SS31	8	11,87	AA	45	SS118	31	11,99	AA	50
SS32	9	10,50	AA	56	SS122	32	10,90	AA	11
SS33	9	12,21	AA	56	SS142	33	9,91	AA	41
SS34	9	13,17	AA	59	SS143	34	9,50	AA	57
SS35	9	12,27	AA	55	SS144	35	10,75	AA	42
SS37	10	13,11	AA	25	SS145	36	14,10	AA	7
SS38	10	12,33	AA	25	SS146	37	11,78	AA	1
SS39	11	13,95	AA	8	SS149	38	ND	ND	14
SS40	12	8,96	DA	13	SS150	39	12,57	AA	16
SS41	13	ND	ND	49	SS151	40	9,49	AA	27
SS42	12	11,95	AA	13	SS152	41	13,32	AA	27
SS43	14	12,34	AA	55	SS154	42	14,17	AA	43
SS44	14	12,85	AA	25	SS155	43	11,17	AA	43
SS45	14	15,44	AA	26	SS156	36	11,24	AA	27
SS46	14	14,12	AA	25	SS157	44	13,08	AA	43
SS47	12	14,55	AA	13	SS158	44	9,95	AA	53
SS48	12	14,70	AA	13	SS160	45	11,31	AA	54
SS49	12	16,12	AA	38	SS164	41	10,94	AA	24
SS50	12	12,68	AA	37	SS165	41	11,52	AA	44
SS51	15	14,10	AA	54	SS168	41	11,37	AA	55
SS52	16	ND	ND	52	SS169	46	12,08	AA	39
SS53	16	8,34	DA	52	SS170	47	10,27	AA	13
SS54	16	7,22	DA	52	SS171	48	11,35	AA	13
SS55	16	11,98	AA	52	SS172	49	12,61	AA	13
SS56	17	13,66	AA	58	SS173	50	9,75	AA	13
SS57	18	11,24	AA	40	SS174	51	5,75	DA	22
SS58	18	11,93	AA	58	SS175	52	12,95	AA	10
SS59	16	11,37	AA	56	SS176	51	12,17	AA	22

AA: Altamente agresivo. DA: débilmente agresivo. ND: No determinado

2.4 DISCUSIÓN

En el presente capítulo, se caracterizó la diversidad de los aislados de *S. sclerotiorum* de lotes comerciales de poroto ubicados en la principal área de producción de Argentina empleando caracteres morfológicos, marcadores moleculares y ensayos de patogenicidad. Los 116 aislados analizados se identificaron como *S. sclerotiorum* a través del análisis de secuencias ITS-ADNr y exhibieron una considerable variabilidad genotípica y morfológica.

Las poblaciones de *S. sclerotiorum* se diferenciaron significativamente según su origen geográfico en base a los haplotipos de URP compartidos y los MCG. En el total de los aislados analizados, se encontraron 52 MCG y 59 haplotipos moleculares, de los cuales 33 (63%) y 40 (68%) fueron únicos, respectivamente. Todos los MCG fueron específicos de cada sitio, mientras que sólo el 12% de los haplotipos URP se compartieron entre lotes. Ambas técnicas revelaron una mayor variabilidad genética *dentro* de las poblaciones analizadas que *entre* ellas. Estos hallazgos están de acuerdo con la variabilidad intra- e interpoblacional reportada para poblaciones de *S. sclerotiorum* presentes en campos de poroto en Brasil (Gomes *et al.*, 2011; Litholdo Junior & Gomes, 2011) y en campos de otros cultivos en Argentina, Irán y Australia (Durman *et al.*, 2003; Sexton & Howlett, 2004; Karimi *et al.*, 2012b).

En concordancia con lo anterior, los valores de F_{ST} observados entre las localidades también indicaron la existencia de una diferenciación poblacional significativa, con la excepción de las poblaciones de Pichanal y Campichuelo que no se diferenciaron entre sí. De las seis poblaciones de *S. sclerotiorum* analizadas, la población de Gral. Ballivián resultó ser la más diferenciada de todo el resto. Mientras que Tartagal y Campichuelo fueron las poblaciones que menos se diferenciaron entre sí en función de los valores de F_{ST} por pares. Estas observaciones también se apoyan en los resultados del análisis de agrupamientos y de coordenadas principales.

Por otro lado, teniendo en cuenta los haplotipos compartidos observados entre las poblaciones y los valores de N_m estimados, los resultados sugieren la existencia de un flujo génico moderado entre algunas localidades. La migración de genotipos (intercambio de haplotipos) entre los lotes y la reproducción sexual podrían estar involucrados en el mantenimiento de los altos niveles de MCG y la gran variabilidad de haplotipos observados. La existencia de migración de genotipos entre lotes puede ocurrir por la dispersión de inóculo fúngico, en forma de esclerocios o micelio, al transportar restos de la cosecha y suelo contaminado mediante la maquinaria agrícola (Abawi & Grogan, 1979). Una práctica común en la región, es mantener una parte de la producción para ser utilizada como semilla en la siguiente campaña de cultivo, lo que favorece la propagación del patógeno de un año a otro.

al utilizar semillas infectadas o esclerocios mezclados con las semillas. El comercio informal de semillas entre los agricultores locales también ocurre comúnmente en la región, generando un intercambio de semilla continuo sin certificación de calidad sanitaria. De este modo, la dispersión del patógeno por semillas contaminadas con micelio o esclerocios podría haber contribuido a la introducción de nuevos haplotipos de un campo hacia los otros. En esta región, el cultivo de poroto se realiza a secano, razón por la cual se descarta el factor del agua como una forma de diseminar inóculo. En las últimas campañas, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, fue posible observar en el suelo a los esclerocios germinados carpogénicamente, es decir con apotecios (comunicación personal de M. Chocobar). Por lo tanto, las ascosporas transportadas por el aire, que constituyen una fuente común de infección dentro de los campos, podrían ser un mecanismo para la dispersión de haplotipos entre las poblaciones a larga distancia (Abawi & Grogan, 1979).

El conocimiento de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de patógenos es importante para los programas de mejoramiento ya que las poblaciones con niveles altos de diversidad en las que tiene lugar el apareamiento aleatorio tienden a evolucionar más rápidamente aumentando la probabilidad de superar la resistencia del hospedante y/o de seleccionar individuos con resistencia a los fungicidas (McDonald & Linde, 2002; Carmona & Sautua, 2017). Existen estudios previos sobre la estructura poblacional de *S. sclerotiorum* en canola, girasol, repollo y otros cultivos que informan que las poblaciones son principalmente clonales (Anderson & Kohn, 1995; Cubeta *et al.*, 1997; Kohli & Kohn, 1998; Carpenter *et al.*, 1999; Hambleton *et al.*, 2002). Asimismo, existen reportes sobre la existencia de reproducción tanto clonal como sexual en poblaciones de *S. sclerotiorum* en canola, coliflor, colza, zanahoria, girasol, lechuga, arveja (Carpenter *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2005; Malvárez *et al.*, 2007).

Estudios previos han caracterizado la diversidad genotípica en poblaciones de *S. sclerotiorum* para evaluar la clonalidad por medio de MCG y marcadores moleculares (Carbone *et al.*, 1999; Sirjusingh & Kohn, 2001). Las poblaciones clonales se caracterizaron por tener MCG compartidos, encontrándose cada MCG asociado a un solo haplotipo molecular. Mientras que, en las poblaciones con reproducción sexual no se reportó asociación entre los MCG y los haplotipos moleculares (Cubeta *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2011). En el presente estudio, se observó diversidad entre los aislados recolectados en el mismo lote de cultivo basados en los estudios de MCG y haplotipos moleculares. Se reportaron 14 casos que se consideraron clones, ya que dos o más aislados pertenecían al mismo MCG y compartían el mismo haplotipo (Tabla 5). Estos casos se encontraron en las seis localidades estudiadas. Por el contrario, hubo otros 14 casos en los que un MCG se asoció con más de un haplotipo URP y 13 casos en los que un haplotipo se asoció con más

de un MCG, lo que sugiere la existencia de recombinación. Por otro lado, las fracciones clonales de los MCG y haplotipos moleculares fueron 55,17% y 49,14%, respectivamente. En estudios previos, las fracciones clonales variaron de 34,4% (Clarkson *et al.*, 2013) a 90,1% (Hambleton *et al.*, 2002), con un promedio de 53,6% en seis estudios (Kohli *et al.*, 1992; Hambleton *et al.*, 2002; Atallah *et al.*, 2004; Attanayake *et al.*, 2013; Aldrich-Wolfe *et al.*, 2015; Zancan *et al.*, 2015).

Los resultados generados en este estudio sugieren la ocurrencia de reproducción clonal y sexual en las poblaciones de *S. sclerotiorum* en los campos de poroto analizados en el noroeste de Argentina. Esto está de acuerdo con el predominio de la reproducción sexual en poblaciones tropicales y subtropicales de *S. sclerotiorum* reportado por otros autores (Cubeta *et al.*, 1997; Meinhartd *et al.*, 2002; Atallah *et al.*, 2004; Sexton *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2011; Litholdo Junior & Gomes, 2011). Sin embargo, sería necesario un estudio más exhaustivo empleando marcadores codominantes, como los microsatélites, para tener un mejor conocimiento de la estructura genética y el comportamiento reproductivo de las poblaciones y poder comparar los resultados con estudios realizados en otras partes del mundo (ver capítulo 3).

Los resultados también mostraron que la agresividad de los aislados de *S. sclerotiorum* no está relacionada con su ubicación geográfica ya que la mayoría de los aislados fueron altamente agresivos, y el nivel de agresividad de los aislados entre localidades no varió ampliamente. La falta de variación en la agresividad entre aislados de diferentes áreas geográficas se ha informado anteriormente (Cubeta *et al.*, 1997; Durman *et al.*, 2003; Kull *et al.*, 2004; Sexton & Howlett, 2004; Malvárez *et al.*, 2007). Por otro lado, no se observó asociación entre agresividad y MCG y/o haplotipos URP. Por el contrario, algunos aislados débilmente agresivos tuvieron haplotipos URP y MCG idénticos a otros aislados altamente agresivos, por ejemplo, SS174 y SS176, lo que sugiere que estos aislados tienen diferencias genéticas que no se reflejan en los estudios de compatibilidad micelial y marcadores URP.

La técnica basada en marcadores URP fue útil para el análisis poblacional de *S. sclerotiorum*, revelando un elevado polimorfismo entre los aislados analizados. Los resultados sugieren que, a pesar de la naturaleza dominante de estos marcadores moleculares, su utilización complementada con la técnica de compatibilidad micelial, resulta una herramienta útil para proporcionar información preliminar sobre la variabilidad genética y el comportamiento reproductivo de *S. sclerotiorum*, como se informó para otros patógenos (González *et al.*, 2012; Mann *et al.*, 2014).

El presente estudio proporciona, por primera vez, información sobre la variabilidad morfológica, molecular y patogénica de *S. sclerotiorum* asociado con esclerotinia en la

principal área de producción de poroto en Argentina. Los datos generados facilitaron la selección de aislados locales representativos para evaluar germoplasma perteneciente a la colección de trabajo del programa de mejoramiento del INTA EEA Salta para la identificación de genotipos resistente que podrán ser utilizados como posibles parentales en el mejoramiento del cultivo (ver capítulo 4).

CAPÍTULO III

Análisis de estructura poblacional y comportamiento reproductivo de *Sclerotinia sclerotiorum*

3.1 INTRODUCCIÓN

El análisis de la estructura genética de una población de patógenos de plantas en una región es clave para entender cómo los mecanismos subyacentes están involucrados en su historia evolutiva. Además, la comprensión de las relaciones genéticas y el modo de reproducción de las poblaciones de *S. sclerotiorum* es beneficioso para los mejoradores que buscan desarrollar nuevas variedades resistentes (Milgroom, 1996; McDonald & Linde, 2002). En particular, las poblaciones genéticamente diversas con altas tasas de reproducción sexual tienen un alto "potencial evolutivo" y, en consecuencia, mayor probabilidad de superar la resistencia del hospedante y de adaptarse a los productos químicos, como los fungicidas, debido a la mayor probabilidad de que los genes de resistencia estén presentes en la población (McDonald & Linde, 2002).

Los patógenos fúngicos pueden tener diferentes modos de reproducción: sexual, asexual o ambos. Cuando tienen lugar procesos tanto sexuales como asexuales, el patógeno tiene un modo de reproducción "mixto", como es el caso de *S. sclerotiorum* (McDonald & Linde, 2002). El hongo se reproduce asexualmente por medio de esclerocios o sexualmente por ascosporas procedentes de la fertilización cruzada (Amselem *et al.*, 2011). En los hongos haploides, como *S. sclerotiorum*, las implicancias genéticas de la autofecundación para la estructura genética de la población son equivalentes a las de la reproducción asexual (Milgroom, 1996; Taylor *et al.*, 1999). Por lo tanto, si la tasa de exogamia es baja la población de *S. sclerotiorum* tiende a ser predominantemente clonal (Anderson & Kohn, 1995).

En las últimas décadas, la estructura de la población de *S. sclerotiorum* ha sido ampliamente estudiada en diversos cultivos hospedantes y diferentes regiones del mundo. La mayoría de los estudios informaron que las poblaciones tienen una estructura predominantemente clonal con baja diversidad genética y un alto grado de fragmentación de la población en diferentes cultivos y en países como Alaska, Australia, Brasil, Canadá, China, Irán, Nueva Zelanda, Turquía, Reino Unido y Estados Unidos, utilizando huellas de ADN (*DNA fingerprinting*) (Kohn *et al.*, 1991; Cubeta *et al.*, 1997; Carbone *et al.*, 1999; Carpenter *et al.*, 1999; Carbone & Kohn, 2000; Hambleton *et al.*, 2002) y empleando microsatélites (Cubeta *et al.*, 1997; Kohli & Kohn, 1998; Sexton & Howlett, 2004; Sexton *et al.*, 2006; Mert-Türk *et al.*, 2007; Hemmati *et al.*, 2009; Ekins *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2011; Attanayake *et al.*, 2013; Clarkson *et al.*, 2013, 2017; Aldrich-Wolfe *et al.*, 2015; Lehner *et al.*, 2015b; Kamvar *et al.*, 2017). En estas poblaciones clonales la estructura poblacional típica posee uno o pocos clones que se encuentran con alta frecuencia, y el resto de los haplotipos aparece sólo una o pocas veces en la misma localidad y en algunos casos en un

área geográfica más amplia (Anderson & Kohn, 1995; Hambleton *et al.*, 2002; Clarkson *et al.*, 2013). Además, la distribución de la mayoría de los clones de *S. sclerotiorum* puede estar restringida geográficamente con poco o ningún intercambio de genotipos entre diferentes sitios en el mismo país, resultando en distintas poblaciones subdivididas genéticamente, como se identifican en Australia (Sexton & Howlett, 2004), Reino Unido (Clarkson *et al.*, 2013) y Estados Unidos (Malvárez *et al.*, 2007).

Sin embargo, en estudios previos también hubo evidencia de recombinación en poblaciones de *S. sclerotiorum* principalmente mediante la utilización de marcadores moleculares microsatélites (Atallah *et al.*, 2004; Sexton & Howlett, 2004; Malvárez *et al.*, 2007; Hemmati *et al.*, 2009; Attanayake *et al.*, 2014). La evidencia más directa de recombinación fue mediante observaciones de variabilidad entre ascosporas hermanas derivadas de un solo apotecio, las cuales pertenecían a más de un MCG (Atallah *et al.*, 2004; Malvárez *et al.*, 2007). Los procesos biológicos que conducen a este modo de reproducción siguen sin estar claros.

Algunos informes han mencionado que la reproducción clonal es predominante en zonas agrícolas templadas, mientras que la recombinación sexual contribuye a la estructura de la población en climas tropicales o subtropicales (Cubeta *et al.*, 1997; Malvárez *et al.*, 2007). Sin embargo, la alta variabilidad observada en las últimas regiones puede deberse a un aumento en el número de estudios realizados con marcadores de SSR en estas regiones (Lehner & Mizubuti, 2017a). Además, un estudio reciente comparó poblaciones de *S. sclerotiorum* de diferentes zonas climáticas de EE. UU. y Brasil utilizando marcadores microsatélites y MCG, y sugirió que no existe relación entre el clima de la región de origen y la evidencia de cruzamiento o la cantidad de diversidad en las poblaciones (Lehner *et al.*, 2017b). La mayoría de los estudios genéticos poblacionales de *S. sclerotiorum* emplean la prueba de compatibilidad micelial, considerando clones a dos o más aislados que pertenecen al mismo MCG y tienen el mismo genotipo (Leslie, 1993). Sin embargo, la asociación de los marcadores microsatélites con los MCG ha mostrado resultados inconsistentes (Ford *et al.*, 1995; Atallah *et al.*, 2004; Attanayake *et al.*, 2012; Clarkson *et al.*, 2013; Lehner *et al.*, 2017b). Por lo tanto, la relación entre los grupos de compatibilidad micelial y los genotipos clonales sigue sin estar clara.

Un aspecto crítico del análisis de poblaciones clonales o mixtas es probar una hipótesis nula de panmixia (Milgroom, 1996). La prueba de esta hipótesis para poblaciones potencialmente clonales generalmente se basa en la evaluación del desequilibrio de ligamiento entre loci (Milgroom, 1996). Esto se logra a través del cálculo del índice de asociación (I_A) observado en la población, el cual se compara con el I_A esperado generado a

partir del remuestreo de los datos para obtener una distribución nula bajo el supuesto de apareamiento aleatorio (Smith *et al.*, 1993; Burt *et al.*, 1996; Milgroom, 1996). Este método se basa en el hecho de que las diferentes regiones del genoma tienen diferentes historias evolutivas debido a la recombinación, pero se heredan como una unidad si existe reproducción clonal (Tibayrenc *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1999). Entonces, el índice de asociación (I_A) se utiliza para detectar si las regiones del genoma se heredan de manera similar (poblaciones clonales) o diferente (poblaciones recombinadas).

En el presente capítulo, se analizó la estructura poblacional de 109 aislados de *S. sclerotiorum* recolectados en seis lotes de cultivo de poroto en diferentes localidades de la principal zona de producción de poroto en Argentina. Se determinó si existen evidencias de reproducción sexual en las poblaciones y cuáles son las variables que mejor predicen la estructura genética de las mismas. Además, se analizó la correlación entre los haplotipos multilocus (MLH) generados empleando marcadores microsatélites y los MCG. Estos hallazgos representan un aporte significativo para comprender la durabilidad de las estrategias de manejo de la esclerotinia y facilitar la selección de aislados representativos de la zona para la detección de genotipos resistentes.

Las preguntas a responder en este capítulo fueron las siguientes:

- ¿Existe estructuración de la variabilidad genética en las poblaciones de *S. sclerotiorum* en la principal zona de cultivo de poroto de Argentina?
- ¿Cuál es el tipo de reproducción predominante en las poblaciones de *S. sclerotiorum* analizadas?
- ¿Existe correlación entre los MCGs, los haplotipos MLH y la distancia geográfica de las poblaciones de *S. sclerotiorum*?

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Genotipado empleando microsatélites

A partir del ADN extraído según se detalló en el capítulo II, se realizó el genotipado de 109 aislados de *S. sclerotiorum* utilizando nueve pares de cebadores de microsatélites (Tabla 10) desarrollados por Sirjusingh & Kohn (2001). El genotipado se realizó a través del Servicio del Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA) de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) de la provincia de Tucumán.

La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 5 μ l que contenía 25 ng de ADN genómico, buffer de reacción 1X [100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 500 mM KCl, 1% Triton® X-100], 0,1 μ M de cada cebador, 200 μ M de los dinucleótidos dATP, dGTP, y dTTP, 160 μ M de dCTP, 0,12 μ M Cy5.5dCTP, 2,5 mM de Cl₂Mg y 0,1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (Highway-Inbio, Tandil, Argentina). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de desnaturización a 94 °C durante 7 min, seguido de 30 ciclos que constaron de una desnaturización a 94 °C durante 1 min, 60/64 °C (según el par de cebadores) durante 1 min y una extensión a 72 °C por 2 min y finalmente un ciclo de extensión a 72 °C durante 7 min. La visualización de los fragmentos amplificados se realizó utilizando el equipo LI-COR DNA Analyzer 4300 (Licor Bioscience, Lincoln, Nebraska, USA) y el tamaño de los alelos se determinó por comparación con el marcador de peso molecular LI-COR IRDye 50–700 bp Size Standard, utilizando el software SAGA (Licor Bioscience, Lincoln, Nebraska, USA).

3.2.2 Diversidad genética

La diversidad genética se analizó mediante la determinación de los genotipos multilocus. Cada aislado se asignó a un haplotipo multilocus (MLH) basado en la combinación de alelos en los loci de microsatélites, excluyendo los loci monomórficos (Kamvar *et al.*, 2017).

Se evaluó la diversidad alélica intra locus mediante el índice de Nei (h) (Nei, 1978) y la uniformidad alélica (E_5) (Pielou, 1975; Grünwald *et al.*, 2003).

Se estimó la diversidad genotípica (diversidad de haplotipos) calculando el índice de Stoddart & Taylor (G) (Stoddart & Taylor, 1988), el índice de Shannon (H) (Shannon, 1948) y el índice de Simpson (λ) (Simpson, 1949) por población (Hurlbert, 1971; Heck, van Belle & Simberloff, 1975; Pielou, 1975; Grünwald *et al.*, 2003).

El índice de diversidad de Simpson (λ) proporciona una estimación de la probabilidad de que dos genotipos seleccionados al azar sean diferentes. El valor de este índice oscila

entre 0 (ningún genotipo es diferente) a 1 (todos los genotipos son diferentes). Se calcula como:

$$\lambda = 1 - D$$

Donde $D = 1 - \sum p_i^2$, siendo p_i la abundancia proporcional de cada haplotipo en la población.

El índice de Stoddart y Taylor (G), también conocido como el índice inverso de Simpson, tiene como valor mínimo 1 (población con solo 1 genotipo), y el valor máximo es el número de genotipos de la población (riqueza de especies o haplotipos). Es decir, cuanto mayor sea el valor, mayor será la diversidad. Se calcula como:

$$G = 1/D$$

El índice de diversidad de Shannon (Shannon & Weaver, 1963) mide la probabilidad de seleccionar todas las especies en la proporción con que existen en la población, es decir, mide la probabilidad de que una muestra seleccionada al azar de una población infinitamente grande contenga exactamente n_1 individuos de la especie 1, n_2 de la especie 2 y n_S individuos de la especie S. En nuestro caso las especies equivalen a los haplotipos multilocus (MLH). El índice se calcula como:

$$H = - \sum (p_i \ln p_i)$$

Donde p_i es la proporción (o abundancia relativa) de cada haplotipo en la población. La diversidad máxima ($H = \ln S$, donde S representa el número de haplotipos de la población) se alcanza cuando todos los haplotipos están igualmente presentes.

Además de la diversidad genotípica, también se calculó el índice de uniformidad (E_5) que representa la abundancia relativa de los genotipos en una muestra. En una población con genotipos igualmente abundantes tiene un valor igual a 1 y una población dominada por un solo genotipo está más cerca de cero.

Se estimó el grado de reproducción clonal mediante el cálculo de la fracción clonal para cada población como $1 - [(número\ de\ diferentes\ genotipos) / (número\ total\ de\ aislados)]$ (Zhan *et al.*, 2003).

Los análisis se realizaron en un principio con todos los aislados, y posteriormente se realizaron sobre los datos con corrección de clones. La corrección de clones es un método que censura un conjunto de datos de modo que sólo se representa un individuo por cada haplotipo por población para reducir el sesgo debido a la sobrerrepresentación de clones, como en las poblaciones epidémicas (Smith *et al.*, 1993). Estudios previos demostraron que la corrección de clones aumenta la sensibilidad en la detección de recombinación (Atallah

et al., 2004; Sexton & Howlett, 2004; Attanayake *et al.*, 2012, 2013, 2014, Clarkson *et al.*, 2013, 2017; Aldrich-Wolfe *et al.*, 2015; Lehner & Mizubuti, 2017a).

Los análisis se realizaron utilizando el paquete R *poppr* versión 2.8.1 (Kamvar *et al.*, 2014, 2015) antes y después de la corrección de clones.

3.2.3 Análisis de agrupamientos y de coordenadas principales

Para analizar la similitud genética entre los aislados se emplearon técnicas de análisis multivariado. Se realizó el análisis de agrupamientos generando un dendrograma en base a los datos de microsatélites. Para ello, se obtuvo la matriz de distancia genética de Bruvo (Bruvo *et al.*, 2004) y se realizó un análisis con 1000 réplicas para generar un dendrograma de UPGMA utilizando la función `bruvo.boot()` del paquete *poppr* del software R versión 2.8.1 (Kamvar *et al.*, 2014). La distancia de Bruvo emplea un modelo de mutación gradual, que usa el motivo de repetición para comparar dos alelos en un solo locus y determina el número de pasos mutacionales como una medida cuantitativa de la distancia genética.

Como método de ordenación se realizó un análisis de coordenadas principales (ACoP) con el fin de obtener una representación gráfica de los genotipos en un espacio multidimensional donde todos los caracteres contribuyen de manera diferencial a todos los ejes. El ACoP se realizó utilizando el software GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

Las relaciones evolutivas entre haplotipos se representaron gráficamente utilizando una red de expansión mínima (MSN, *Minimum Span Network*) utilizando la función `bruvo.msn` del paquete *poppr*, con el fin de visualizar la relación entre los diferentes MLH e identificar los MLH más frecuentes entre las poblaciones.

3.2.4 Análisis de la varianza molecular

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) se utilizó para medir la estructura genética basada en la correlación entre haplotipos de *S. sclerotiorum* (Excoffier *et al.*, 1992) utilizando el programa ARLEQUIN v. 3.5.2.2 (Excoffier *et al.*, 2005). En este estudio, se analizó la variabilidad entre individuos de diferentes poblaciones (localidades) y dentro de las poblaciones (localidades) antes y después de la corrección de clones. Para establecer el nivel de significancia de los componentes de la varianza se obtuvo el estadístico Φ (similar al estadístico F) mediante 999 permutaciones al azar. La probabilidad de obtener por azar un estadístico mayor que el observado se toma como el nivel de significancia estadística.

Para analizar la diferenciación genética de las poblaciones se calculó el estadístico F_{ST} como se indicó anteriormente en el capítulo II. Posterior al cálculo de F_{ST} , se estimó el flujo

genético entre pares de poblaciones, a partir de la tasa de migración efectiva por generación (Slatkin, 1994), como se indicó también en el capítulo II .

3.2.5 Estructura poblacional

El análisis de estructura poblacional se realizó a partir de los datos de microsatélites empleando un modelado bayesiano en el programa STRUCTURE v.2.3 (Pritchard *et al.*, 2000). Se utilizó el modelo de mezclas o *admixture* con frecuencias alélicas correlacionadas (Falush *et al.*, 2003). Este programa permite realizar inferencias sobre la estructura poblacional a partir de las frecuencias alélicas de diversos loci, que puedan compartir un conjunto de genotipos y de esta forma asignarlos a las poblaciones (K). El método asume que el conjunto de individuos analizados representa una mezcla proveniente de un número desconocido de poblaciones y los individuos en la muestra se asignan probabilísticamente a una, o conjuntamente a dos o más poblaciones si sus genotipos indican que son individuos mezcla o *admixed* (Pritchard *et al.* 2000).

Los análisis poblacionales se realizaron con y sin corrección de clones por localidad. Se probaron valores posibles para K entre uno y 20 realizando 10 réplicas independientes para cada K. El análisis se realizó utilizando un largo del período de *burn-in* de 100000 iteraciones, seguido por 200000 iteraciones de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Este procedimiento agrupa a los individuos analizados en clusters, y estima la proporción de pertenencia a cada uno de ellos, infiriendo a partir de los datos el grado de mezcla de cada genotipo (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003).

Para estimar el número más probable de K poblaciones se utilizó el método de Evanno *et al.* (2005) según el valor máximo del parámetro ΔK . Para ello, se utilizó el programa Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012).

3.2.6 Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento (DL) es la asociación no aleatoria entre los alelos de diferentes loci en una población determinada. El DL se estima midiendo la asociación entre alelos de diferentes loci en comparaciones de a pares. La proporción de las comparaciones que están en equilibrio dan una indicación de la probabilidad de clonalidad o recombinación.

El DL puede medirse utilizando el índice de asociación (I_A), el cual se define como:

$$I_A = (V_o / V_e) - 1,$$

donde V_o es la varianza observada de las distancias por pares, y V_e es la varianza esperada en ausencia de desequilibrio de ligamiento. Debido a que el I_A depende del número de muestras, Agapow & Burt (2001) modificaron este índice y crearon la versión estandarizada (\bar{r}_d) que es independiente del número de muestras.

Para el cálculo del I_A la hipótesis nula es la asociación aleatoria de alelos (apareamiento aleatorio o recombinación). La estadística utilizada por el índice I_A es la varianza y describe la distribución de distancias genéticas entre todos los pares de aislados en una población. En una población que se recombinan, la distribución de las distancias genéticas entre pares de aislados es normal y la varianza toma valores bajos, mientras que en poblaciones clonales el índice aumenta a medida que la distribución se inclina hacia los extremos (Smith *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1999). Para probar la significancia estadística, el conjunto de datos observado se mezcla aleatoriamente mediante un nuevo muestreo sin sustitución de alelos dentro de cada locus que simula el apareamiento aleatorio para generar un conjunto de datos que simulen los efectos de la recombinación (Taylor *et al.*, 1999; Agapow & Burt, 2001). En resumen, el I_A medio para los conjuntos de datos recombinados artificialmente se define como cero, y la significancia se determina a partir de la posición de la varianza observada en la distribución de varianzas para los datos re muestreados (Smith *et al.*, 1993). Es importante señalar que la prueba de significancia no es para una diferencia significativa de cero (Taylor *et al.*, 1999). Por lo tanto, la forma en que se mezclan los datos observados afecta profundamente el valor de P . Si la población se subdivide, la mezcla aleatoria de los datos en toda la población siempre estará sesgada hacia la clonalidad (Smith *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1999; Agapow & Burt, 2001) ya que en una población estructurada el DL aumenta si las frecuencias alélicas entre loci varían entre las subpoblaciones que la integran.

Para probar la hipótesis nula de equilibrio de ligamiento (asociación aleatoria de alelos) en los loci de microsatélites de *S. sclerotiorum*, se calculó el índice de asociación (I_A) y su versión estandarizada (\bar{r}_d) usando 999 permutaciones (Agapow & Burt, 2001) antes y después de la corrección de clones, usando el paquete *poppr* del software R versión 2.8.1 (Kamvar *et al.*, 2014). El índice de asociación también se calculó entre pares de loci. En los casos en que el I_A o \bar{r}_d fueron significativamente diferentes de 0 ($P \leq 0,001$), la hipótesis de equilibrio de ligamiento (apareamiento aleatorio) fue rechazada.

3.2.7 Análisis de correlación

Para determinar si existe correlación entre las matrices de distancia de los MCGs (identificados en el capítulo anterior), los haplotipos de microsatélites (MLH) y las distancias geográficas entre los sitios de recolección de las muestras poblacionales, se realizó el test estadístico de Mantel (Mantel, 1967) utilizando el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Diversidad genética

Cada aislado de *S. sclerotiorum* amplificó un único alelo por locus, como se esperaba para un organismo haploide (Anexo, Tabla A1). Se observó un rango de 2 (Locus 7-2) a 4 (Locus 114-4) alelos polimórficos por locus, con un promedio de 3 alelos por locus (Tabla 10), con excepción de los loci 36-4 y 92-4 que fueron monomórficos para todos los aislados y no fueron considerados para los análisis siguientes.

Los índices de diversidad genética (h) y de uniformidad (E_5) variaron entre 0,054 a 0,635 y 0,421 a 0,798, respectivamente, para la mayoría de los loci. Notablemente, el locus 7-2, que contuvo solamente 2 alelos, mostró los valores más bajos de h (0,054) y E_5 (0,421), indicando que uno de los dos alelos se presentó con mayor frecuencia (Tabla 10). El tamaño observado de los alelos estuvo dentro del rango del tamaño esperado reportado por Sirjusingh y Kohn (2001), que fueron quienes desarrollaron los microsatélites utilizados en el presente trabajo. Sin embargo, el número de alelos observados (NAO) fue considerablemente menor al número de alelos esperados (NAE) reportados por Sirjusingh y Kohn (2001), lo cual puede atribuirse a que la muestra analizada por los autores para probar los microsatélites incluyó además algunos aislados de otras especies como *S. minor* y *S. trifoliorum*.

Tabla 10. Diversidad alélica en nueve loci de microsatélites utilizados para caracterizar aislados de *S. sclerotiorum* de Salta y Jujuy, Argentina.

Locus	Motivo de repetición	Alelos					
		Tamaño esperado (pb) ^a	Tamaño Observado (pb) ^b	NAE ^a	NAO ^b	h^c	E_5^d
7-2	(GA) ₁₄	160-172	162-170	4	2	0,054	0,421
9-2	(CA) ₉ (CT) ₉	358-382	339-349-364	4	3	0,381	0,738
12-2	(CA) ₉	215-225	207-210-215	4	3	0,551	0,798
13-2	(GTGGT) ₆	284-304	259-277-296	4	3	0,408	0,664
106-4	(CATA) ₂₅	491-571	451-471-488	10	3	0,289	0,554
114-4	(AGAT) ₁₄ (AAGC) ₄	351-391	363-376-386-390	8	4	0,635	0,752
8-3	CA ₁₂	251-271	234-239-253	4	3	0,395	0,617
36-4	CA ₆ (CGCA) ₂ CAT ₂	415-429	366	2	1	-	-
92-4	(CT) ₁₂	374-378	344	3	1	-	-

^a Rango de tamaño esperado y número de alelos esperados (NAE) según Sirjusingh & Kohn (2001). ^b Rango de tamaño observado y número de alelos observados (NAO). ^c h = Diversidad genética de Nei (Nei, 1978). ^d E_5 : Uniformidad.

En la Figura 27 se observan los números de alelos por locus y por localidad. La población de Orán fue la que presentó menor número de alelos por locus (9 alelos en siete loci), mientras que Tartagal tuvo la mayor cantidad de alelos por locus (19 alelos en 7 loci). Entre las poblaciones con valores intermedios se encuentran Campichuelo, Pichanal y Gral. Ballivián con 18 alelos en 7 loci, y Palma Sola con 16 alelos en 7 loci.

De los 23 alelos amplificados, se encontró solamente un alelo privado o alelo único en el locus 9-2 de 364 pb. Este alelo pertenece al aislado SS56 de la población de Palma Sola.

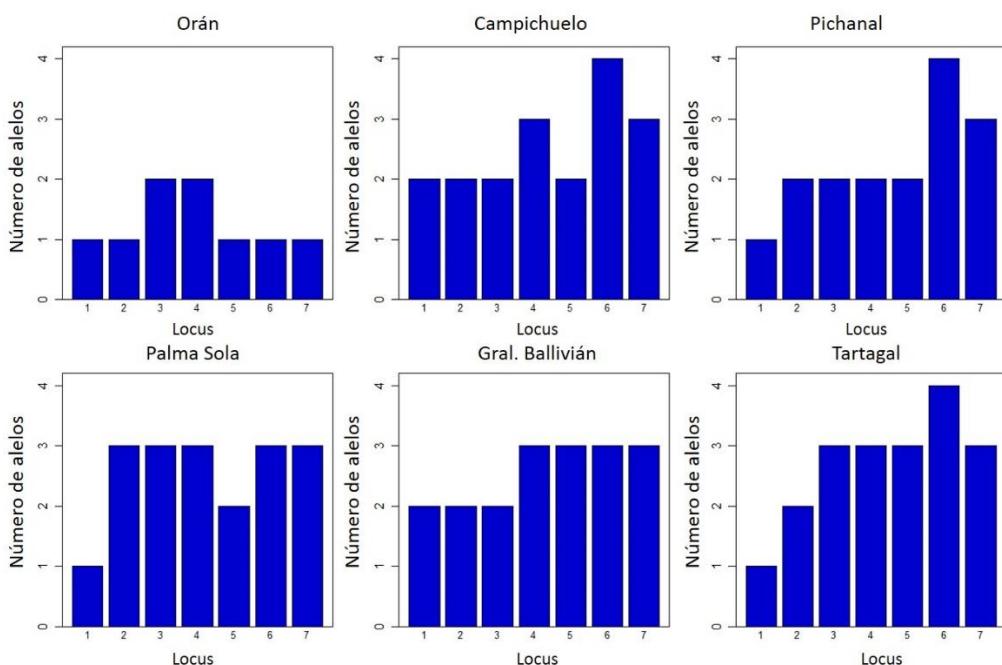


Figura 27. Número de alelos por locus en las seis poblaciones de *S. sclerotiorum*. Locus: 1: 1-2, 2: 9-2, 3: 12-2, 4: 13-2, 5: 106-4, 6: 114-4, 7: 8-3.

En los 109 aislados analizados, se identificó un total de 30 haplotipos SSR (Figura 28), de los cuales 18 (60%) fueron únicos, es decir que un haplotipo estuvo representado por un único aislado en una única población. Los 12 haplotipos restantes (40%) estuvieron constituidos por el 83% de los aislados, y seis de estos haplotipos (MLH1, MLH6, MLH7, MLH17, MLH21 Y MLH23) se encontraron en al menos dos lugares (Figura 28). Estos últimos seis haplotipos incluyeron al 69% de los aislados analizados (75).

El haplotipo MLH 23 fue el más abundante y el más frecuente, representado por 39 aislados de cinco localidades: Orán (18), Campichuelo (5), Pichanal (1), Gral. Ballivián (11) y Tartagal (4). En Palma Sola no se detectó este haplotipo.

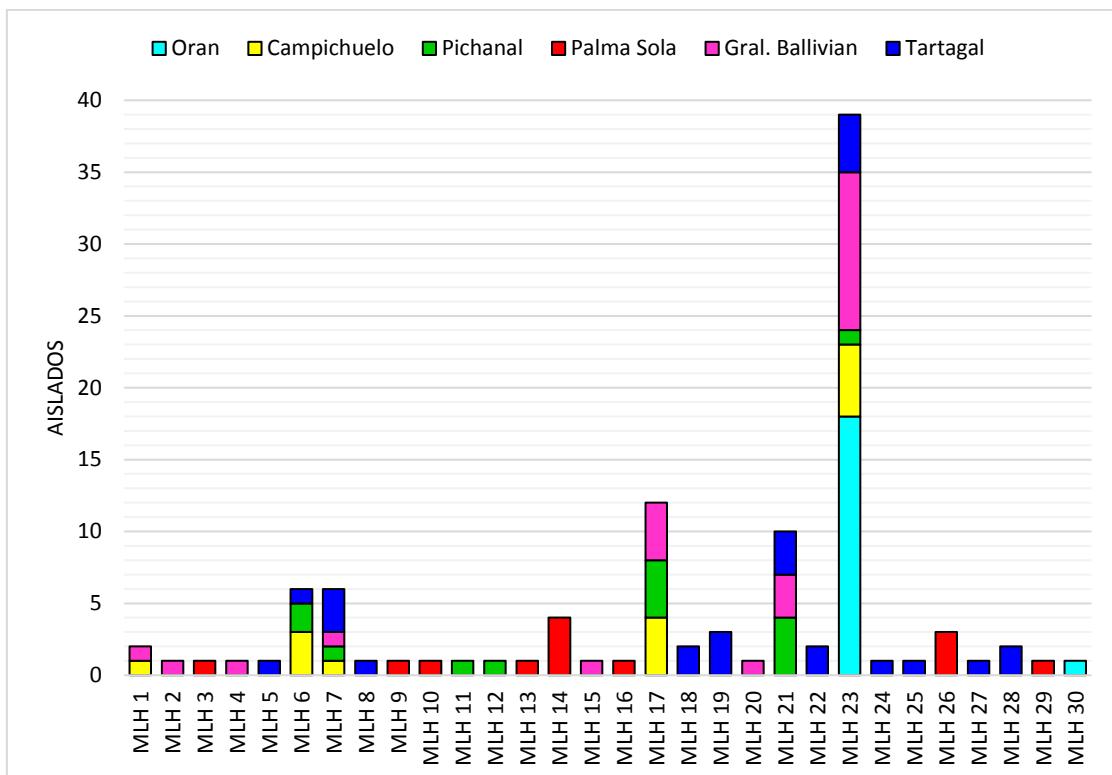


Figura 28. Histograma de las frecuencias de 30 haplotipos SSR de *S. sclerotiorum*, sin corrección clonal.

El número de MLH observados generalmente es equivalente a la riqueza genotípica. Entre las localidades estudiadas, el número de MLH varió de 2 (Orán) a 13 (Tartagal) (Tabla 11). A pesar de que el tamaño de muestras de Gral. Ballivián ($N = 24$) fue mayor que el de Palma Sola ($N = 13$), la cantidad de haplotipos MLH fue similar (Gral. Ballivián = 9 y Palma Sola = 8). Por lo tanto, considerando la diferencia en el tamaño de muestras entre las poblaciones, el MLH no fue sinónimo de riqueza genotípica.

Las medidas de diversidad incorporan tanto la riqueza genotípica como la abundancia. Se emplearon tres medidas de diversidad genotípica: el índice de Shannon-Wiener (H), el índice de Stoddart y Taylor (G) y el índice de Simpson (λ) (Tabla 11). Como resultado de la evaluación de estos índices, Tartagal fue la población más diversa ($H = 2,43$; $G = 10,25$; $\lambda = 0,90$). Esto indicó que no hay muchos genotipos duplicados en Tartagal (Tabla 11). En contraste, la población de Orán presentó los valores más bajos para todos los índices ($H = 0,21$; $G = 1,11$; $\lambda = 0,10$), lo que indica que prácticamente no hay genotipos diferentes entre sí. Según el índice de Stoddart y Taylor y Simpson, Campichuelo ($G = 3,77$; $\lambda = 0,73$) y Gral. Ballivián ($G = 3,79$; $\lambda = 0,74$) son similares. Sin embargo, al evaluar el índice de la diversidad de Nei (h) para Gral. Ballivián ($h = 0,29$) es mucho menor que Campichuelo ($h = 0,47$), lo que indica que Gral. Ballivián tiene una menor diversidad alélica.

Según el índice de uniformidad (E_5), que mide la distribución de las abundancias de genotipos, Tartagal ($E_5 = 0,89$) es la población que está más cerca de la abundancia con respecto al resto de las poblaciones estudiadas (Tabla 11). En contraste, Orán tiene el menor valor ($E_5 = 0,48$), lo que indica que los genotipos están sobrerepresentados, es decir, predominan pocos genotipos. El resto de las poblaciones (Campichuelo, Pichanal, Palma Sola y Gral. Ballivián) presentan valores superiores a la media de E_5 , lo que significa que los haplotipos se distribuyeron más uniformemente en las poblaciones.

La fracción clonal total, que describe la proporción de aislados originados en la reproducción asexual, fue del 72,5% (Tabla 11). La población de Orán tuvo la mayor fracción clonal (89%) y Palma Sola presentó el menor valor (30%).

Tabla 11. Diversidad genotípica de los 109 aislados de *S. sclerotiorum* antes de la corrección de clones.

Localidad	N ^a	MLH ^b	FC ^c	H ^d	G ^e	λ ^f	E ₅ ^g	h ^h
Orán	19	2	0,89	0,21	1,11	0,10	0,48	0,03
Campichuelo	14	5	0,64	1,43	3,77	0,73	0,87	0,47
Pichanal	14	7	0,50	1,75	4,90	0,80	0,82	0,46
Palma Sola	13	8	0,38	1,88	5,45	0,82	0,80	0,35
Gral. Ballivian	24	9	0,63	1,71	3,79	0,74	0,61	0,29
Tartagal	25	13	0,48	2,43	10,25	0,90	0,89	0,46
Total	109	30	0,72	2,54	6,24	0,84	0,45	0,39

^aN: Número de aislados. ^bMLH: Número de MLH. ^cFC: Fracción clonal. ^dH: Índice de Shannon–Weiner. ^eG: Índice de Stoddardt y Taylor. ^fλ: Índice de Simpson. ^gE₅: Uniformidad. ^hh: Diversidad genética de Nei (1978).

Después de la corrección de clones, se eliminaron 65 aislados de *S. sclerotiorum* de los 109 aislados originales. Es decir, que se seleccionó sólo un aislado por haplotipo (MLH) por población. Por lo tanto, quedaron 44 aislados finales que representaron a los 30 haplotipos en las seis localidades analizadas (Figura 29). La eliminación de los aislados en cada población no fue uniforme en todas las localidades, ya que la presencia de clones en las distintas localidades fue variable. Por ejemplo, la población de Orán tuvo la mayor diferencia en el número de aislados antes y después de realizar la corrección de clones, ya que de 19 aislados solamente quedaron 2 aislados (Figura 29), los cuales representan a los dos MLH encontrados en esa población. Con respecto a las demás poblaciones, el número de aislados eliminados representó el 64% (Campichuelo), 50% (Pichanal), 38% (Palma Sola), 63% (Gral. Ballivián) y un 48% (Tartagal) de los aislados originales (Figura 29).

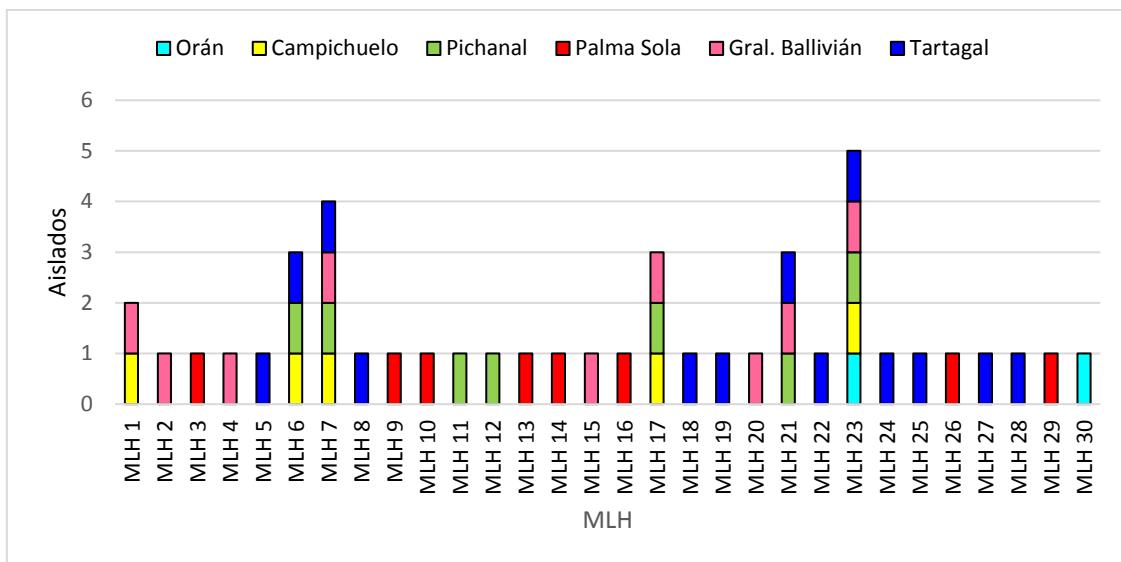


Figura 29. Histograma de las frecuencias de 30 haplotipos SSR de *S. sclerotiorum*, con corrección clonal.

Con respecto a la diversidad genotípica (H , G y λ), la población de Tartagal ($H = 2,56$; $G = 13,0$; $\lambda = 0,92$) continuó siendo la más diversa luego de la corrección clonal y Orán ($H = 0,6$; $G = 2,0$; $\lambda = 0,50$) la de menor diversidad (Tabla 12). Sin embargo, en términos de diversidad alélica la población de Campichuelo tuvo el mayor valor ($h = 0,67$) en comparación con las poblaciones restantes.

Todas las poblaciones tienen el máximo valor para E_5 lo que indica que no hay genotipos sobrerepresentados en las poblaciones (Tabla 12).

Tabla 12. Diversidad genotípica de los 109 aislados de *S. sclerotiorum* después de la corrección de clones.

Localidad	N ^a	MLH ^b	H ^c	G ^d	λ ^e	E ₅ ^f	h ^g
Orán	2	2	0,69	2,0	0,50	1,00	0,29
Campichuelo	5	5	1,61	5,0	0,80	1,00	0,67
Pichanal	7	7	1,95	7,0	0,86	1,00	0,54
Palma Sola	8	8	2,08	8,0	0,87	1,00	0,48
Gral. Ballivián	9	9	2,20	9,0	0,89	1,00	0,56
Tartagal	13	13	2,56	13,0	0,92	1,00	0,51
Total	44	30	3,22	20,2	0,95	-	0,53

^a N: Número de aislados. ^bMLH: Número de MLH. ^cH: Índice de Shannon-Weiner. ^dG: Índice de Stoddardt y Taylor. ^eλ: Índice de Simpson. ^fE₅: Uniformidad. ^gh: Diversidad genética de Nei (1978).

3.3.2 Análisis de agrupamientos y de coordenadas principales

En base a los datos de microsatélites, los aislados de *S. sclerotiorum* se agruparon en 2 grupos con un soporte de bootstrap de 100 (Figura 30). El 97% de los aislados se incluyeron en el grupo I con una similitud genética > 58% entre ellos. Dentro del grupo I se formaron dos subgrupos. En el subgrupo IA, compuesto por el 82% de los aislados, se encontraron todos los aislados de Orán y Palma Sola. Mientras que el subgrupo IB, compuesto por el 15% de los aislados, hubo similitud genética entre diferentes aislados obtenidos de diferentes sitios. El grupo II incluyó 3 aislados, dos de Gral. Ballivián y uno de Campichuelo, con un valor de bootstrap bajo (58,2), y presentó una similitud genética > 86% entre ellos.

Algunos de los grupos revelados por el análisis de agrupamiento basado en los datos de microsatélite fueron confirmados por el ACoP (Figura 31). Las dos primeras coordenadas principales explicaron el 77,7% de la variación acumulada. Sin embargo, no se encontró una clara separación entre los aislados de todas las localidades. Un elevado porcentaje de los aislados de todas las poblaciones (76% Tartagal, 100% Orán, 92% Palma Sola, 79% Gral. Ballivián, 71% Campichuelo y 64% Pichanal) tendieron a tener valores más negativos a lo largo de la primera coordenada principal. Estos aislados se incluyeron en el grupo IA del dendrograma. Mientras que los aislados que pertenecen al grupo IB del dendrograma, mostraron valores más positivos en la primera coordenada principal. Por otro lado, los aislados del grupo II del dendrograma fueron los que mostraron valores positivos más altos en la segunda coordenada principal.

Por otro lado, el estudio de las relaciones entre los MLH se realizó utilizando una red de expansión mínima, que muestra las conexiones entre los MLH más similares (Figura 32). De los seis MLH que se cruzan entre las poblaciones, los tres más frecuentes (MLH23, MLH17 y MLH21) compuesto por aislados de todas las localidades menos de Palma Sola, están conectados entre sí de forma directa. La mayoría de los aislados de Palma Sola, se encuentran en un extremo de la red. Mientras que los MLH de Tartagal, Campichuelo y Pichanal se encuentran en el otro extremo de la red.

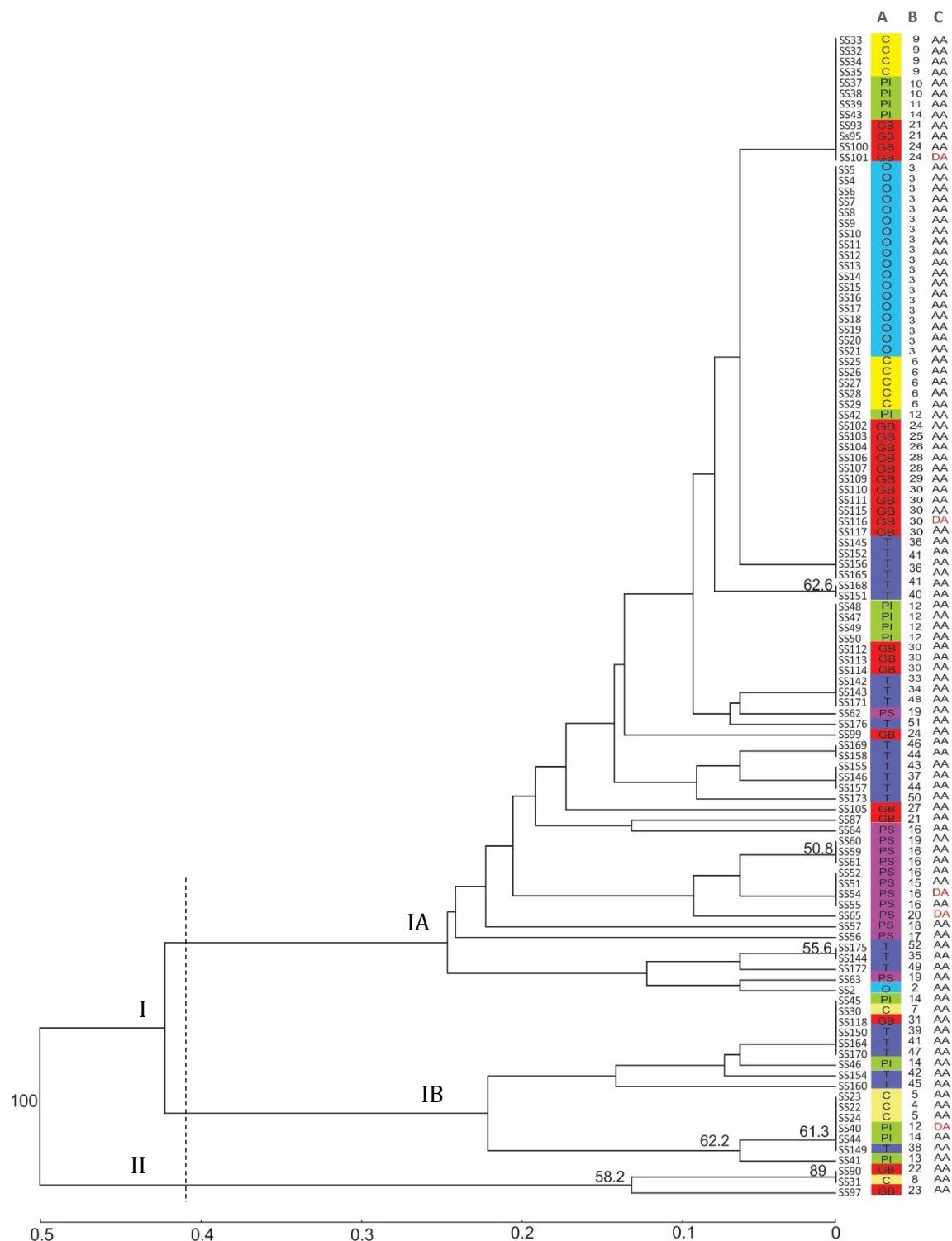


Figura 30. Árbol de UPGMA que muestra las relaciones genéticas entre los 109 aislados de *S. sclerotiorum* según los datos de los marcadores SSR (Distancia de Bruvo). A) Localidad: O, Orán (color celeste); C, Campichuelo (color amarillo); PI, Pichanal (color verde); PS, Palma Sola (color rosado); GB, Gral. Ballivián (color rojo); T, Tartagal (color azul). B) MCG. C) Agresividad: AA (altamente agresivo) y DA (débilmente agresivo). Los colores indican diferentes sitios de colecta.

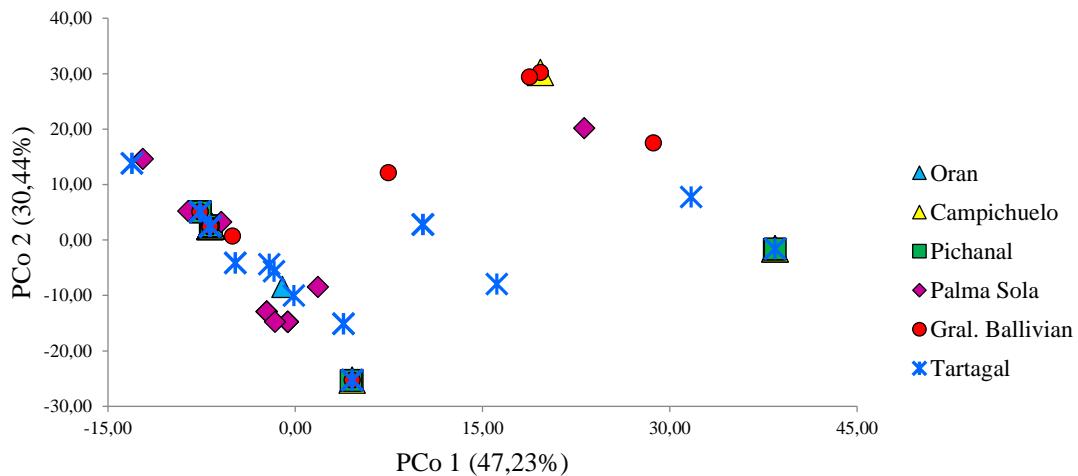


Figura 31. Análisis de coordenadas principales de 109 aislados de *S. sclerotiorum* del noroeste argentino usando datos de microsatélites.

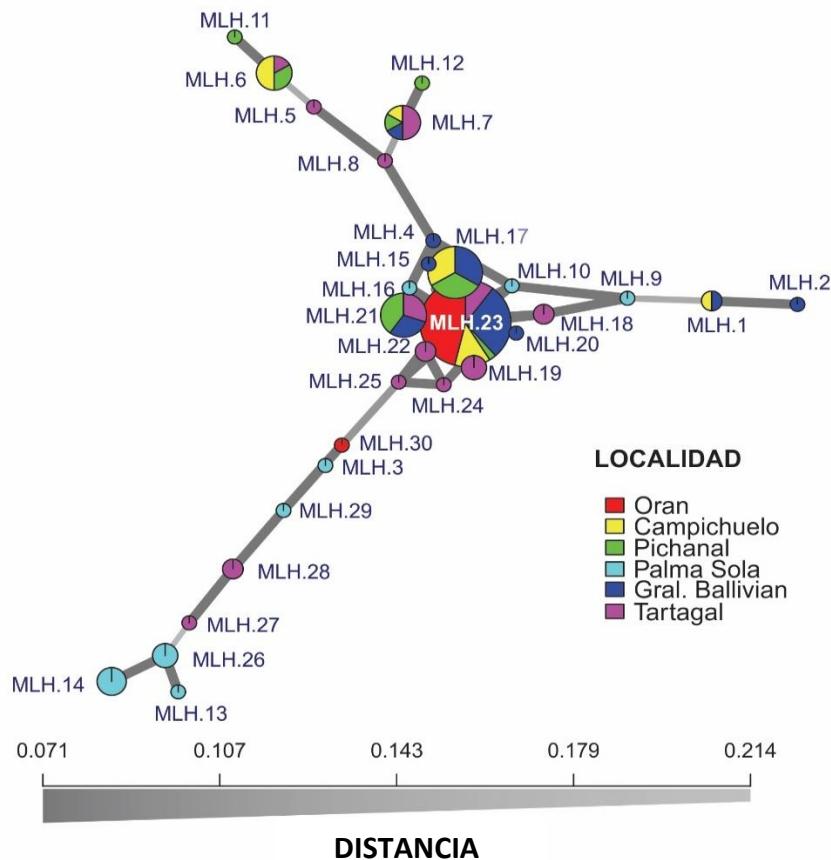


Figura 32. Red mínima de expansión basada en la medida de distancia genética de Bruvo para poblaciones de *S. sclerotiorum* muestreadas en seis localidades de las provincias de Salta y Jujuy, Argentina. Cada nodo es un genotipo multilocus (MLH) y se divide según la proporción de aislados dentro de ese MLH que pertenecen a cada localidad. El tamaño de los nodos es proporcional a la cantidad de aislados. Las diferentes localidades están indicadas por colores. El color de las líneas que conectan los nodos es indicativo de la distancia de Bruvo (calculada con 999 permutaciones) entre los nodos, como se muestra en la escala. El grosor de las líneas es inversamente proporcional a la distancia de Bruvo, pero no corresponde directamente al grosor mostrado en la barra de escala.

3.3.3 Análisis de la varianza molecular

Antes de la corrección de clones, el AMOVA mostró una diferenciación significativa entre las poblaciones ($F_{ST} = 0,086; P < 0,001$) con una variación significativa entre y dentro de las poblaciones (Tabla 13). El 91% de la variación genética total se asoció con diferencias dentro de las poblaciones, mientras que el 9% se debió a la variación entre poblaciones (Tabla 13).

Después de la corrección de clones, el AMOVA no mostró una diferenciación significativa entre las poblaciones ($F_{ST} = -0,027; P = 0,655$). El 100% de la variación genética total se asoció con diferencias dentro de las poblaciones (Tabla 14).

Tabla 13. Análisis de la varianza molecular de los aislados de *S. sclerotiorum* de 6 localidades productoras de poroto del NOA basado en los datos de SSR **sin** corrección de clones.

Fuente de variación	gl ^a	SC ^b	CM ^c	Var. Est. ^d	% Var. ^e	Φ_{ST}	P ^f
Entre poblaciones	5	4451,25	890,25	31,18	9%	0,086	0,001
Dentro de poblaciones	103	34202,31	332,06	332,06	91%		
Total	108	38653,56		363,24	100%		

^aGrados de libertad. ^bSuma de cuadrados. ^cCuadrado medio. ^dVarianza estimada. ^ePorcentaje total de varianza. ^fValor de P basado en 999 permutaciones.

Tabla 14. Análisis de la varianza molecular de los aislados de *S. sclerotiorum* de 6 localidades productoras de poroto del NOA basado en los datos de SSR **con** corrección de clones.

Fuente de variación	gl ^a	SC ^b	CM ^c	Var. Est. ^d	% Var. ^e	Φ_{ST}	P ^f
Entre poblaciones	5	2381,462	476,292	0,000	0%	-0,027	0,665
Dentro de poblaciones	38	22121,629	582,148	582,148	100%		
Total	43	24503,091		582,148	100%		

^aGrados de libertad. ^bSuma de cuadrados. ^cCuadrado medio. ^dVarianza estimada. ^ePorcentaje total de varianza. ^fValor de P basado en 999 permutaciones.

3.3.4 Análisis de diferenciación genética

En base a las comparaciones de F_{ST} de a pares realizada sin corrección clonal, la mayoría de las poblaciones resultaron genéticamente distintas. Sin embargo, hubo siete comparaciones que mostraron valores de F_{ST} no significativos ($P < 0,05$) (Tabla 15). Los valores de F_{ST} variaron desde un mínimo de 0,075 ($P \leq 0,01$) entre Gral. Ballivián y Tartagal, a un máximo de 0,350 para Orán y Palma Sola ($P \leq 0,001$) (Figura 33). Las poblaciones de Orán y Palma Sola mostraron una diferenciación significativa de todo el resto de las poblaciones, con valores de F_{ST} moderadamente altos (Tabla 15, Figura 33). Por otro lado, las poblaciones de Campichuelo y Pichanal no mostraron una diferenciación significativa con las demás poblaciones, excepto con Palma Sola y Orán (Tabla 15).

Con respecto al flujo génico, la mayoría de las comparaciones entre poblaciones que resultaron significativas tuvieron valores de $N_m > 1$ (Tabla 15), lo que sugiere la existencia de un flujo de genes de moderado a alto, evitando la diferenciación local. Por otro lado, el flujo de genes fue bajo ($N_m < 1$) entre Orán y Palma Sola.

Tabla 15. Diferenciación poblacional medida por F_{ST} (bajo la diagonal) y flujo de genes (N_m) (sobre la diagonal) entre 6 poblaciones de *S. sclerotiorum* del noroeste Argentino basado en datos de SSR.

	Orán	Campichuelo	Pichanal	Palma Sola	Gral. Ballivián	Tartagal
Orán	-	1,898	2,041	0,929	7,675	3,073
Campichuelo	0,208**	-	∞	3,658	11,844	∞
Pichanal	0,197**	0,000	-	4,067	6,961	∞
Palma Sola	0,350**	0,120**	0,109*	-	1,845	6,153
Gral. Ballivián	0,061	0,000	0,067	0,213**	-	6,163
Tartagal	0,140**	0,000	-0,043	0,075**	0,075	-

** $P < 0,001$ * $P < 0,01$

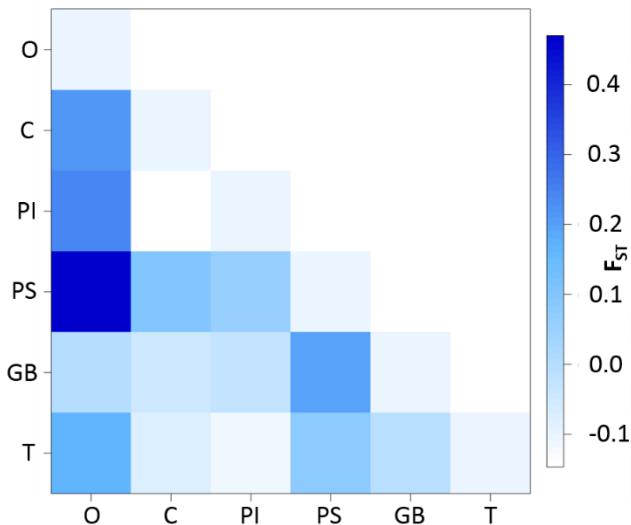


Figura 33. Mapa de Calor (heatmap) que muestra los valores de F_{ST} calculados entre pares de poblaciones. O: Orán. C: Campichuelo. PI: Pichanal. PS: Palma Sola. GB: Gral. Ballivián. T: Tartagal.

3.3.5 Análisis de estructura poblacional

El análisis de agrupamientos Bayesiano utilizando STRUCTURE con datos de microsatélites sugirió que existirían dos poblaciones genéticamente distintas para *S. sclerotiorum* ($K = 2$), en base a los valores observados de ΔK (Figura 34). Todos los aislados pudieron asignarse a los grupos K1 o K2. Se consideraron como miembros de un grupo a los individuos con un valor $Q \geq 0,60$. El 62% de los aislados se incluyeron en K1 y el 38% en K2.

Las poblaciones inferidas no se correlacionaron con el sitio de muestreo, excepto las poblaciones de Orán y Palma Sola donde la mayoría de sus aislados pertenecieron a un mismo K (Figura 35). El resto de las poblaciones estuvieron integradas por individuos de ambos K. En las poblaciones de Pichanal, Campichuelo y Gral. Ballivián la mayoría de los individuos pertenecieron a K1. En Campichuelo y Pichanal el 64% de los individuos se incluyeron en K1 y el 36% en K2. Mientras que en Gral. Ballivián el 72% perteneció a K1 y el 25% a K2. La población de Tartagal mostró una mezcla más equilibrada de genotipos ya que el 44% de los individuos pertenecieron a K1 mientras que el 56% restante se incluyó en K2. La estructura observada en las poblaciones deberá tenerse en cuenta para el análisis de desequilibrio de ligamiento ya que, de no ser así, pueden inferirse resultados sesgados.

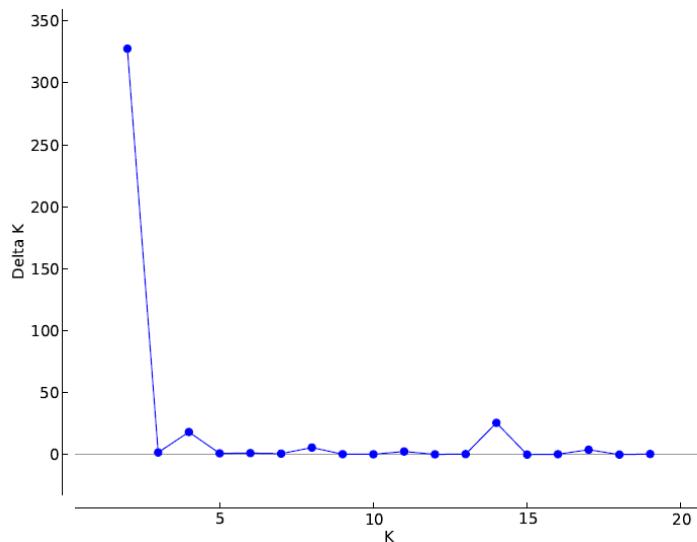


Figura 34. Valores de Delta K calculados por el método de Evanno (2005) basado en datos de microsatélites antes de la corrección de clones analizados con el software STRUCTURE.

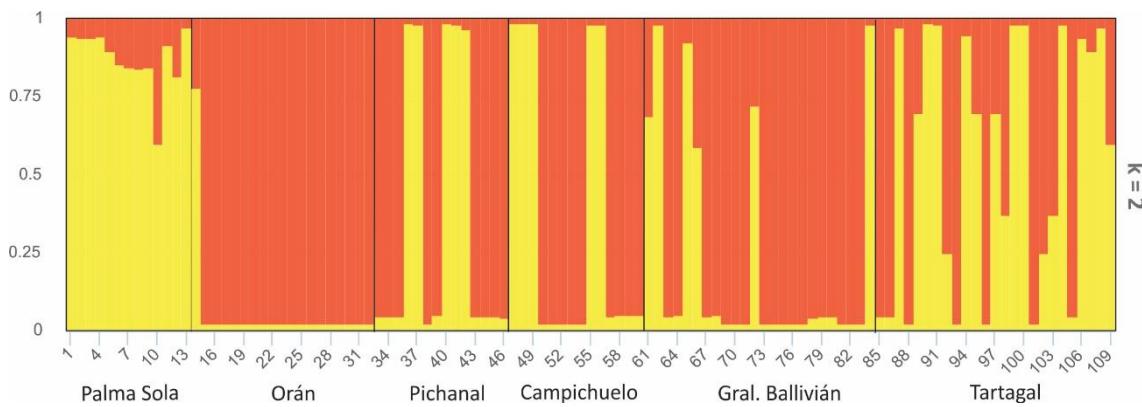


Figura 35. Gráfico de barras que muestra la asignación de los aislados de *S. sclerotiorum*, para un $K = 2$, basado en datos de microsatélites analizados con el software STRUCTURE. Cada barra representa un solo aislado, dividido en segmentos de colores, donde los colores representan la pertenencia a un determinado agrupamiento (Rojo: K1; Amarillo: K2).

Después de la corrección de clones, la inferencia de estructura poblacional por el método bayesiano implementado en el programa STRUCTURE sugirió el mismo número de poblaciones con un $K = 2$, el cual tuvo el mayor valor de ΔK (40,35) (Figura 36, Figura 37). La mayoría de los aislados pudieron asignarse a los grupos K1 o K2. Se consideraron como miembros de un grupo a los individuos con un valor $Q \geq 0,60$. El 43% de los aislados se incluyeron en K1, el 45% en K2 y el 11% no se pudo asignar a ningún K por presentar valores de Q menores a 0,60.

Al igual que el análisis sin corrección clonal, las poblaciones inferidas no se correlacionaron con la ubicación de muestreo, excepto la población de Orán donde los

aislados pertenecieron a K2 (Figura 37). El resto de las poblaciones estuvieron integradas por individuos de ambos K. En las poblaciones de Pichanal y Campichuelo la mayoría de los individuos pertenecieron a K1. En Pichanal y Campichuelo se incluyeron en K1 el 57% y el 60% de los individuos, respectivamente. En Tartagal, Gral. Ballivián y Palma Sola hubo individuos mezcla (*admixed*), que no se asignaron a ninguna de las poblaciones inferidas por presentar bajos valores de Q. El 50% de los individuos de la población de Palma Sola se asignó a K1, el 38% a K2 y el 13% resultó mezcla. En Gral. Ballivián el 56% se asignó a K2, el 33% a K1 y el 11% resultó mezcla. Por último en Tartagal, el 46% se asignó a K2, el 38% a K1 y el 15% fue mezcla.

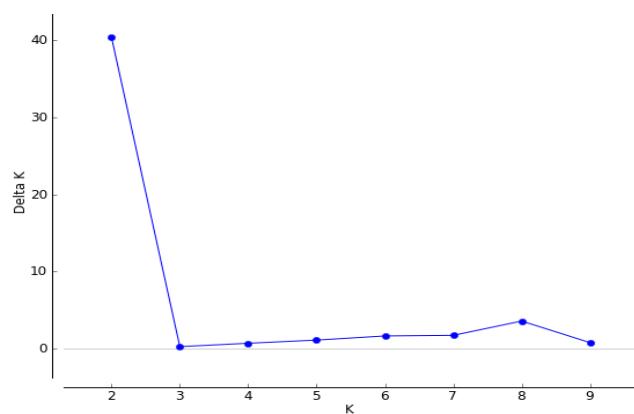


Figura 36. Valores de Delta K calculados por el método de Evanno (2005) basado en datos de microsatélites después de la corrección de clones.

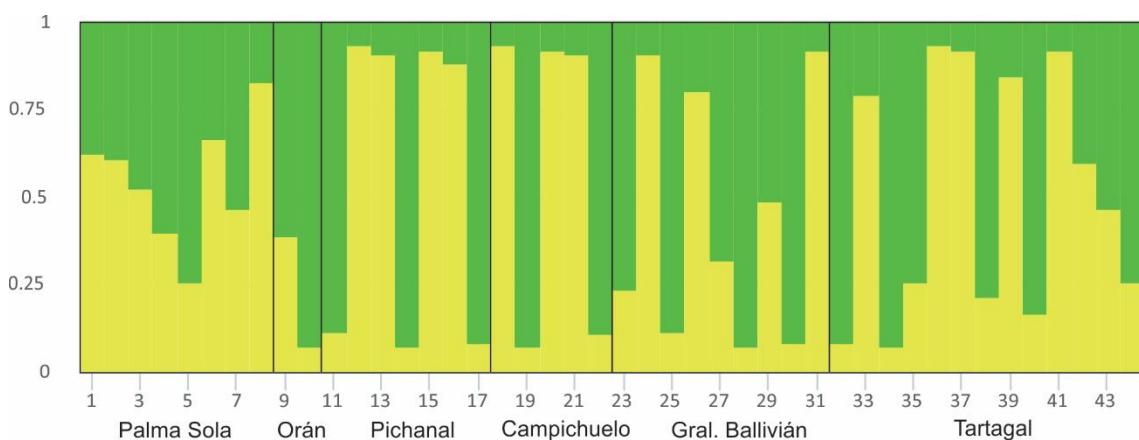


Figura 37. Gráfico de barras que muestra la asignación de los aislados de *S. sclerotiorum*, para un K = 2, basado en datos de microsatélites analizados con el software STRUCTURE. Cada barra representa un solo aislado, dividido en segmentos de colores, donde los colores representan la pertenencia a un determinado agrupamiento (Amarillo: K1; Verde: K2).

3.3.6 Desequilibrio de ligamiento

El potencial de apareamiento aleatorio de las poblaciones se estimó mediante el desequilibrio de ligamiento medido con el índice de asociación (I_A) y el índice de asociación estándar (\bar{r}_d), y se analizó en las poblaciones antes y después de la corrección clonal (CC) (Tabla 16).

En la población de Orán, los índices calculados en base a los datos sin corrección clonal (Tabla 16) indicaron que no se encontraba en desequilibrio de ligamiento ($\bar{r}_d = 1,000$; $P = 0,071$), sugiriendo la ocurrencia de recombinación sexual. Al analizar la distribución de los valores (Figura 38, A), se observó que la mayoría (95%) se distribuía sobre la media estimada bajo el supuesto de reproducción sexual. Sin embargo, la representación excesiva de genotipos idénticos sugería lo opuesto, es decir, clonalidad. Más adelante, (en el siguiente inciso), se determinó el I_A por pares de loci para comprobar si el equilibrio de ligamiento que se observó se debía a un único par de loci, generando un falso positivo de recombinación. Después de la corrección de clones, no se pudo medir el DL ya que, al corregir los datos, quedaron sólo dos MLH, diferenciándose por un solo alelo. Por lo tanto, no hubo información suficiente para realizar las comparaciones necesarias para medir el DL.

En el caso de Palma Sola, antes de realizar la CC las medidas de DL ($I_A = 0,646$; $\bar{r}_d = 0,131$) no fueron significativas ($P = 0,018$), razón por la cual no se rechazó la hipótesis de apareamiento aleatorio, por lo que en Palma Sola habría recombinación sexual. Sin embargo, al analizar los gráficos de ligamiento (Figura 39, D1) los valores de \bar{r}_d se situaron sobre la cola derecha de la distribución, indicando clonalidad parcial. Para determinar finalmente si la población era clonal o sexual, se verificaron los valores de los índices después de la CC y se encontró que el valor de \bar{r}_d (-0,003; $P = 0,495$) se ubicó en el centro de la distribución esperada para loci no vinculados (Figura 39, D2) con un valor de P no significativo ($P = 0,495$), lo que indica que en Palma Sola efectivamente ocurriría recombinación sexual.

En el caso de las poblaciones de Campichuelo (Figura 38, B1), Pichanal (Figura 39, C1) y Gral. Ballivián (Figura 40, E1) antes de la CC se rechazó la hipótesis nula indicando que se trataba de poblaciones clonales ($P = 0,001$) (Tabla 16). Sin embargo, después de la CC (Figura 38 B2, Figura 39 C2, Figura 40 E2) se aceptó la hipótesis nula ($P > 0,001$), lo que sugiere la existencia de apareamiento aleatorio.

Tartagal fue la única población en la que se rechazó la hipótesis nula de apareamiento aleatorio antes ($\bar{r}_d = 0,265$; $P = 0,001$; Figura 40 F1) y después de la CC ($\bar{r}_d = 0,152$; $P = 0,001$)

(Tabla 16, Figura 40 F2). Sin embargo, considerando que en el análisis de STRUCTURE se observó que existe subdivisión de la población de Tartagal (Figura 35), lo que estaría produciendo un falso positivo de clonalidad (Milgroom, 1996; Taylor *et al.*, 1999), se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento adicional en la población de Tartagal tomando las K subpoblaciones por separado, antes y después de la CC (Milgroom, 1996; Taylor *et al.*, 1999) (Tabla 16). Antes de la CC, las medidas de DL ($I_A = -0,145$; $\bar{r}_d = -0,145$) no fueron significativas ($P = 1$), razón por la cual no se rechazó la hipótesis de apareamiento aleatorio, por lo que en Tartagal K1 habría recombinación sexual (Figura 41, G1). Al realizar la CC, el valor de \bar{r}_d (-0,447) también fue no significativo ($P = 1$) lo que indica que en Tartagal K1 ocurre recombinación sexual (Figura 41, G2). Por otro lado, la subpoblación Tartagal K2, antes de la CC las medidas de DL ($I_A = 1,322$; $\bar{r}_d = 0,265$) fueron significativas ($P = 0,001$) por lo que se rechazó la hipótesis de asociación aleatoria de alelos, lo que indicó que Tartagal era clonal (Figura 41, H1). Sin embargo, al realizar la CC no se pudo rechazar la hipótesis nula ($P = 0,018$) indicando que en la subpoblación de Tartagal K2 también estaría ocurriendo la recombinación sexual (Figura 41, H2). Es decir, que anteriormente los falsos índices de clonalidad observados estaban sesgados por la subestructuración presente en la población de Tartagal y el modo de reproducción predominante en esta población sería sexual.

Tabla 16. Índice de asociación (I_A), índice de asociación estandarizado (\bar{r}_d), valor de significancia (P) y tipo de reproducción (Repr.) de las poblaciones de *S. sclerotiorum* antes y después de la corrección clonal (CC).

Localidad	Sin CC				Con CC			
	I_A	\bar{r}_d	P	Repr.	I_A	\bar{r}_d	P	Repr.
Orán	1,000	1,000	0,071	Sexual	DI ^a	DI	DI	-
Campichuelo	2,938	0,496	0,001	Clonal	0,905	0,155	0,048	Sexual
Pichanal	2,131	0,428	0,001	Clonal	1,190	0,242	0,003	Sexual
Palma Sola	0,646	0,131	0,018	Sexual	-0,014	-0,003	0,495	Sexual
Gral. Ballivián	1,703	0,287	0,001	Clonal	0,705	0,118	0,005	Sexual
Tartagal	1,320	0,265	0,001	Clonal	0,757	0,152	0,001	Clonal
Tartagal K1 ^b	-0,145	-0,145	1,000	Sexual	-0,428	-0,447	1,000	Sexual
Tartagal K2 ^c	1,322	0,265	0,001	Clonal	0,534	0,107	0,018	Sexual

^aDI: Datos insuficientes.

^bTartagal K1 = Subpoblación K1 observada en STRUCTURE.

^cTartagal K2 = Subpoblación K2 observada en STRUCTURE

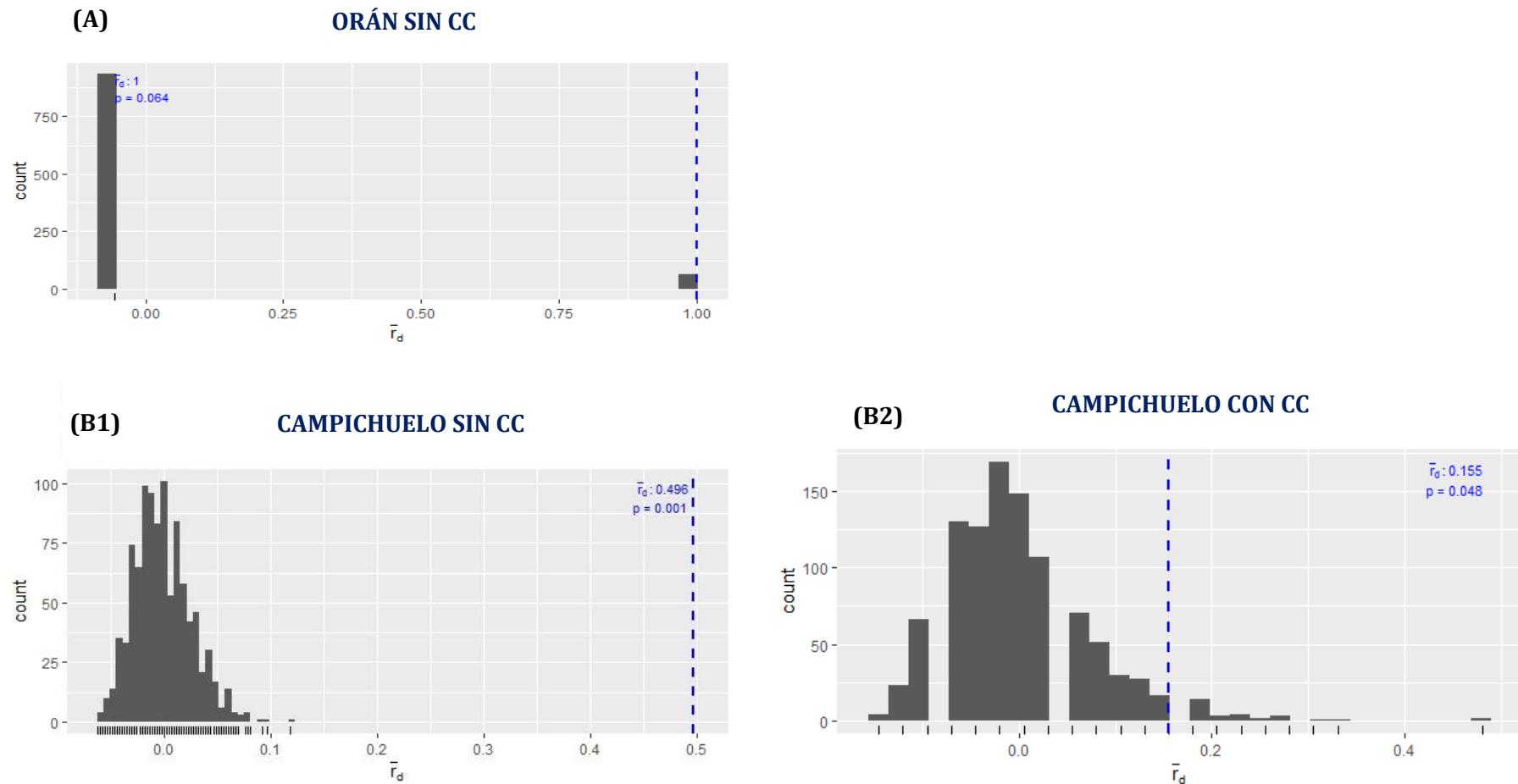


Figura 38. Visualizaciones de las pruebas de desequilibrio de ligamiento, donde los valores observados (líneas discontinuas azules) de I_A y \bar{r}_d se comparan con histogramas que muestran los resultados de 999 permutaciones. (A) Orán sin corrección clonal. (B1) Campichuelo sin corrección clonal (B2) Campichuelo con corrección clonal.

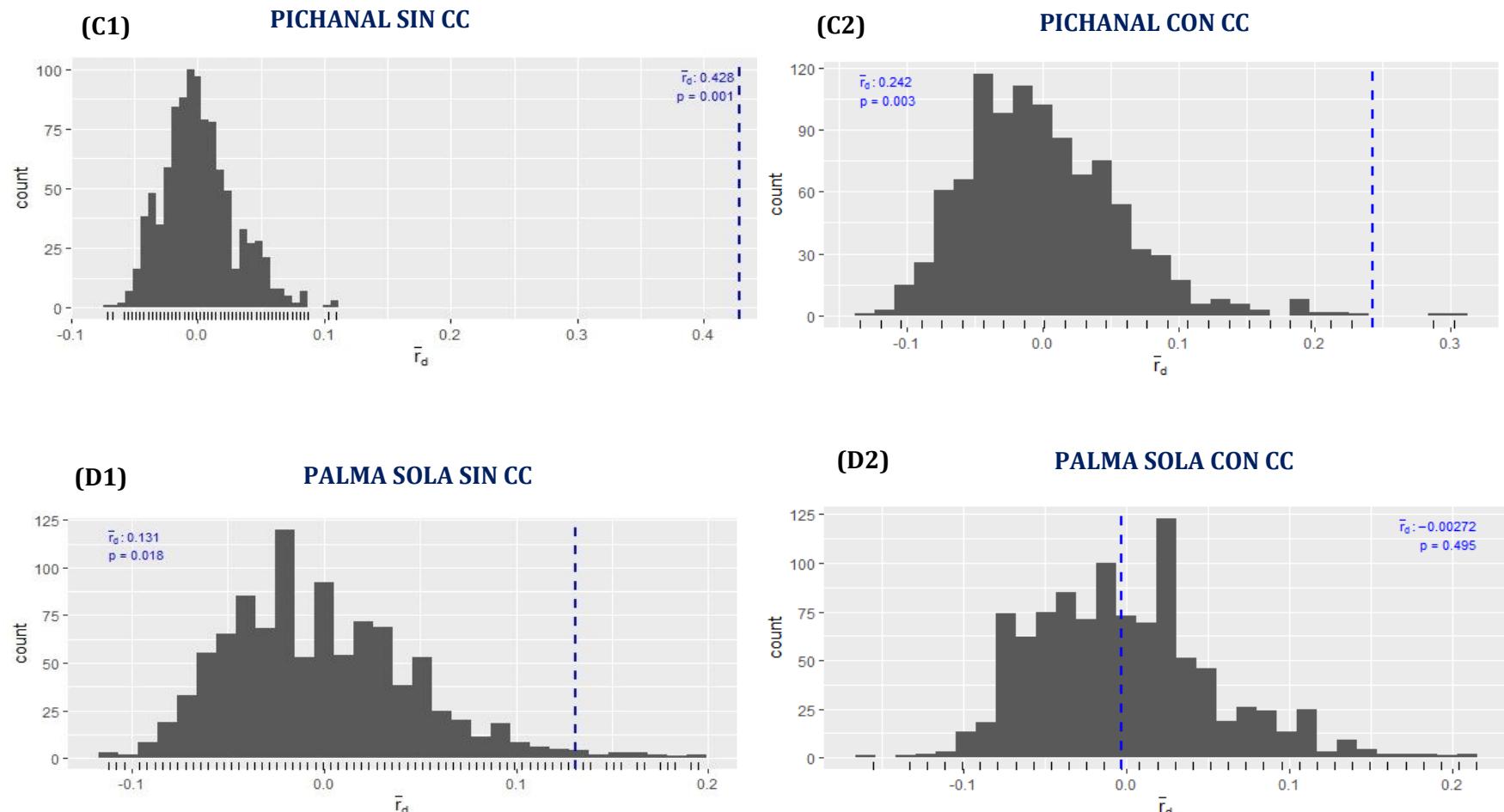


Figura 39. Visualizaciones de las pruebas de desequilibrio de ligamiento, donde los valores observados (líneas discontinuas azules) de I_A y \bar{r}_d se comparan con histogramas que muestran los resultados de 999 permutaciones. (C1) Pichanal sin corrección clonal. (C2) Pichanal con corrección clonal. (D1) Palma Sola sin corrección clonal. (D2) Palma Sola con corrección clonal.

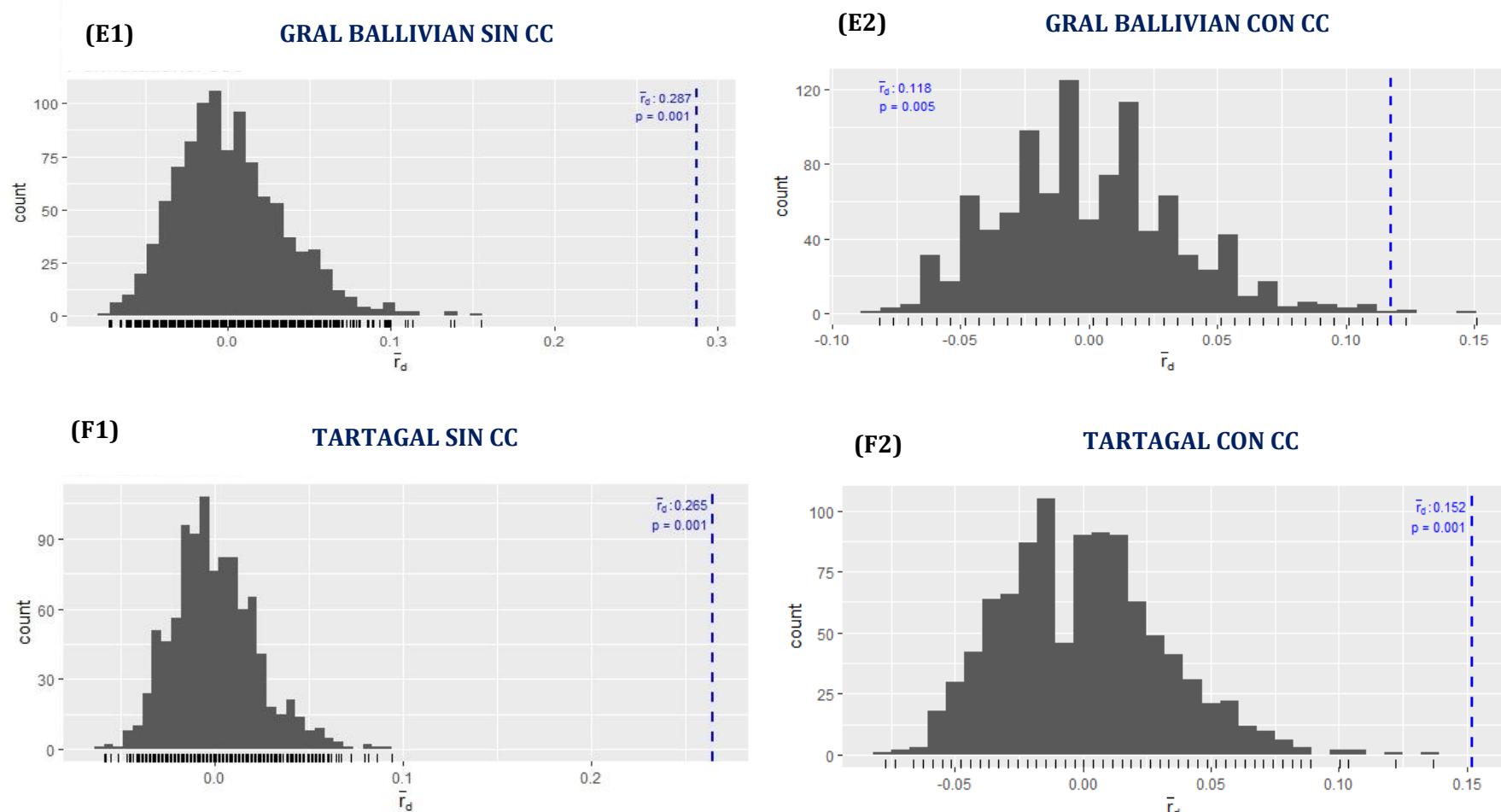


Figura 40. Visualizaciones de las pruebas de desequilibrio de ligamiento, donde los valores observados (líneas discontinuas azules) de I_A y \bar{r}_d se comparan con histogramas que muestran los resultados de 999 permutaciones. (E1) Gral. Ballivián sin corrección clonal. (E2) Gral. Ballivián con corrección clonal. (F1) Tartagal sin corrección clonal. (F2) Tartagal con corrección clonal.

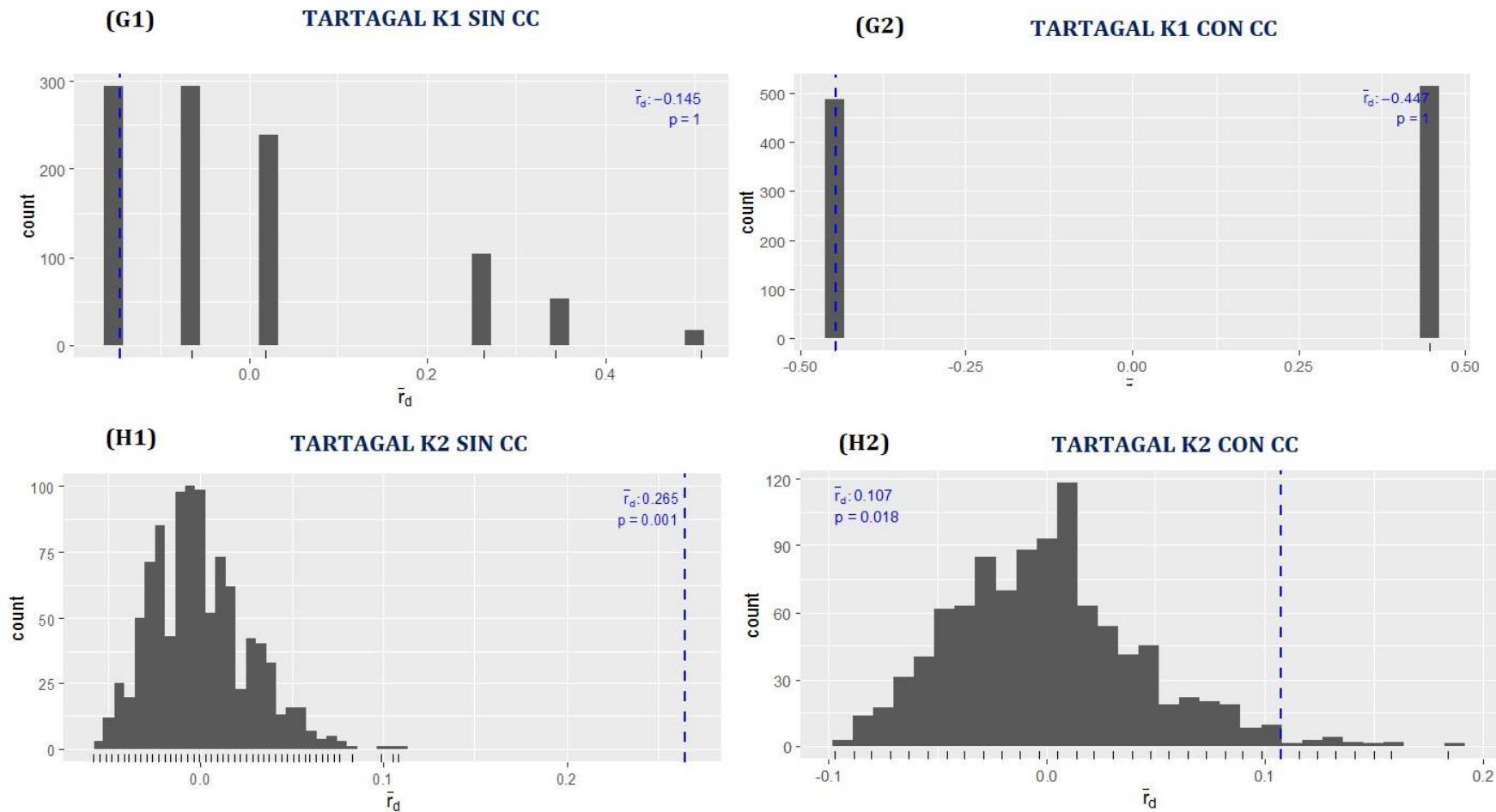


Figura 41. Visualizaciones de las pruebas de desequilibrio de ligamiento, donde los valores observados (líneas discontinuas azules) de I_A y \bar{r}_d se comparan con histogramas que muestran los resultados de 999 permutaciones. (G1) Tartagal K1 sin corrección clonal. (G2) Tartagal K1 con corrección clonal. (H1) Tartagal K2 sin corrección clonal. (H2) Tartagal K2 con corrección clonal.

3.3.7 Desequilibrio de ligamiento entre pares de loci

Para garantizar que el patrón de equilibrio de ligamiento (EL) visto anteriormente no se debió a un único par de loci, se calculó el I_A y \bar{r}_d para todos los pares de loci con su respectivo valor de significancia, antes (Tabla 17) y después (Tabla 18) de la corrección clonal. Si los valores de los índices observados entre un determinado par de loci son significativos se rechaza la hipótesis de apareamiento aleatorio y, por lo tanto, se considera que los loci estarían en DL. Cuando el DL está asociado a una alta proporción de loci esto sugiere que existe predominio de reproducción clonal en la población. En cambio, cuando la mayoría de los loci se encuentran en equilibrio de ligamiento, es decir con apareamiento aleatorio, el tipo de reproducción predominante sería la sexual. Este análisis se realizó para el total de las muestras y para cada una de las poblaciones por separado.

Antes de la CC, el I_A total tuvo un rango de -0,053 a 0,643 y el \bar{r}_d tuvo un rango de -0,070 a 0,643. Para el 71% de las comparaciones entre loci los índices tuvieron valores significativos ($P \leq 0,001$) indicando que estaban en DL, por lo que se rechazó la hipótesis de apareamiento aleatorio. Sin embargo, en el 29% de los casos las comparaciones entre loci fueron no significativas indicando EL entre esos loci (Tabla 17, Figura 42). Debido a la alta proporción de loci en DL, el tipo de reproducción que predominó antes de la CC fue la clonal. En la Figura 42, se observan las diferencias de \bar{r}_d entre los pares de loci y sus respectivos valores de significancia.

Tabla 17. Desequilibrio de ligamiento, calculado antes de la corrección de clones, entre pares de siete loci de microsatélites utilizados para caracterizar todos los aislados de *S. sclerotiorum*. I_A (bajo la diagonal) y \bar{r}_d (sobre la diagonal).

	7-2	9-2	12-2	13-2	106-4	114-4	8-3
7-2	-	0,105 ^{ns}	-0,070 ^{ns}	0,274*	0,325 ^{ns}	0,039 ^{ns}	0,245 ^{ns}
9-2	0,081 ^{ns}	-	0,269*	0,449*	0,278*	0,349*	0,493*
12-2	-0,053 ^{ns}	0,269*	-	0,169*	0,033 ^{ns}	0,158*	0,254*
13-2	0,208 ^{**}	0,449*	0,169*	-	0,318*	0,256*	0,643*
106-4	0,259 ^{ns}	0,277*	0,033 ^{ns}	0,317*	-	0,240*	0,376*
114-4	0,030 ^{ns}	0,349*	0,158*	0,255*	0,240*	-	0,324*
8-3	0,187 ^{ns}	0,493*	0,254*	0,643*	0,375*	0,324*	-

ns: no significativo. * $P \leq 0,001$

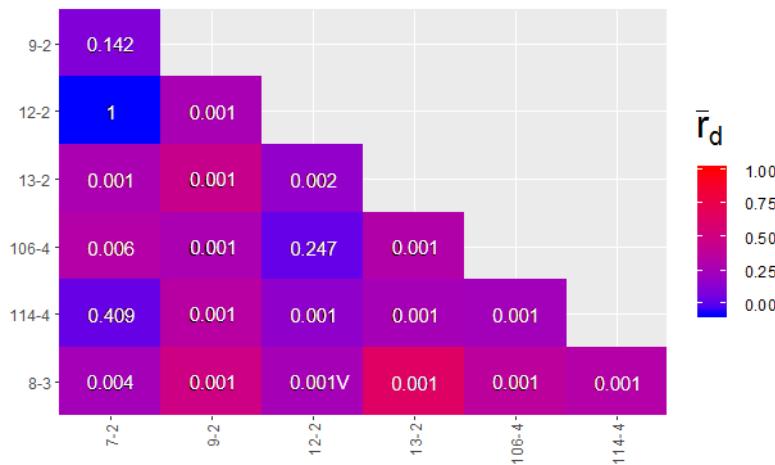


Figura 42. Mapa de calor (heatmap) de los valores del desequilibrio de ligamento (\bar{r}_d) de los siete loci de microsatélites de *S. sclerotiorum*, antes de la corrección de clones. Dentro de los cuadrados figura el valor de P para su correspondiente \bar{r}_d .

Después de la CC, los índices I_A y \bar{r}_d tuvieron un rango más acotado. El I_A tuvo un rango de -0,058 a 0,292 y el \bar{r}_d tuvo un rango de -0,061 a 0,292 (Tabla 18). A diferencia de lo que ocurrió en las comparaciones antes de la CC, sólo el 14% de las comparaciones entre loci mostraron índices significativos ($P \leq 0,001$) indicando DL, mientras que el 86% resultaron no significativas ($P > 0,001$) indicando una alta proporción de loci en EL, es decir con apareamiento aleatorio, por lo que el tipo de reproducción predominante fue la sexual (Tabla 18). En la figura 43 se observan las diferencias de \bar{r}_d entre los pares de loci y sus respectivos valores de significancia.

Tabla 18. Desequilibrio de ligamiento después de la corrección de clones, calculado entre pares de siete loci de microsatélites utilizados para caracterizar todos los aislados de *S. sclerotiorum*. I_A (abajo la diagonal); \bar{r}_d (sobre la diagonal).

	7-2	9-2	12-2	13-2	106-4	114-4	8-3
7-2	-	0,018ns	-0,061ns	0,280 ns	0,288ns	-0,014ns	0,136ns
9-2	0,017 ns	-	0,096ns	0,192 ns	0,103ns	0,129 ns	0,251*
12-2	-0,058ns	0,096 ns	-	0,032ns	-0,053ns	0,022ns	0,094ns
13-2	0,262 ns	0,192 ns	0,032ns	-	0,105ns	0,061ns	0,292*
106-4	0,267ns	0,103 ns	-0,053ns	0,105ns	-	0,065ns	0,171 ns
114-4	-0,013ns	0,128 ns	0,022ns	0,060ns	0,065ns	-	0,177*
8-3	0,127 ns	0,251*	0,094ns	0,292*	0,171ns	0,176*	-

ns: no significativo * $P \leq 0,001$

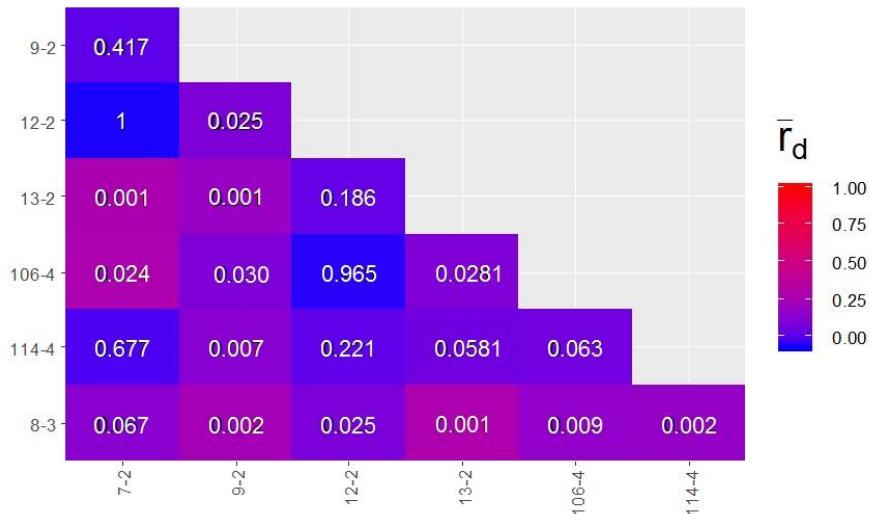


Figura 43. Mapa de calor (heatmap) de los valores del desequilibrio de ligamiento (\bar{r}_d) de los siete loci de microsatélites de *S. sclerotiorum*, después de la corrección de clones. Dentro de los cuadrados figura el valor P para su correspondiente \bar{r}_d .

Al evaluar las comparaciones entre pares de loci por población antes de la CC (Anexo, Figura A1), en la población de Orán se observó una única comparación, entre los loci 12-2 y 13-2 ($\bar{r}_d = 1; P = 0,05$) ya que el resto de los loci serían monomórficos. Este resultado es el causante del falso positivo de equilibrio de ligamiento de la población de Orán visto anteriormente (Tabla 16). Debido a que no hay suficientes comparaciones entre loci para apoyar el supuesto de equilibrio de ligamiento, se rechaza la hipótesis nula de asociación aleatoria de alelos y, por lo tanto, la población de Orán sería clonal.

En las poblaciones restantes, antes de la corrección de clones se observaron numerosas comparaciones entre distintos loci (Anexo, Figura A1), con valores significativos lo que indica que el desequilibrio de ligamiento observado por población no se debió a un único par de loci. En la mayoría de las poblaciones, más del 80% de las comparaciones entre loci resultaron no significativas ($P > 0,001$), excepto Tartagal, que tuvo el 33% de las comparaciones entre loci significativas ($P < 0,001$).

Después de la corrección de clones, se observó una disminución de comparaciones entre loci debido a la eliminación de datos (Anexo, Figura A2), aun así, se comprobó que el equilibrio de ligamiento observado no se debió a un solo par de loci. En todas las poblaciones, el 100% de las comparaciones entre loci fueron no significativas ($P > 0,001$), indicando apareamiento aleatorio de alelos (Anexo, Figura A2).

3.3.8 Relación entre MLH y MCG

En los 109 aislados de *S. sclerotiorum* se encontraron 50 MCG y 30 haplotipos multilocus (MLH) de microsatélites. La cantidad de MLH y MCG observados varió en cada localidad (Figura 44). Como se mencionó en el capítulo anterior, todos los MCG fueron específicos de cada localidad (Figura 45). Mientras que el 40% de los haplotipos MLH se compartieron entre localidades.

De los 30 haplotipos de microsatélites encontrados, sólo 11 haplotipos (37%) estuvieron asociados a dos o más MCG con un máximo de 11 MCG (Tabla 19). El haplotipo MLH23, que tuvo el mayor número de aislados (39) es el que se asoció a 11 MCG diferentes. El resto de los MLH se asoció de 2 a 6 MCG diferentes (Tabla 19).

Con respecto a los MCG, sólo el 18% (9 MCG) se asoció a dos o más haplotipos, con un máximo de 4 MLH (MCG14). El resto de los MCG (82%), se asoció a un sólo haplotipo, pero no único, es decir, que estos haplotipos podían compartirse con otros MCG y encontrarse en distintas localidades. Por ejemplo, el MCG4 se asoció con el MLH6, pero este haplotipo además se asoció al MCG5 (Tabla 19).

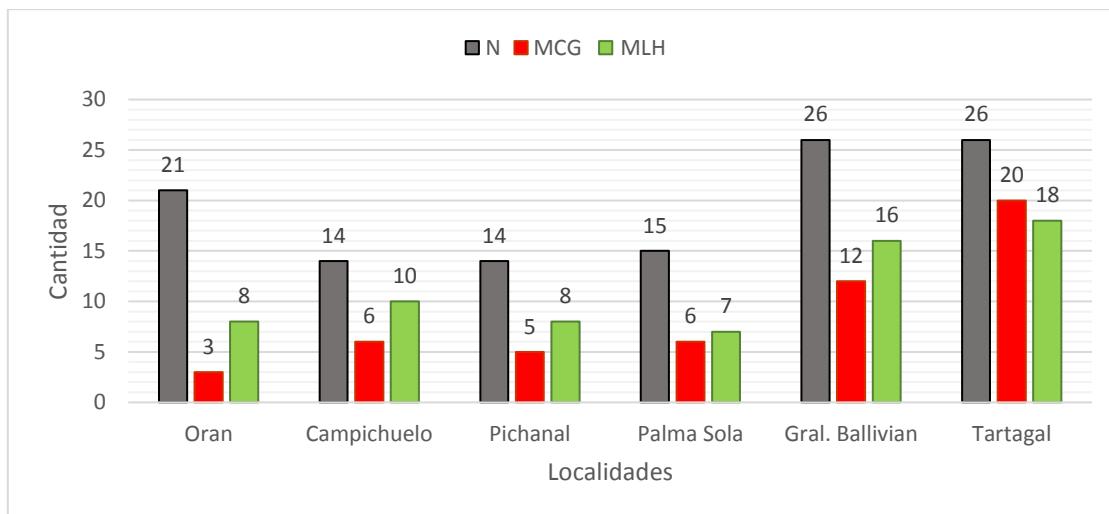


Figura 44. Número de aislados de *S. sclerotiorum* (N), grupos de compatibilidad micelial (MCG) y haplotipos de microsatélites (MLH) observados en cada población.

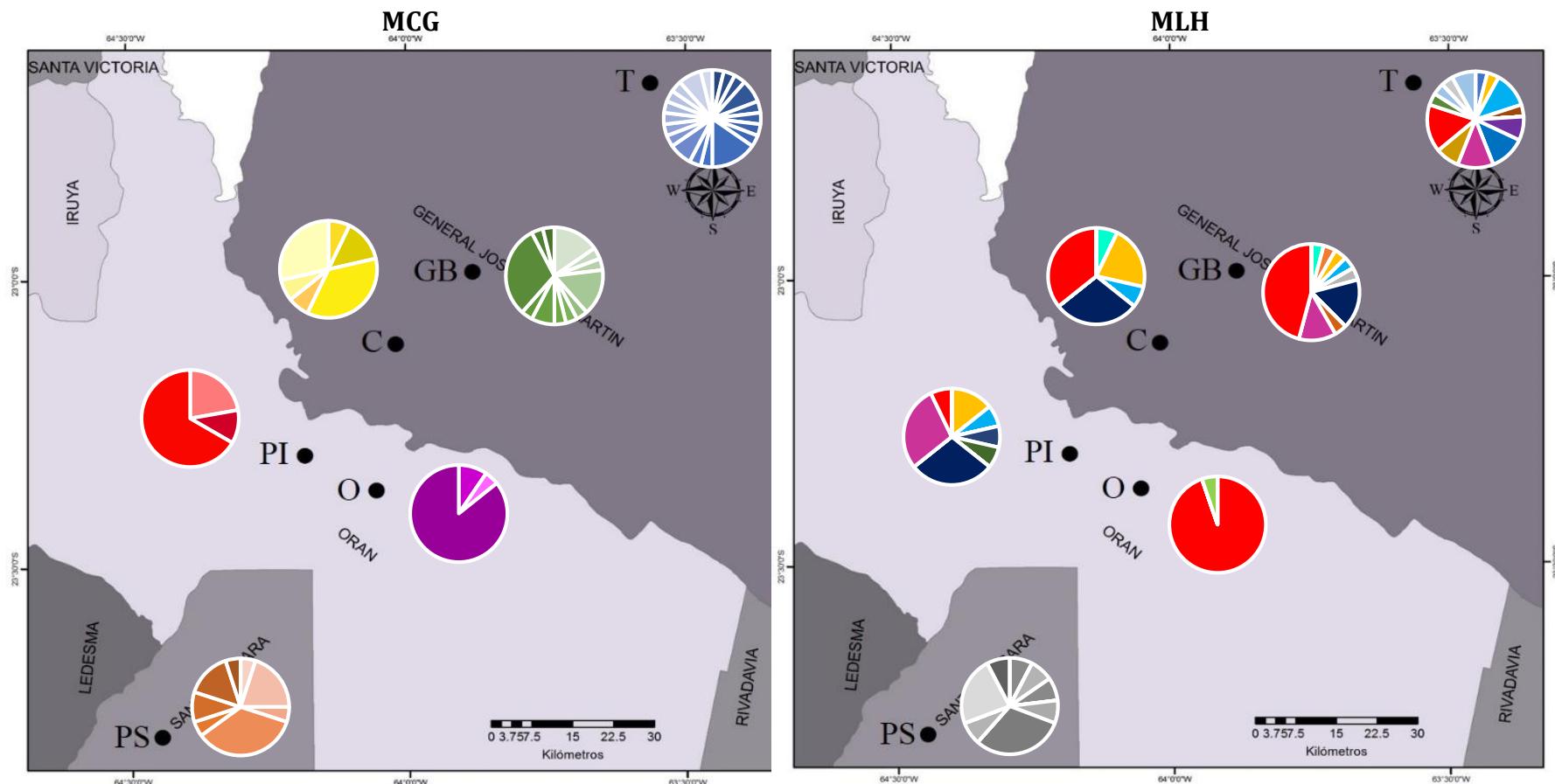


Figura 45. Mapas de la distribución de los MCG (izquierda) y los haplotipos MLH (derecha) por localidad muestreada. PS: Palma Sola, O: Orán, PI: Pichanal, C: Campichuelo, GB: Gral Ballivián, T: Tartagal. Los MCGs, específicos de su sitio, se representan por escalas monocromáticas, mientras que los MLH, compartidos entre sitios (excepto Palma Sola), se representan por diferentes colores.

Tabla 19. Designaciones de los haplotipos SSR y frecuencias asociadas con el grupo de compatibilidad micelial (MCG) de los aislados de *S. sclerotiorum*.

MCG	Frecuencia y designación de haplotipos SSR ^a					
	Orán	Campilchuelo	Pichanal	Palma Sola	Gral. Ballivián	Tartagal
2	30(1)					
3	23^b(18)					
4		6(1)				
5		6(2)				
6		23(5)				
7		7(1)				
8		1(1)				
9		17(4)				
10			17(2)			
11			17(1)			
12		6(1)	23(1)	21(4)		
13			11(1)			
14		17(1)	6(1)	7(1)		
			12(1)			
15				14(1)		
16				14(3)	26(3)	
17				3(1)		
18				9(1)		
19				10(1)	29(1)	
20				16(1)		
21				13(1)		
22					15(1)	17(2)
23					1(1)	
24					2(1)	
25					4(1)	17(2)
26						23(1)
27						23(1)
28						20(1)
29						23(2)
30						23(1)
31						23(5)
						21(3)
33						7(1)
34						21(1)
35						21(1)
36						28(1)
37						23(2)
38						19(1)
39						6(1)
40						7(1)
41						18(1)
42						23(2)
43						7(1)
44						18(1)
45						8(1)
46						19(1)
47						5(1)
48						22(1)
49						7(1)
						21(1)
						27(1)

Tabla 19. (Continuación).

Frecuencia y designación de haplotipos SSR ^a						
MCG	Orán	Campichuelo	Pichanal	Palma Sola	Gral. Ballivián	Tartagal
50						24(1)
51						25(1)
52						28(1)
MLH	2	5	7	8	9	13

^a La frecuencia de haplotipos SSR es la cantidad de aislados muestreados con un único haplotipo que pertenece al MCG designado. Las frecuencias están entre paréntesis, por ejemplo, para el MCG 12 en Pichanal, un aislado tuvo el haplotipo 6, otro aislado tuvo el haplotipo 23 y cuatro aislados tuvieron el haplotipo 21.

^b Los números en negrita indican cada uno de los x haplotipos asociados con más de un MCG, por ejemplo, el haplotipo 1 se asoció con MCG 8 y MCG 22.

3.3.9 Análisis de correlación

La prueba de Mantel se realizó para determinar la relación entre la variación genética medida por las matrices de distancia calculadas en base a los datos de MCG y MLH. La correlación entre los haplotipos MLH con respecto a los MCG y distancia geográfica no fue significativa. La comparación entre los MCG y la distancia geográfica entre ubicaciones reveló una correlación significativa (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis de correlación entre grupos de compatibilidad micelial (MCG), haplotipos MLH y distancia geográfica entre localidades (*r*: diagonal inferior; *P*: diagonal superior).

	MCG	MLH	Distancia geográfica
MCG	-	0,997	< 0,0001***
MLH	-0,16	-	0,127
Distancia geográfica	0,27	0,07	-

*** $P \leq 0,0001$

3.4 DISCUSIÓN

En el presente capítulo, se analizó la estructura poblacional y se infirió el comportamiento reproductivo de *S. sclerotiorum* a partir del análisis molecular de 109 aislados de seis lotes comerciales de poroto ubicados en la principal área de producción de Argentina. Los resultados obtenidos revelaron un alto nivel de variabilidad entre los aislados y la ocurrencia de ambos tipos de reproducción, pero con predominancia de la recombinación sexual en la mayoría de las poblaciones analizadas.

En el total de los aislados se encontraron 30 haplotipos multilocus (MLH), de los cuales 24 (80%) fueron únicos, y 18 de esos estaban compuestos por un solo aislado. El 20% de los MLH, compuesto por el 69% (75) de los aislados, se compartieron entre lotes. En contraste a los MCG que fueron todos específicos de cada sitio, como se mencionó en el capítulo anterior. En general, los haplotipos se encontraron en frecuencias bajas, excepto por el haplotipo MLH23 que, además, estuvo presente en todas las localidades muestreadas, excepto en Palma Sola. La presencia de muchos haplotipos, pero con baja frecuencia, podría ser indicativo de dispersión por ascosporas transportadas por el aire desde campos adyacentes, o mediante el transporte de semilla infestada con esclerocios entre las áreas, dado que en algunos casos se comparten maquinarias agrícolas en la zona. De manera similar, en las áreas donde predomina un solo haplotipo, es posible que el transporte de esclerocios fuera limitado.

Las poblaciones con niveles altos de diversidad genética proporcionan un amplio espectro de genotipos que pueden contribuir a una evolución rápida del patógeno facilitando su adaptación a las medidas de control, por ejemplo el uso de fungicidas (Carmona & Sautua, 2017), lo que implica un gran desafío en el manejo de la esclerotinia del poroto. Estudios previos, en los que se utilizaron marcadores microsatélites, reportaron niveles altos de diversidad genotípica en aislados de *S. sclerotiorum* obtenidos de diferentes cultivos (Atallah *et al.*, 2004; Sexton & Howlett, 2004; Mert-Türk *et al.*, 2007; Hemmati *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2011). En este estudio, la diversidad genotípica, varió ampliamente entre las localidades. La población de Tartagal fue la más diversa, con pocos genotipos duplicados y distribuidos uniformemente, mientras que Orán fue la menos diversa, donde prácticamente no hubo genotipos diferentes entre sí. A pesar de las diferencias, hubo genotipos compartidos entre todas las poblaciones, excepto en Palma Sola. Estos resultados coinciden con la alta variabilidad intrapoblacional revelada por la técnica de compatibilidad micelial y por el genotipado con marcadores URP (capítulo 2). Además, estos hallazgos están de acuerdo con la variabilidad intra- e inter- poblacional reportada para *S. sclerotiorum* en

el cultivo de poroto en Brasil (Gomes *et al.*, 2011; Litholdo Junior & Gomes, 2011; Lehner *et al.*, 2017b) y en otros cultivos en Argentina (Durman *et al.*, 2003), Irán (Hemmati *et al.*, 2009; Karimi *et al.*, 2012a), Estados Unidos (Atallah *et al.*, 2004; Dunn *et al.*, 2017) y Australia (Sexton & Howlett, 2004). El transporte de semillas contaminadas con esclerocios o semillas colonizadas con micelio (Tu, 1988), de un campo a otro, podría haber contribuido a la introducción de haplotipos desde una localidad hacia otras. Mientras que otros factores como la falta de rotación con cultivos no hospedantes, el deficiente control de malezas hospedantes y el uso de variedades altamente susceptibles son algunos de los factores que favorecen el mantenimiento de la variabilidad genética en el tiempo.

Conocer si existe diferenciación genética entre las poblaciones es de gran interés para el manejo de la enfermedad ya que la ausencia de la misma indicaría que las prácticas de manejo que son efectivas para una población probablemente sean efectivas en todas las poblaciones similares de la zona. El análisis de los datos sin corrección clonal mostró una diferenciación significativa entre las poblaciones ($\Phi_{ST} = 0,086$; $P < 0,001$), con sólo dos poblaciones diferenciadas significativamente del resto ($P < 0,001$). Una de ellas, Palma Sola, que es la más distante geográficamente, y la otra, Orán, que a pesar de encontrarse cerca de Pichanal y Campichuelo fue significativamente diferente de ellas ($P < 0,0001$). Los niveles de flujo génico observados entre poblaciones fueron de moderado a alto. Sin embargo, en base a los datos con corrección clonal las poblaciones no mostraron diferenciación significativa ($\Phi_{ST} = -0,027$; $P = 0,655$). En concordancia, en la mayoría de los casos, las distancias genéticas no se correlacionaron con las distancias geográficas. La falta de diferenciación genética entre las poblaciones de este patógeno ubicadas en campos a distancias menores a 400 km de distancia se ha reportado anteriormente en Australia (Sexton & Howlett, 2004; Ekins *et al.*, 2011), Nueva York (Dunn *et al.*, 2017) y Washington (Atallah *et al.*, 2004). El movimiento de esclerocios entre los campos y las ascosporas transportadas por el aire podrían ser los responsables de los niveles de flujo génico y la causa de la falta de diferenciación significativa entre poblaciones (Milgroom, 1996). El flujo de genes, además, está asociado con la ausencia de alelos privados o únicos. En este estudio, de los 23 alelos amplificados, se encontró solamente un alelo privado en la población de Palma Sola, población más diferenciada con respecto al resto.

En los análisis de agrupamientos se corroboró la falta de diferenciación de las poblaciones. El análisis de agrupamiento bayesiano sugirió dos grupos ($K=2$), tanto antes como después de la corrección de clones. La mayoría de las localidades estuvieron compuestas por aislados de las dos poblaciones inferidas por STRUCTURE, mientras que los

aislados de Palma Sola y Orán se correspondieron a una de las dos poblaciones. En la red de expansión mínima, creada a partir de la distancia genética de Bruvo, se observó la ausencia de estructuración entre las poblaciones, ya que la mayoría de los genotipos se encontraron estrechamente relacionados entre sí evidenciado por las distancias pequeñas entre los haplotipos ubicados en el centro de la red. Hubo tres agrupaciones que se alejaron del centro, entre los cuales se encontraron la mayoría de los haplotipos de Palma Sola, sugiriendo, una vez más, cierta diferenciación de esta población con respecto a las demás poblaciones. Los otros dos grupos no fueron específicos de una localidad. Este hallazgo fue similar a las redes de expansión mínimas reportadas en estudios, donde hubo un agrupamiento mínimo basado en la ubicación geográfica (Lehner *et al.*, 2015b; Dunn *et al.*, 2017). Estos resultados, combinados con la falta de agrupamientos evidenciados en el dendrograma y en el ACoP sugieren que no existen poblaciones puramente clonales o recombinantes entre las poblaciones analizadas, sino que todos los sitios analizados muestran evidencias de clonalidad y recombinación.

Conocer el modo reproductivo de las poblaciones de *S. sclerotiorum* en nuestra región es fundamental ya que las poblaciones con reproducción sexual tienen un mayor potencial para adaptarse a la presión de selección ejercida por el uso de fungicidas debido al mayor número de combinaciones genéticas únicas, y además, tienen mayor probabilidad de que el patógeno supere la resistencia de la planta hospedante (Milgroom, 1996). Como se mencionó anteriormente, en las poblaciones con recombinación no se observa asociación entre MCG y haplotipos moleculares, mientras que en las poblaciones clonales es común encontrar cada MCG asociado a un solo MLH (Cubeta *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2011). En el presente trabajo, se encontraron 15 casos de clones, donde dos o más aislados pertenecían al mismo MCG y compartían el mismo haplotipo. Sin embargo, hubo nueve casos donde dos o más aislados del mismo MCG tenían diferentes haplotipos SSR; y diez casos donde aislados que pertenecían a dos o más MCG tuvieron el mismo haplotipo SSR. La ausencia de asociación entre marcadores independientes, como son los SSR y los MCG, fueron reportadas en estudios anteriores (Lehner *et al.*, 2015b; Kamvar *et al.*, 2017; Lehner & Mizubuti, 2017a) dando indicios de recombinación. Sin embargo, la fracción clonal total, que describe la proporción de aislados originados en la reproducción asexual, fue del 72,5%. Las fracciones clonales en base a SSR de las poblaciones de Brasil (78%) y Nueva York (72%) también fueron similares y ambas fueron reportadas como predominantemente clonales (Lehner *et al.*, 2017b).

Sin embargo, la inferencia del comportamiento reproductivo predominante en las poblaciones no debe basarse únicamente en la variabilidad genética observada en las

mismas, sino que es necesario además realizar un análisis exhaustivo para identificar la existencia de desequilibrio de ligamiento entre los loci analizados. Una de las medidas más utilizadas para medir el desequilibrio de ligamiento multilocus y detectar la ocurrencia de reproducción clonal o sexual es el índice de asociación (Brown & Weir, 1983; Smith *et al.*, 1993). También es necesario detectar si hay subdivisión de la población a través del análisis en STRUCTURE, ya que puede producir falsos positivos de clonalidad (Milgroom, 1996; Taylor *et al.*, 1999). Numerosos estudios han utilizado este índice en base a datos de microsatélites en diversos cultivos hospedantes y diferentes regiones del mundo (Atallah *et al.*, 2004; Sexton & Howlett, 2004; Sexton *et al.*, 2006; Hemmati *et al.*, 2009; Attanayake *et al.*, 2013, 2014, Clarkson *et al.*, 2013, 2017; Aldrich-Wolfe *et al.*, 2015; Lehner *et al.*, 2017b). Es necesario tener en cuenta que las conclusiones de este análisis deben realizarse luego de realizar la corrección de clones, para reducir el sesgo que producen los datos sobrerrepresentados y aumentar la sensibilidad en la detección de recombinación (Milgroom, 1996; Taylor *et al.*, 1999). Esto pudo comprobarse en el presente estudio, ya que en base a los datos sin corrección clonal, los índices calculados (I_A y \bar{r}_d) sugirieron que en la mayoría de las poblaciones (Campichuelo, Pichanal, Gral. Ballivián y Tartagal) existía desequilibrio de ligamiento ($P = 0,001$) y se rechazó la hipótesis nula de asociación aleatoria de alelos, es decir, indicando clonalidad. Mientras que, en Orán y Palma Sola las poblaciones estaban en equilibrio de ligamiento, sugiriendo recombinación. Sin embargo, en base a los datos con corrección de clones se detectó la ocurrencia de recombinación en todas las poblaciones, excepto en Tartagal. Este resultado estuvo además respaldado por el 100% de las comparaciones no significativas entre los pares de loci. Luego, considerando la subdivisión que reveló el análisis de estructura poblacional en STRUCTURE se calcularon nuevos índices que indicaron que Tartagal poseía reproducción sexual y que la subestructuración habría provocado el sesgo hacia la clonalidad (Milgroom, 1996; Taylor *et al.*, 1999). Por otro lado, en Orán, cuando se analizaron las comparaciones entre pares de loci, se observó que el equilibrio de ligamiento estaba dado por un solo par de loci, por lo que se rechazó la hipótesis de asociación aleatoria de los alelos, indicando que en realidad el tipo de reproducción predominante era la clonal.

Como se mencionó anteriormente, algunos estudios sugirieron que los aislados de *S. sclerotiorum* de climas subtropicales y tropicales son más variables que las poblaciones de climas templados (Carbone & Kohn, 2001; Attanayake *et al.*, 2013; Lehner & Mizubuti, 2017a) debido a que el hongo tendría la posibilidad de experimentar más ciclos reproductivos en climas más cálidos (Carbone & Kohn, 2001; Attanayake *et al.*, 2013). Sin embargo, Lehner & Mizubuti (2017a) argumentaron que la alta variabilidad observada en

las regiones subtropicales y tropicales estaría sesgada por un mayor número de estudios realizados con marcadores de SSR en esas regiones. Más aun, en regiones tropicales en Brasil, se reportaron poblaciones con estructura clonal en cultivos de poroto (Lehner *et al.*, 2015b, 2017b). Si bien existen estudios en Brasil que sugieren la ocurrencia de recombinación (Gomes *et al.*, 2011; Litholdo Junior & Gomes, 2011), no se realizaron los análisis específicos de desequilibrio de ligamiento. En el presente trabajo, los resultados generados a partir de los análisis con los datos de microsatélites, al igual que lo observado empleando los marcadores URP (capítulo 2), sugieren la ocurrencia de ambos tipos de reproducción, clonal y sexual, en las poblaciones tropicales de *S. sclerotiorum* en la principal zona de producción de poroto de Argentina. Sin embargo, los SSR permitieron inferir con mayor precisión el tipo de reproducción predominante en cada sitio, siendo más frecuente la reproducción sexual, en coincidencia con lo planteado para poblaciones de zonas tropicales y subtropicales (Carbone & Kohn, 2001; Attanayake *et al.*, 2013; Lehner & Mizubuti, 2017a). Este sistema de reproducción mixta ayuda a mantener niveles altos de diversidad genética, permitiéndole al patógeno evolucionar más rápidamente, y en consecuencia, como se mencionó anteriormente, aumenta la probabilidad de que el patógeno supere la resistencia del hospedante y/o que por presión de selección se seleccionen individuos que porten genes de resistencia a los fungicidas (Milgroom, 1996). Una mejor comprensión de la dinámica poblacional del patógeno a lo largo del tiempo proporcionará información sobre la contribución relativa de ambos modos de reproducción a la diversidad genética, en diferentes lugares y tiempos, lo cual es relevante para seleccionar las estrategias de mejoramiento más adecuadas para obtener resistencia duradera.

El presente estudio proporciona, por primera vez, información sobre la estructura poblacional y el comportamiento reproductivo de *S. sclerotiorum* asociado con esclerotinia en la principal área de producción de poroto en Argentina. Los resultados obtenidos contribuyen al desarrollo de estrategias de manejo sustentable, como ser por ejemplo el desarrollo de variedades con resistencia genética, el control biológico y químico, y las prácticas culturales, con el objetivo de minimizar las pérdidas de rendimiento causadas por la esclerotinia en la producción de poroto.

CAPÍTULO IV

Caracterización de germoplasma para la resistencia a Esclerotinia



4.1 INTRODUCCIÓN

La esclerotinia es una enfermedad endémica en las principales zonas productoras de poroto de Argentina. El manejo integrado de la enfermedad se realiza principalmente con fungicidas durante la etapa de floración, en combinación con un mayor espaciamiento entre surcos y utilizando variedades con crecimiento erecto, ya que contribuyen a la creación de un microambiente desfavorable para *S. sclerotiorum* y también facilita la cosecha mecánica (Miklas & Singh, 2007; Miklas *et al.*, 2013). A pesar de que los fungicidas proporcionan un buen control de la enfermedad, son costosos y resultan ineficaces en casos con mucha presión de inóculo. La mejor estrategia para minimizar las pérdidas de rendimiento y reducir los costos de producción en un contexto de cultivo sostenible, es el uso de variedades con resistencia genética a esclerotinia.

La resistencia contra este patógeno es compleja, condicionada tanto por los mecanismos de escape como por los mecanismos fisiológicos (Miklas *et al.*, 2001). Los mecanismos de escape, que generan condiciones que limitan la infección y el progreso de la enfermedad, incluyen rasgos morfológicos relacionados con la arquitectura de la planta y rasgos fenológicos (Kolkman & Kelly, 2003). Las características tales como la estructura erecta (hábito de crecimiento Tipo I y Tipo II), un canopeo (o dosel) poroso abierto, resistencia al vuelco (lodging resistance) y la madurez temprana contribuyen a reducir el daño producido por la esclerotinia (Schwartz & Pastor-Corrales, 1988; Kolkman & Kelly, 2003; Miklas *et al.*, 2013). La resistencia fisiológica se refiere a la presencia de genes que activan mecanismos de defensa de la planta que inhiben la infección o detienen el desarrollo del patógeno en los tejidos del hospedante (Miklas *et al.*, 2013).

Es difícil discernir en el campo entre los mecanismos de escape y la resistencia fisiológica, debido a la influencia adicional del medio ambiente. Sin embargo, en el invernadero, con condiciones controladas, se puede identificar la resistencia fisiológica en ausencia de escape (Vuong *et al.*, 2004), pero no a la inversa. Por esta razón, es de suma importancia aplicar una metodología rápida, precisa y confiable para detectar la verdadera resistencia fisiológica. Además, Chung *et al.* (2008), Mkwaila *et al.* (2011), y Soule *et al.* (2011) informaron una mayor heredabilidad de la resistencia fisiológica basada en pruebas de invernadero que aquellas basadas en evaluaciones a campo.

Aunque la infección por ascosporas en el poroto ocurre principalmente después de que se inicia la floración, la infección micelial en cultivos susceptibles puede ocurrir en cualquier etapa del cultivo en condiciones climáticas favorables bajo la presencia del patógeno (Steadman & Boland, 2005). Por lo tanto, la detección de las fuentes de resistencia

fisiológica a esclerotinia requiere de técnicas confiables de evaluación de la enfermedad durante todas las etapas de desarrollo del cultivo y además, de una comprensión adecuada de la variabilidad patogénica de *S. sclerotiorum* (Kull *et al.*, 2003). En consecuencia, el germoplasma de poroto debe analizarse frente los aislados apropiados de *S. sclerotiorum*, preferiblemente genéticamente distintos y recolectados en las regiones donde se liberarán las variedades (Schwartz & Singh, 2013). Existen diferentes métodos de detección de resistencia fisiológica en invernadero (Schwartz & Singh, 2013), pero el más utilizado en los últimos años es el método denominado *Straw test* modificado (Schwartz *et al.*, 2006). Esta metodología permite el uso de uno o más aislados de *S. sclerotiorum*, múltiples inoculaciones en la misma planta y en diferentes etapas de la fase vegetativa y reproductiva a lo largo de todo el ciclo de cultivo del poroto (Terán & Singh, 2009b; Singh *et al.*, 2014a), permitiendo de esta manera identificar genotipos con niveles altos de resistencia fisiológica a la enfermedad (Pascual *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2014a; Viteri *et al.*, 2015a).

Actualmente, no existen variedades comerciales de poroto disponibles con resistencia a esclerotinia, pero si se han reportado niveles bajos de resistencia, en genotipos de origen mesoamericano (Ender & Kelly, 2005; Pascual *et al.*, 2010; Mkwaila *et al.*, 2011) y en porotos silvestres (Terpstra & Kelly, 2008; Mkwaila *et al.*, 2011), y niveles altos de resistencia en genotipos de origen andino (Genetics *et al.*, 1998; Maxwell *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007; Pascual *et al.*, 2010; Mkwaila *et al.*, 2011; Soule *et al.*, 2011; Pérez-Vega *et al.*, 2012). Además, se ha realizado la introgresión de niveles más altos de resistencia a esclerotinia a partir de cruzamientos interespecíficos con especies de *Phaseolus* del pool genético secundario como ser *P. coccineus*, *P. polyanthus* y *P. costaricensis* (Schwartz *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2009b, 2013, 2014a).

Entre los porotos de origen andino con resistencia a esclerotinia se encuentra la línea A 195 desarrollada por Singh *et al.* (Singh *et al.*, 2007) en el CIAT, a partir del cruce entre 'Red Kloud' x 'ICA 10009'. Esta línea presenta un hábito de crecimiento determinado tipo I y tiene una semilla de color beige de tamaño grande (54gr/100 semillas). En cuanto a resistencias genéticas, la línea A 195 posee el gen *I* para la resistencia a virus del mosaico común (BCMV), es resistente a mancha angular [*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris] y posee niveles moderados de resistencia al calor y a la sequía. La determinación genética de la resistencia a esclerotinia en la línea A 195 está dada por los loci de carácter cuantitativo (QTLs) WM2.2, WM7.1, y WM8.3 (Soule *et al.*, 2011). En numerosos estudios se observaron altos niveles de resistencia de A 195 a esclerotinia (Terán & Singh, 2009a; Pascual *et al.*, 2010; Lehner *et al.*, 2015a; Robison *et al.*, 2018), pero también existen reportes de niveles de resistencia intermedia (Pérez-Vega *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009b, 2016).

En los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la respuesta frente a este patógeno. Se ha reportado que la resistencia fisiológica y los mecanismos de escape se heredan cuantitativamente con una heredabilidad baja a moderada (Park *et al.*, 2001; Miklas *et al.*, 2004). En poroto se han identificado al menos 35 QTLs asociados a la resistencia a esclerotinia (Miklas *et al.*, 2001, 2004; Park *et al.*, 2001; Kolkman & Kelly, 2003; Ender & Kelly, 2005; Chung *et al.*, 2008; Terpstra & Kelly, 2008; Mkwaila *et al.*, 2011; Soule *et al.*, 2011; Pérez-Vega *et al.*, 2012). Entre los QTLs identificados, 13 se co-localizaron con 13 QTLs asociados con los mecanismos de escape de la enfermedad (Miklas *et al.*, 2013). Sin embargo, los loci de rasgo cuantitativo han sido difíciles de introgresar en cultivos comerciales de alto rendimiento (Miklas *et al.*, 2006; Miklas & Singh, 2007).

En los capítulos anteriores se ha demostrado la existencia de variabilidad y la ocurrencia de ambos tipos de reproducción en las poblaciones de *S. sclerotiorum* de la principal área de cultivo de poroto en Argentina. En el presente capítulo se evaluó la reacción de líneas y variedades comerciales de poroto pertenecientes a la colección de trabajo del programa de mejoramiento del INTA EEA Salta frente a cinco aislados genéticamente distintos y representativos de la región, con el objetivo de contribuir al desarrollo de variedades con resistencia duradera a esclerotinia.

Las preguntas a responder en este capítulo fueron las siguientes:

- ¿En la colección de trabajo del programa de mejoramiento de poroto de INTA Salta existen genotipos con resistencia fisiológica a los aislados locales de *S. sclerotiorum*?
- ¿Existe una respuesta diferencial de los genotipos de poroto frente a aislados genéticamente diferentes?
- ¿Existen casos de interacción cruzada entre los aislados y los genotipos de poroto analizados?

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Germoplasma de poroto

Se evaluaron 20 genotipos de poroto, con diferentes tipos de semillas y hábitos de crecimiento, para la resistencia a esclerotinia bajo condiciones controladas en invernadero. Los materiales evaluados incluyeron ocho variedades comerciales, diez líneas avanzadas y dos variedades utilizadas como control (Tabla 21). El control resistente que se utilizó fue la línea A 195, germoplasma registrado como resistente a esclerotinia (Singh *et al.*, 2007). Por otro lado, como control susceptible se utilizó la variedad comercial Leales 24 INTA, variedad argentina susceptible a esclerotinia según observaciones a campo y con baja resistencia fisiológica (Abán *et al.*, 2018). Entre las líneas evaluadas, cuatro (Cachucheño, MSZ, PF1 y PP) mostraron niveles intermedios de resistencia a esclerotinia en campos naturalmente infestados en las principales áreas de producción en el noroeste de Argentina. Las variedades Leales B30 INTA, Leales CR5 INTA, NAG 12 INTA y Perla INTA, que comúnmente se cultivan en el noroeste de Argentina, se incorporaron en el presente estudio debido a sus buenas características agronómicas (Tabla 21). Algunas líneas y variedades fueron introducidas desde el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná, Brasil), USDA-ARS (United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service) y UFLa (Universidad Federal de Lavras, Brasil), las cuales no han sido evaluadas previamente para resistencia a esclerotinia. Todos los genotipos evaluados forman parte de la colección de trabajo del programa de mejoramiento de INTA EEA Salta -Argentina.

Tabla 21. Tipo y tamaño de semilla, hábito de crecimiento, origen y respuesta a diferentes enfermedades de poroto de los 20 genotipos evaluados para resistencia a esclerotinia.

Genotipo	Semilla			Origen	Resistencia (R)/ Tolerancia (T) ^a
	Tipo	Tamaño	Hábito de crecimiento ^b		
Controles					
A 195	Crema	Largo	I	CIAT	R: E, MA; T: C, S
Leales 24 INTA	Negro	Pequeño	II	INTA	T: MA
Variedades					
Alubia Sel. Cerrillos INTA	Blanco	Largo	I	INTA	T: S
Leales B30 INTA	Blanco	Largo	I	INTA	R: MH; T: BC
Leales CR5 INTA	Cranberry	Largo	I	INTA	T: MA
NAG 12 INTA	Negro	Pequeño	II	INTA	T: S, MA
Perla INTA	Blanco	Largo	I	INTA	-
IPR Garça	Blanco	Medio	I	IAPAR	T: S
IPR Uirapuru	Negro	Pequeño	IIa	IAPAR	T: S
Sea 5	Carioca	Pequeño	IIb	UFLa	T: S
Líneas					
Cachucheño	Blanco	Largo	I	-	-
C-01-25	Negro	Pequeño	IIa	CIAT	-
MSZ	Blanco	Largo	I	-	-
PF1	Blanco	Largo	I	-	T: MA
PP	Blanco	Largo	I	-	-
Otoo 45-79	Rojo	Medio	I	USDA/A RS	T: BC
Otoo 50-2	Rojo claro	Largo	I	USDA/A RS	T: BC
VAX 1	Crema	Pequeño	IIa	CIAT	R: BC
VAX 3	Red	Pequeño	IIa	CIAT	R: BC
VAX 6	Red	Pequeño	IIa	CIAT	R: BC

^a E: Esclerotinia; MH: Mustia Hilachosa; BC: Bacteriosis común; MA: Mancha Angular; S: Sequía; C: Calor.

^b Hábito de crecimiento, donde I = determinado arbustivo, II = indeterminado arbustivo (IIa: sin aptitud para trepar; IIb con aptitud para trepar).

^c Tamaño de semilla: pequeñas (<25 gr/100 semillas), medianas (>25gr y <40 gr/100 semillas) y grandes (>40gr/100 semillas).

4.2.2 Aislados de *Sclerotinia sclerotiorum*

Se utilizaron cinco aislados de *S. sclerotiorum* (SS8, SS87, SS154, SS22 y SS54) para evaluar la resistencia fisiológica a esclerotinia. Los aislados poseen diferentes características para

poder identificar genotipos de poroto con diferentes niveles de resistencia. Se seleccionaron en base a los estudios realizados en el capítulo 2 (Abán *et al.*, 2018). En la Tabla 22 se describen las diferencias entre los aislados seleccionados, relacionadas a la agresividad, origen, grupo de compatibilidad micelial y haplotipo URP al que pertenecen. La razón por la cual se incluyeron aislados con diferentes niveles de agresividad en el análisis fue para detectar posibles interacciones cruzadas.

Tabla 22. Origen y características de los cinco aislados de *S. sclerotiorum* utilizados para evaluar germoplasma de poroto frente a esclerotinia.

Aislado	MCG ^a	Haplótipo URP ^b	Agresividad ^c	Localidad
SS8	3	29	AA	Orán, Salta, Argentina (-23° 18' 28,4"; -64° 11' 98,1")
SS154	42	43	AA	Tartagal, Salta, Argentina (-22° 39' 45,7"; -63° 33' 45,9")
SS87	21	33	AA	Gral. Ballivián, Salta, Argentina (-22° 59' 23,6"; -63° 52' 57,9")
SS22	4	20	AA	Campichuelo, Salta, Argentina (-23° 06' 83,0"; -64° 01' 16,9")
SS54	16	52	DA	Palma Sola, Jujuy, Argentina (-23° 47' 47,3"; -64° 26' 48,9")

^a Grupo de compatibilidad micelial.

^b Haplótipo determinado utilizando marcadores URP (*Universal Rice Primers*).

^c AA: altamente agresivo, DA: débilmente agresivo.

4.2.3 Preparación del inóculo y evaluaciones en invernadero

Del stock original, se tomó un solo esclerocio de cada aislado y se lo esterilizó superficialmente por inmersión (etanol al 70% durante 2 min, solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 1 minuto), se enjuagó tres veces con agua destilada estéril y se secó en toallas de papel estériles. Los esclerocios se cortaron por la mitad con bisturí estéril y, luego, se transfirieron a placas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG). Despues de 72 h de incubación a 20-22 °C, cada aislado se purificó por punta de hifas, para garantizar la pureza de los mismos, y se colocó en nuevas placas con medio APG para iniciar los ensayos en invernadero.

Los ensayos de invernadero se realizaron con el método *Straw test* modificado (Terán *et al.*, 2006). Se sembraron cinco semillas de cada genotipo en macetas de 3L, las cuales se mantuvieron en invernadero a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 12 h. Luego de la emergencia de las plántulas, se raleó a tres plantas por maceta. Se realizó un diseño de bloques

completos al azar con 5 repeticiones por genotipo. Cada repetición consistió en tres plantas por maceta.

La primera inoculación se realizó sobre el tallo principal, el cual se cortó por debajo del quinto nudo, dejando intacto un entrenudo de 3 cm. A partir de un cultivo del hongo en APG de 48 h de crecimiento, se tomaron dos discos de micelio con un tip Eppendorf de 200 µl previamente esterilizado. Inmediatamente, el tip se colocó sobre el tallo cortado con la cara micelial del disco hacia abajo, de modo que el tallo cortado y el hongo queden en contacto. Si las plantas inoculadas presentaron un índice de severidad (IS) resistente ($IS \leq 4$), se realizó una segunda y una tercera inoculación con el mismo aislado de *S. sclerotiorum* a los 7 y 14 días después de la primera inoculación, respectivamente. Las plantas inoculadas se incubaron en una cámara de crecimiento a 22 ± 2 °C con fotoperiodo de 12 h en condiciones de elevada humedad (> 80%) utilizando humidificadores. Como controles se emplearon plantas inoculadas con discos de APG sin el patógeno.

La reacción de resistencia frente a esclerotinia de los genotipos se evaluó cada siete días luego de la primera inoculación para confirmar la resistencia y medir el progreso de la enfermedad. En total, se realizaron tres evaluaciones post-inoculación: a corto, mediano y largo plazo. En función de los índices de severidad de la enfermedad (IS) (Petzoldt & Dickson, 1996; Terán *et al.*, 2006), los genotipos se clasificaron en tres categorías: resistentes ($1 \leq IS \leq 4$), intermedios ($4 < IS < 7$) y susceptibles ($7 \leq IS \leq 9$).

Escala modificada del *Straw test*

Resistente

1. No hay signos de infección sobre el tallo/rama adyacente al disco inoculante cuando se retira el Eppendorf para la inspección.
2. Tallo/rama infectada, pero la invasión del primer entrenudo es <2cm.
3. Progresión de la infección del tallo/rama >2cm, pero la infección no alcanza el primer nudo.

Intermedio

4. La invasión del tallo/rama alcanzó el primer nudo, pero no más allá.
5. La invasión del tallo/rama pasó el primer nudo, pero la invasión del segundo entrenudo es <2cm.
6. Invasión del tallo/rama del segundo entrenudo >2cm, pero no alcanzó al segundo nudo.

Susceptible

7. La invasión del tallo/rama alcanzó el segundo nudo, pero no más allá.

8. La invasión del tallo/rama pasó el segundo nudo, pero la invasión del tercer entrenudo es <2cm.
9. Invasión del tallo/rama del tercer entrenudo > 2cm que conduce a la muerte de la planta.

4.2.4 Análisis de datos

En base a los datos de los índices de severidad, se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) (Cooke, 2006) con la siguiente fórmula (Shaner & Finney, 1977):

$$\text{ABCPE} = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+n1} + Y_i)/2][X_{i+1} + X_i]$$

Donde Y_i es la severidad de la enfermedad de esclerotinia en la i-ésima observación, X_i es el tiempo (en días) en la i-ésima observación, y n es el número total de observaciones.

Para el análisis de los datos se realizó el análisis de la varianza y las medias se compararon mediante la prueba de Fisher (LSD) ($P = 0,05$) utilizando el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

Además, se realizó la correlación entre las medias de los 20 genotipos de poroto y los cinco aislados de *S. sclerotiorum* para las tres fechas de evaluación.

4.3 Resultados

4.3.1 Evaluación de germoplasma durante 21 días post-inoculación

Los valores del índice de severidad de los genotipos evaluados aumentaron a lo largo de los 21 días de evaluación y se observaron diferencias significativas entre genotipos. De los genotipos evaluados, el control resistente A 195 fue el único con índices de severidad resistentes ($IS \leq 4$) que fueron significativamente inferiores ($P < 0,001$) al resto a lo largo de todo el ensayo (Figura 46). La línea más susceptible fue la C-01-25, cuyo comportamiento fue muy similar al control susceptible (Leales 24 INTA), alcanzando valores susceptibles a los 10 días post-inoculación. En general, se observó que las líneas pierden la resistencia entre el cuarto y décimo día post-inoculación. De manera similar, a partir del décimo día pierden la resistencia intermedia ($4 < IS < 7$) comportándose como susceptibles ($IS > 7$) al patógeno, con excepción de la línea A 195, que como se mencionó, muestra valores de resistencia a lo largo de los 21 días de evaluación.

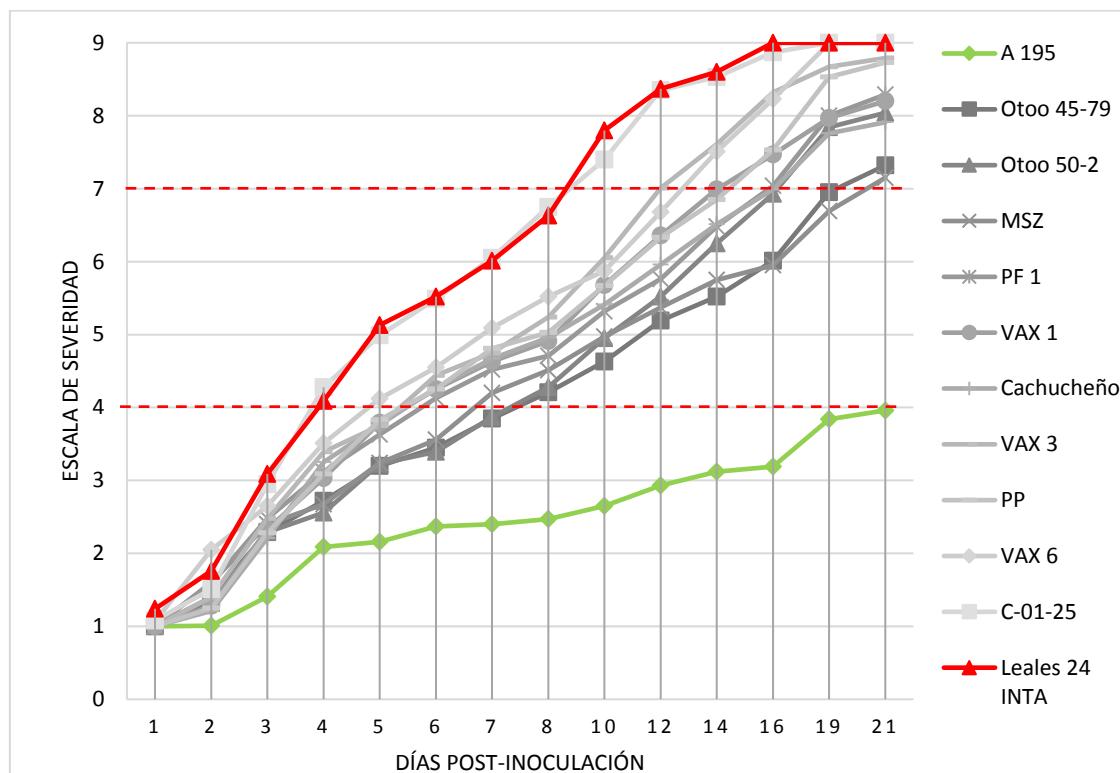


Figura 46. Índice de severidad de la reacción media a cinco aislados de *S. sclerotiorum* de 10 líneas de poroto evaluadas durante 21 días post-inoculación. Control resistente: A 195 (rojo); Control susceptible: Leales 24 INTA (verde). Severidad: genotipos resistentes ($1 \leq IS \leq 4$), intermedios ($4 < IS < 7$) y susceptibles ($7 \leq IS \leq 9$).

Las variedades comerciales tuvieron un comportamiento similar al de las líneas, con índices de severidad en aumento a lo largo de los 21 días de evaluación. Se observaron diferencias significativas entre las variedades ($P < 0,001$). A diferencia del resto de las variedades, Leales CR5 INTA, IPR Garza y Alubia Sel. Cerrillos INTA mantuvieron índices de severidad resistentes ($IS \leq 4$) hasta el quinto día post-inoculación. La variedad comercial más susceptible fue Sea 5, que alcanzó rápidamente valores susceptibles a los 7 días post-inoculación. En general, las variedades evaluadas perdieron la resistencia al cuarto día post-inoculación alcanzando valores de resistencia intermedia ($4 < IS < 7$). Al séptimo día se observó la primera variedad (Sea 5) susceptible ($IS \geq 7$), seguido de IPR Uirapuru, NAG 12 INTA, Leales 24 INTA que se mostraron susceptibles al décimo día. El resto de las variedades (Leales B30 INTA, Perla INTA, Alubia Sel. Cerrillos INTA, IPR garza y Leales CR5 INTA) alcanzaron la susceptibilidad a partir del día 14.

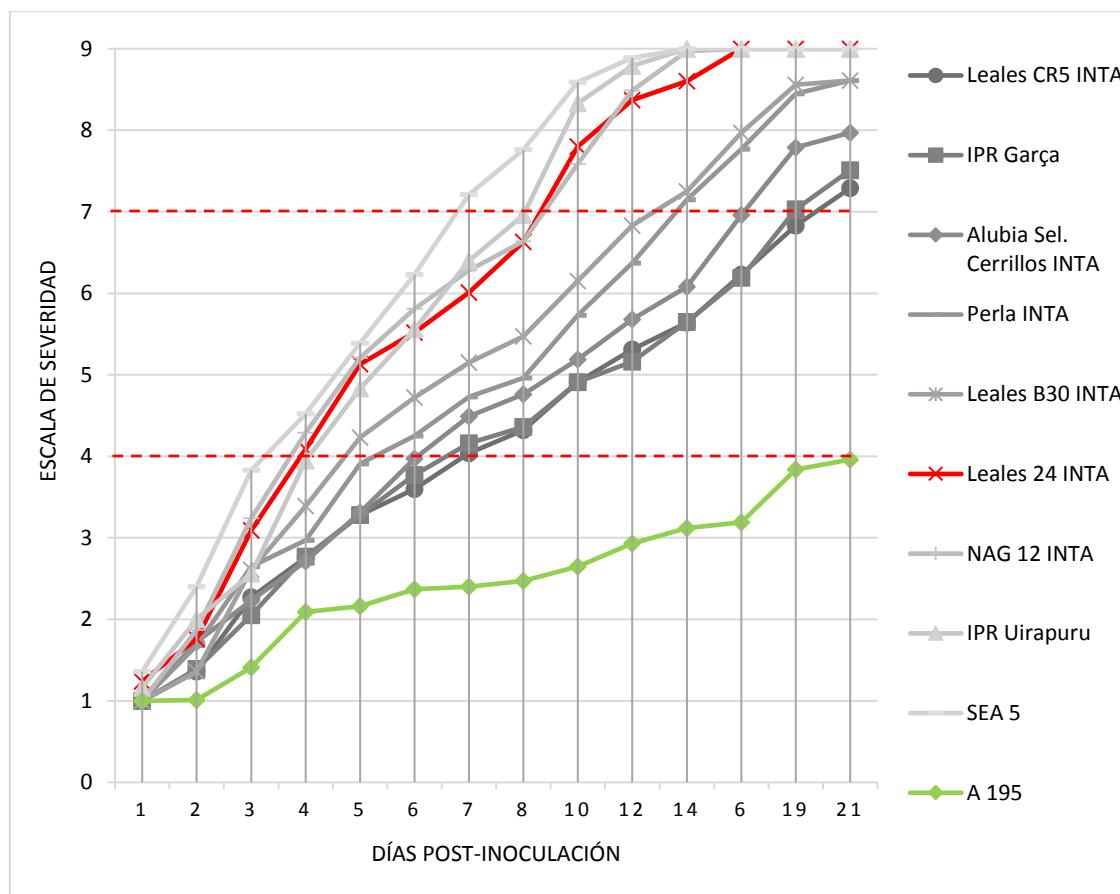


Figura 47. Índice de severidad de la reacción media de 9 variedades comerciales de poroto a cinco aislados de *S. sclerotiorum* evaluadas durante 21 días post-inoculación. Control resistente: A 195 (rojo); control susceptible: Leales 24 INTA (verde). Severidad: genotipos resistentes ($1 \leq IS \leq 4$), intermedios ($4 < IS < 7$) y susceptibles ($IS \geq 7$).

4.3.2 Evaluación de germoplasma a corto, mediano y largo plazo

Del total de días de evaluación, se decidió trabajar solamente con tres fechas de evaluación: a los 7, 14 y 21 días post-inoculación, a los que se denominó como evaluación a corto, mediano y largo plazo, respectivamente (Pascual *et al.*, 2010).

Los valores del índice de severidad y los valores de ABCPE aumentaron en las tres fechas de evaluación (Tabla 23). Para los cinco aislados analizados se observó que el número de genotipos resistentes ($IS \leq 4$) y genotipos intermedios ($4 < IS < 7$) disminuyó a medida que el número de inoculaciones por planta fue mayor (Tabla 23).

En las tres evaluaciones, los genotipos de poroto difirieron significativamente ($P < 0,001$) en base a las medias de los valores del índice de severidad y a los valores del ABCPE (Tabla 23). La línea A 195 mostró resistencia en las tres fechas de evaluación (Figura 48). En la evaluación a **corto plazo** (7DPI) las líneas Otoo 45-79 y 50-2 mostraron resistencia. Sin embargo, cuando se las inoculó por segunda vez resultaron intermedias a los 14 DPI. La línea Sea 5 fue el genotipo más susceptible con un índice de severidad de 7,21 y un ABCPE de 27,33 a los 7 DPI. Sea 5 fue el único genotipo susceptible a todos los aislados con una sola inoculación (Figura 48).

En la evaluación a **mediano plazo** (14 DPI), los índices de severidad variaron de 3,12 (A 195) a 9,00 (IPR Uirapuru y Sea 5) y la media del ABCPE varió de 30,13 (A 195) a 90,77 (Sea 5) (Tabla 23).

En la evaluación a **largo plazo** (21 DPI), todos los genotipos de poroto fueron susceptibles a esclerotinia, excepto la línea A 195 que fue resistente a todos los aislados de *S. sclerotiorum* incluso después de tres inoculaciones (Figura 48). El promedio de los índices de severidad variaron de 3,96 (A 195) a 9,00 (NAG 12 INTA, IPR Uirapuru, Sea 5 y C-o1-25) y el rango promedio del ABCPE fue de 56,14 (A 195) a 152,07 (Sea 5) (Tabla 23).

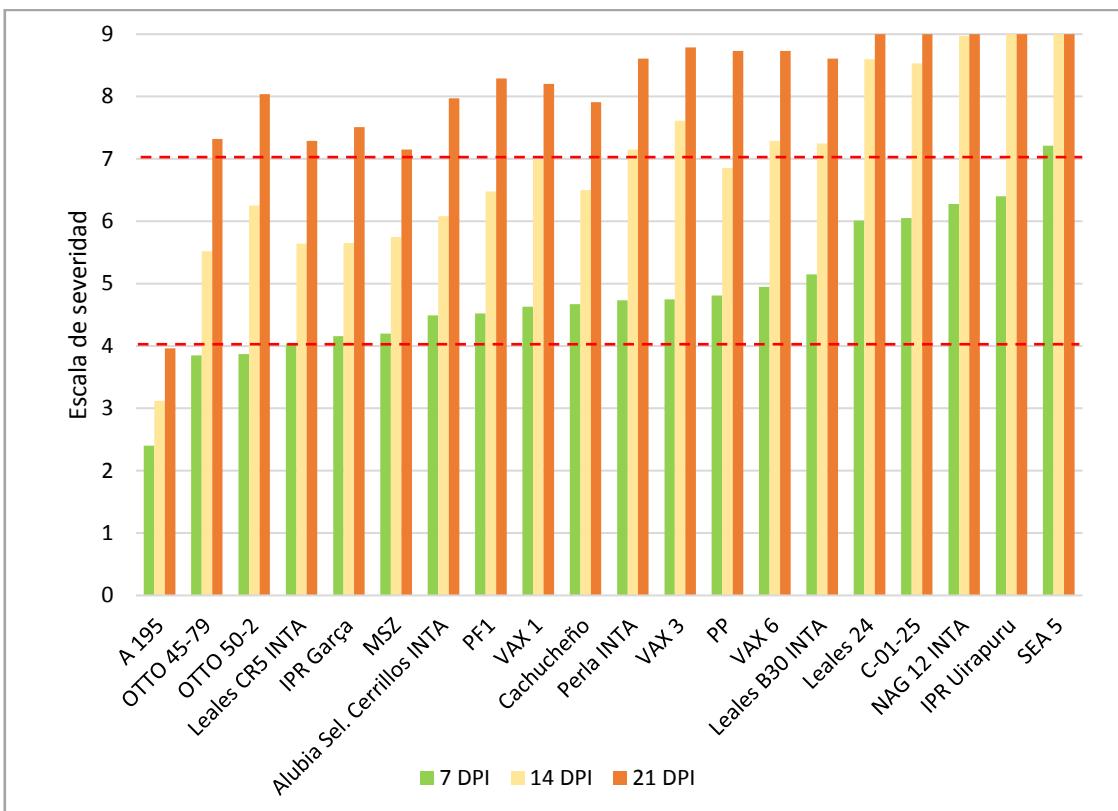


Figura 48. Escala de severidad de la reacción media de todos los genotipos de poroto a cinco aislados de *S. sclerotiorum* evaluadas durante 7, 14 y 21 días post-inoculación en condiciones controladas de temperatura y humedad. Control resistente: A 195; control susceptible: Leales 24 INTA. Severidad: genotipos resistentes ($1 \leq IS \leq 4$), intermedios ($4 < IS < 7$) y susceptibles ($7 \leq IS \leq 9$).

Tabla 23. Valores medios del índice de severidad y ABCPE de la reacción de 20 genotipos de poroto a cinco aislados de *S. sclerotiorum* evaluados a los 7, 14 y 21 días post-inoculación (DPI).

Genotipos	7 DPI ^a		14 DPI		21 DPI	
	IS	ABCPE ^b	IS	ABCPE	IS	ABCPE
Controles						
A 195	2,40	11,30	3,12	30,13	3,96	56,14
Leales 24	6,01	23,84	8,60	77,57	9,00	142,37
Variedades						
Leales CR5 INTA	4,04	16,29	5,64	51,20	7,29	97,81
IPR Garça	4,16	16,35	5,65	51,02	7,51	98,24
Alubia Sel. Cerrillos INTA	4,49	17,18	6,08	54,50	7,97	106,84
Perla INTA	4,73	18,83	7,15	61,95	8,61	118,16
Leales B30 INTA	5,15	19,88	7,25	65,07	8,61	122,70
NAG 12 INTA	6,28	24,57	8,97	79,28	9,00	144,27
IPR Uirapuru	6,40	23,25	9,00	81,00	9,00	145,22
SEA 5	7,21	27,33	9,00	90,77	9,00	152,07
Líneas						
OTOO 45-79	3,85	15,99	5,52	49,36	7,32	95,66
OTOO 50-2	3,87	15,72	6,25	51,49	8,04	103,59
MSZ	4,20	16,57	5,75	52,30	7,15	97,63
PF1	4,52	18,20	6,48	56,35	8,29	110,32
Cachucheño	4,67	18,04	6,50	57,43	7,91	110,07
PP	4,81	18,12	6,85	59,99	8,73	116,42
VAX 1	4,63	17,99	6,99	60,04	8,20	114,20
VAX 3	4,75	18,83	7,61	63,94	8,79	123,19
VAX 6	4,95	20,01	7,29	62,21	8,73	121,32
C-01-25	6,05	23,32	8,53	76,68	9,00	140,78
Media	4,86	19,74	6,91	61,93	8,11	117,16
LSD ^c ($P \leq 0,05$)	0,16	2,57	0,16	4,80	0,12	7,34

^a DPI: grado de severidad a los 7, 14 y días post-inoculación. Los colores indican los valores observados para los índices de severidad: Verde: resistente ($1 \leq IS \leq 4$), Naranja: intermedios ($4 < IS < 7$) y marrón: susceptibles ($7 \leq IS \leq 9$).

^b ABCPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

^c LSD: Mínima diferencia significativa para comparar los puntajes de esclerotinia.

4.3.3 Análisis de la respuesta a corto, mediano y largo plazo frente a cada uno de los cinco aislados de *S. sclerotiorum* utilizados

Al analizar la reacción de los 20 genotipos frente a cada uno de los cinco aislados, se observó que en la evaluación a **corto plazo** la línea A 195 presentó los índices de severidad más bajos ($IS \leq 2,73$) en comparación con los genotipos restantes (Tabla 24). Las líneas Otoo 45-

79 y Otoo 50-2 también exhibieron reacciones resistentes ($IS \leq 4$) a los 7 DPI para la mayoría de los aislados. Sin embargo, la línea Otoo 50-2 mostró resistencia intermedia para SS87 y ambas líneas tuvieron resistencia intermedia para el aislado SS8 (Tabla 24). El genotipo Leales CR5 INTA también mostró resistencia, pero sólo para los aislados SS22 y SS54 (Tabla 24). Con respecto al resto de los genotipos, la mayoría tuvo reacciones intermedias ($4 < IS < 7$). Sin embargo, los índices de severidad de Leales CR5 INTA (4,04), IPR Garça (4,16) y MSZ (4,20) fueron significativamente más bajos con respecto al resto de las variedades. Por otro lado, los genotipos IPR Uirapuru y C-01-25 mostraron susceptibilidad para el aislado SS8, caracterizado previamente como el más agresivo. De manera similar, la línea Sea 5 mostró susceptibilidad para los aislados SS152, SS22 y SS8 (Tabla 24).

En la evaluación de **mediano plazo** (14 DPI), se observó que todos los genotipos que fueron resistentes en la primera evaluación, mostraron una resistencia intermedia luego de dos inoculaciones, excepto la línea A 195 (Tabla 24). Los genotipos Leales CR5 INTA ($IS=5,64$), IPR Garça ($IS=5,65$) y MSZ ($IS=5,75$) continuaron mostrando una resistencia intermedia y presentaron valores significativamente ($P < 0,05$) más bajos que los otros genotipos con resistencia intermedia (PF1, Alubia Sel. Cerrillos INTA y Cachucheño). Los genotipos Perla INTA y Leales B30 INTA también presentaron resistencia intermedia, pero con valores más bajos ($IS < 6$) (Tabla 24). El genotipo Leales B30 INTA fue susceptible a todos los aislados, excepto para SS54 ($IS=6,27$). La línea VAX 1 fue susceptible a la mayoría de los aislados, excepto para SS8 ($IS=5,67$) y SS87 ($IS=6,67$) (Tabla 24). Del mismo modo, la línea VAX 3 fue susceptible a todos los aislados, excepto para SS8 ($IS=6,13$). Los genotipos C-01-25, NAG 12 INTA, IPR Uirapuru y VAX 6 fueron susceptibles para todos los aislados (Tabla 24).

En la evaluación a **largo plazo**, todos los genotipos de poroto fueron susceptibles a esclerotinia, excepto la línea A 195 que fue resistente a todos los aislados de *S. sclerotiorum* incluso después de tres inoculaciones (Tabla 24) y significativamente diferente ($P < 0,05$) de todos los genotipos restantes. Los genotipos Leales CR5 INTA, IPR Garça, MSZ y Otoo 45-79 presentaron resistencia intermedia sólo para el aislado SS54. Del mismo modo, Leales CR5 INTA e IPR Garça presentaron resistencia intermedia a los aislados SS154 y SS22, respectivamente.

Tabla 24. Valores medios del índice de severidad de la reacción de 20 genotipos de poroto a los aislados SS8, SS154, SS87, SS22 and SS54 *S. sclerotiorum* a los 7, 14 y 21 días post- inoculación.

Genotipos	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>														
	SS8			SS154			SS87			SS22			SS54		
	7 DPI ^a	14 DPI	21 DPI	7 DPI	14 DPI	21 DPI									
Controles															
A 195	2,73	3,40	4,00	2,73	3,40	4,00	2,20	2,93	4,00	2,20	2,93	3,93	2,13	2,93	3,87
Leales 24	6,67	9,00	9,00	6,13	9,00	9,00	6,53	9,00	9,00	5,33	8,00	9,00	5,40	8,00	9,00
Variedades															
Leales CR5 INTA	4,20	5,53	7,20	4,07	5,60	6,73	4,20	6,47	8,00	3,80	5,40	8,00	3,93	5,20	6,53
IPR Garça	4,20	5,80	7,07	4,13	5,33	7,00	4,20	5,67	9,00	4,13	5,67	8,00	4,13	5,80	6,47
Alubia Sel. Cerrillos INTA	4,60	6,40	8,53	4,33	5,67	7,47	4,33	6,33	8,93	4,60	6,00	7,47	4,60	6,00	7,47
Perla INTA	4,80	7,27	8,93	4,33	6,80	8,53	4,93	7,67	9,00	5,07	7,13	8,60	4,53	6,87	8,00
Leales B30 INTA	5,53	8,00	9,00	5,13	7,33	8,53	5,20	7,60	9,00	5,07	7,07	8,53	4,80	6,27	8,00
NAG 12 INTA	6,13	9,00	9,00	6,33	9,00	9,00	6,00	8,87	9,00	6,80	9,00	9,00	6,13	9,00	9,00
IPR Uirapuru	7,00	9,00	9,00	6,53	9,00	9,00	5,87	9,00	9,00	6,40	9,00	9,00	6,20	9,00	9,00
SEA 5	7,87	9,00	9,00	7,60	9,00	9,00	6,67	9,00	9,00	7,73	9,00	9,00	6,20	9,00	9,00
Líneas															
Otoo 45-79	4,13	5,80	7,47	3,73	5,40	7,13	3,93	5,80	8,00	3,73	5,40	8,00	3,73	5,20	6,00
Otoo 50-2	4,13	5,47	7,53	3,80	6,80	8,20	4,20	6,53	8,00	3,60	6,40	8,47	3,6	6,07	8,00
MSZ	4,27	5,87	7,33	4,20	5,67	7,00	4,33	5,87	8,00	4,07	5,67	6,73	4,13	5,67	6,67
PF1	4,40	6,80	9,00	4,27	6,33	8,33	4,20	6,80	8,00	4,93	6,27	8,13	4,80	6,20	8,00
Cachucheño	4,53	6,53	8,73	4,27	6,20	7,67	5,00	6,73	8,13	4,80	6,53	7,40	4,73	6,53	7,60
PP	5,00	7,00	9,00	4,47	7,33	8,87	4,80	6,33	9,00	5,00	7,20	8,80	4,80	6,40	8,00
VAX 1	4,33	5,67	7,27	4,67	7,73	8,80	4,80	6,67	8,00	4,87	7,87	8,93	4,47	7,00	8,00
VAX 3	4,80	6,13	8,00	4,47	7,73	8,93	4,93	7,40	9,00	4,80	8,80	9,00	4,73	8,00	9,00
VAX 6	6,00	7,53	9,00	5,00	7,87	9,00	4,50	6,56	7,67	4,47	7,27	9,00	4,80	7,20	9,00
C-01-25	7,13	9,00	9,00	6,07	8,67	9,00	6,00	9,00	9,00	5,60	8,00	9,00	5,47	8,00	9,00
Mean	5,12	6,91	8,15	4,81	6,99	8,06	4,84	7,01	8,34	4,85	6,93	8,20	4,67	6,72	7,78
LSD ^b (<i>P</i> ≤ 0,05)	0,34	0,29	0,23	0,45	0,48	0,41	0,28	0,33	0,13	0,33	0,44	0,29	0,33	0,44	0,29

^aDPI, puntuación de esclerotinia a los 7, 14 y 21 días post-inoculación. Los colores indican los valores observados para los índices de severidad: Verde: resistente (1 ≤ IS ≤ 4), Naranja: intermedios (4 < IS < 7) y marrón: susceptibles (7 ≤ IS ≤ 9).

^b LSD, Mínima diferencia significativa para comparar los puntajes de esclerotinia.

Al analizar la agresividad de los aislados de manera individual, se observó que el aislado SS54 fue el menos agresivo en las tres fechas de evaluación (Tabla 25) con un índice de severidad promedio de 6,39 y un valor de ABCPE de 110,63. El resto de los aislados (SS154, SS22, SS87 y SS8) difirieron significativamente ($P < 0,05$) en las distintas evaluaciones. En la evaluación a corto plazo (7 DPI) el aislado SS8 fue el más agresivo. Mientras que a los 14 DPI y 21 DPI el aislado más agresivo fue el SS87 (Tabla 25, Figura 49).

Tabla 25. Valores medios del índice de severidad de la reacción promedio de los 20 genotipos de poroto a los 7, 14 y 21 días post-inoculación con los aislados SS8, SS154, SS87, SS22 y SS54 de *S. sclerotiorum*.

Aislado	Días post-inoculación			Media	ABCPE ^a	LSD ($P \leq 0,05$) ^b
	7	14	21			
SS54	4,67	6,72	7,78	6,39	110,63	0,09
SS154	4,81	6,99	8,06	6,62	118,28	0,12
SS22	4,85	6,93	8,20	6,66	116,04	0,11
SS87	4,88	7,07	8,40	6,78	118,03	0,09
SS8	5,12	6,91	8,15	6,73	116,28	0,10
Media	4,86	6,91	8,11	6,63	115,85	0,10
LSD ($P \leq 0,05$)^c	0,08	0,08	0,06	0,06	3,67	-

^a ABCPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

^b Para comparar las medias entre los días post-inoculación por aislado.

^c Para comparar las medias entre los aislados dentro del mismo día de inoculación, y entre los valores de ABCPE.

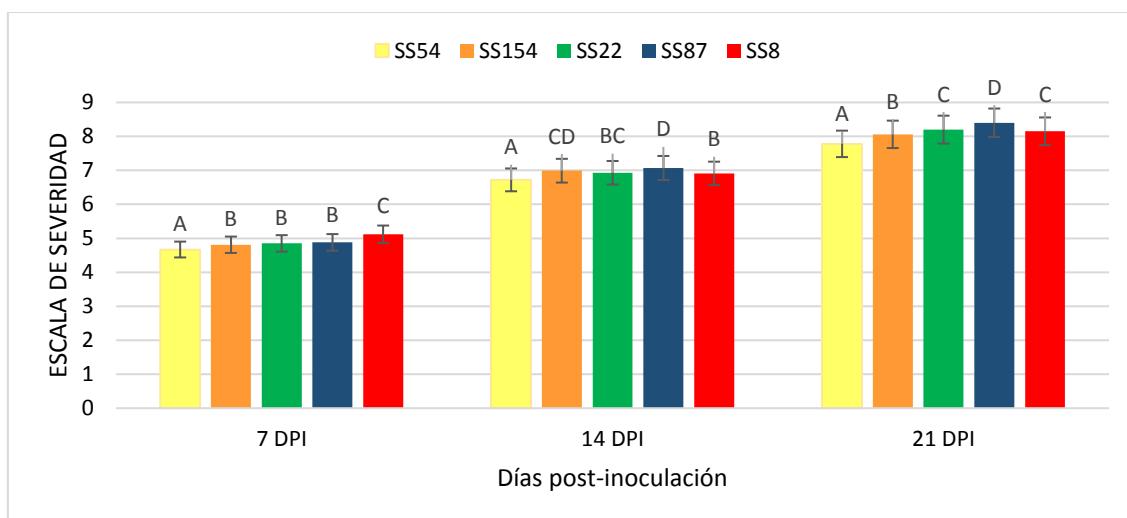


Figura 49. Índice de severidad de los cinco aislados de *S. sclerotiorum* a los 7, 14 y 21 DPI (LSD Fisher; $\alpha=0,05$).

4.3.4 Análisis de la Varianza

En el análisis de la varianza de los 20 genotipos de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) contra los cinco aislados locales de *S. sclerotiorum* (SS8, SS154, SS87, SS22 y SS54), se observó que los cuadrados medios de los aislados, genotipos, y genotipos x aislados fueron altamente significativos ($P < 0,001$) en las tres fechas de evaluación 7 DPI (Tabla 26), 14 DPI (Tabla 27) y 21 DPI (Tabla 28). No se observaron interacciones cruzadas significativas entre genotipos y aislados.

Tabla 26. Análisis de varianza de la respuesta de 20 genotipos de poroto a 5 aislados de *S. sclerotiorum* evaluados a los 7 días post-inoculación.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	P
Modelo	1875,4	99	18,9	77,85	<0,0001
Genotipo	1712,9	19	90,2	370,5	<0,0001
Aislado	32,73	4	8,18	33,63	<0,0001
Genotipo x aislado	129,75	76	1,71	7,02	<0,0001
Error	340,67	1400	0,24		
Total	2216,1	1499			

Tabla 27. Análisis de varianza de la respuesta de 20 genotipos de poroto a 5 aislados de *S. sclerotiorum* evaluados a los 14 días post-inoculación.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	P
Modelo	3379	99	34,1	131,6	<0,0001
Genotipo	3136,8	19	165	636,4	<0,0001
Aislado	20,51	4	5,13	19,77	<0,0001
Genotipo x Aislado	221,65	76	2,92	11,24	<0,0001
Error	363,2	1400	0,26		
Total	3742,2	1499			

Tabla 28. Análisis de varianza de la respuesta de 20 genotipos de poroto a 5 aislados de *S. sclerotiorum* evaluados a los 21 días post-inoculación.

Fuente de variación	SC	gl	CM	F	P
Modelo	2233,1	99	22,6	157,5	<0,0001
Genotipo	1951,2	19	103	717	<0,0001
Aislado	62,1	4	15,5	108,4	<0,0001
Genotipo x Aislado	219,8	76	2,89	20,19	<0,0001
Error	200,53	1400	0,14		
Total	2433,6	1499			

4.3.5 Análisis de correlación

Al realizar la correlación entre las medias del índice de severidad de los 20 genotipos de poroto y los cinco aislados de *S. sclerotiorum* para las tres fechas de evaluación (7, 14 y 21 DPI) se obtuvieron coeficientes de correlación positivos y significativos obtenidos (Tabla 29).

Tabla 29. Coeficiente de correlación entre 20 genotipos de poroto y 5 aislados de *S. sclerotiorum* a los 7, 14 y 21 días post-inoculación.

Número de días post-inoculación	Aislados de <i>S. sclerotiorum</i>			
	SS8	SS154	SS22	SS87
7	SS154	0,80*		
	SS22	0,77*	0,82*	
	SS87	0,83*	0,78*	0,78*
	SS54	0,76*	0,73*	0,82*
14	SS154	0,79*		
	SS22	0,74*	0,88*	
	SS87	0,88*	0,83*	0,82*
	SS54	0,83*	0,87*	0,91*
21	SS154	0,76*		
	SS22	0,74*	0,89*	
	SS87	0,83*	0,76*	0,83*
	SS54	0,81*	0,89*	0,85*
				0,77*

* Significativo a $P \leq 0,001$.

4.4 Discusión

En el presente capítulo, la resistencia fisiológica de 20 genotipos de poroto se evaluó a los 7, 14 y 21 días post-inoculación con cinco aislados de *S. sclerotiorum* genéticamente distintos, recolectados en la principal área de producción de poroto de Argentina. Terán y Singh (2009b) reportaron previamente evaluaciones de germoplasma de poroto con múltiples inoculaciones y evaluaciones de la enfermedad en diferentes tiempos para seleccionar líneas de mejoramiento con elevada resistencia fisiológica a la esclerotinia. Según Viteri *et al.* (2015a), ésta metodología de evaluación es la prueba más severa aplicada en poroto para evaluar la respuesta contra la enfermedad.

En estudios anteriores, se ha informado sobre la existencia de variabilidad en *S. sclerotiorum* (Atallah *et al.*, 2004; Mert-Türk *et al.*, 2007; Litholdo Junior & Gomes, 2011; Lehner & Mizubuti, 2017a), razón por la cual el germoplasma de poroto podría responder de diferentes maneras frente al patógeno. Por lo tanto, es crucial analizar la respuesta del germoplasma contra un amplio espectro de aislados originarios de la región de producción en estudio (Schwartz & Singh, 2013). En la presente tesis, los aislados utilizados para caracterizar los 20 genotipos de poroto fueron seleccionados en base a la variabilidad (morfológica, patogénica y molecular) observada en capítulos anteriores. En las evaluaciones de invernadero, se encontró una interacción significativa entre los aislados locales de *S. sclerotiorum* y los genotipos de poroto, lo que sugiere que la respuesta a la resistencia fisiológica a esclerotinia puede variar según el aislado de *S. sclerotiorum*. Pascual *et al.* (2010), Viteri *et al.* (2015a) y Lehner *et al.* (2016) también encontraron una interacción significativa entre los genotipos de poroto y los aislados de *S. sclerotiorum* que analizaron. Sin embargo, Otto-Hanson *et al.* (2011) no observaron interacción. Estas diferencias podrían atribuirse a la variabilidad de los aislados, el germoplasma, el método de inoculación y las condiciones ambientales en las que se realizaron los experimentos.

En el presente estudio, no se observaron interacciones cruzadas significativas entre genotipos y aislados. Esto se confirmó por los valores de correlación positivos significativos obtenidos entre los valores medios del índice de severidad de los 20 genotipos de poroto y los cinco aislados en cada fecha de evaluación. Tampoco se reportaron interacciones cruzadas significativas entre los aislados y los genotipos de poroto en estudios previos. Kull *et al.* (2004) observaron diferencias en la agresividad de seis aislados de poroto de los Estados Unidos, pero no hubo interacciones cruzadas entre los aislados y los genotipos de poroto analizados. De manera similar, Pascual *et al.* (2010) utilizaron cuatro aislados de *S. sclerotiorum* de diferente agresividad para evaluar 19 genotipos de poroto durante 21 días

post-inoculación, de los cuales cinco mostraron resistencia intermedia a los cuatro aislados. Asimismo, Viteri *et al.* (2015a) informaron que no hubo interacciones cruzadas en las evaluaciones de 31 genotipos de poroto frente a cuatro aislados de diferente origen geográfico.

Los resultados del presente estudio confirman el éxito de realizar tres inoculaciones por planta para identificar genotipos de poroto altamente resistentes a los aislados de *S. sclerotiorum*. Las evaluaciones a largo plazo permiten descartar genotipos presuntamente resistentes que fueron evaluados en etapas más tempranas (7-14 DPI) (Viteri *et al.*, 2015a). Cuando los genotipos se mantuvieron durante 21 días, generalmente se observó un avance de la enfermedad y los genotipos que habían mostrado resistencia intermedia a esclerotinia terminaron siendo susceptibles. Por ejemplo, las líneas Otoo 45-79 y Otoo 50-2 fueron resistentes y mostraron valores más bajos de ABCPE en respuesta a tres aislados (SS154, SS22 y SS54) después de 7 días post-inoculación. Si solamente se utilizara la evaluación a corto plazo, probablemente se hubiesen seleccionado estos genotipos; sin embargo, tuvieron resistencia intermedia después de dos inoculaciones (14 DPI) y resultaron susceptibles después de 21 DPI. Por lo tanto, las evaluaciones deben retrasarse al menos 21 días después de la inoculación, para cubrir tanto la etapa vegetativa como la mayoría de las etapas de crecimiento reproductivo, como se informó anteriormente (Terán & Singh, 2009b; Singh *et al.*, 2014a,b). Aunque el Straw test es un método agresivo para evaluar la resistencia fisiológica, la reacción de estas líneas también debe evaluarse a campo ya que las evaluaciones en invernadero favorecen el crecimiento del hongo en condiciones óptimas, situación poco probable que se de en el campo.

Los resultados de este estudio demuestran la resistencia fisiológica efectiva de la línea A 195 contra cinco aislados locales de *S. sclerotiorum* genéticamente distintos incluso después de tres inoculaciones sucesivas. Estos resultados concuerdan con los estudios previos realizados en Estados Unidos, España y Brasil (Singh *et al.*, 2007a; Terán & Singh, 2009b, 2010; Pascual *et al.*, 2010b; Pérez-Vega *et al.*, 2012; Lehner *et al.*, 2015a, 2016; Schwartz & Singh, 2013). Sin embargo, difieren de los encontrados por Viteri *et al.* (2015a) donde evaluaron la resistencia de la línea A 195 frente a cuatro aislados de *S. sclerotiorum* de diferente agresividad, entre los cuales se encontraba el aislado ARS12D recolectado en Tartagal, Salta, Argentina. La línea A 195 tuvo una resistencia intermedia (IS=4,77) a los 21 DPI frente a este aislado. En el presente estudio, el promedio del índice de severidad a esclerotinia observada para A 195 a 21 DPI fue 3,96. Las diferencias en los niveles de resistencia encontrados pueden deberse a la variabilidad en la agresividad de los aislados utilizados en ambos estudios.

El genotipo A 195 es una línea de poroto de semilla beige opaca grande, derivada de la crusa de dos líneas andinas (Red Kloud x ICA 10009), y desarrollada por Singh *et al.*(2007) en el CIAT. Se ha reportado que existen dos genes dominantes complementarios e independientes que controlan la resistencia en A 195 en respuesta a aislados altamente agresivos o débilmente agresivos (Viteri & Singh, 2015b). Además, se ha identificado que los QTL de resistencia WM2.2, WM7.1 y WM8.3 confieren resistencia fisiológica a esclerotinia en esta línea (Viteri *et al.*, 2015a). Con respecto a las características agronómicas, la línea A 195 tiene un hábito de crecimiento determinado tipo I, el cual sirve como mecanismo de escape ya que crea un microclima menos propicio para *S. sclerotiorum* para colonizar flores y tallos y también facilita la cosecha mecánica (Schwartz & Pastor-Corrales, 1988; Kolkman & Kelly, 2002; Miklas & Singh, 2007). Esta línea también tiene resistencia al virus del mosaico común de poroto (BCMV), a mancha angular, resistencia intermedia a la sequía y al estrés por calor (Singh *et al.*, 2007b). Todas estas características hacen que la línea A 195 sea un candidato prometedor para ser utilizado por los mejoradores para el mejoramiento de las variedades de poroto de Argentina.

En cuanto al resto de las líneas y variedades analizadas Leales CR5 INTA, IPR Garça y MSZ, que tienen hábito de crecimiento tipo I, presentaron niveles altos de resistencia intermedia a esclerotinia después de una, e incluso dos inoculaciones con todos los aislados. Estos genotipos merecen atención en estudios futuros porque tienen niveles altos de resistencia a otras enfermedades.

Los resultados generados en el presente estudio proporcionan, por primera vez, información sobre la resistencia fisiológica de 20 genotipos de poroto contra aislados representativos de la principal área de producción de poroto de Argentina. Estos resultados son valiosos para los programas regionales de mejoramiento genético de poroto destinados a obtener variedades ampliamente adaptadas con resistencia duradera, lo que contribuye al desarrollo de estrategias de manejo sostenible para minimizar las pérdidas de rendimiento debido a la esclerotinia en la producción de poroto.

CAPÍTULO V

Consideraciones Finales

El cultivo de poroto representa una de las actividades económicas más importantes a nivel provincial y nacional. En los últimos años, se ha detectado un incremento en el área de incidencia de esclerotinia en todas las áreas de producción, principalmente al Norte de Salta (Vizgarra *et al.*, 2016), posiblemente debido al sistema de monocultivo y a la estrecha base genética de las variedades de poroto (Galván *et al.*, 2001). El principal objetivo de este trabajo fue “Conocer la variabilidad fenotípica y genotípica mediante la caracterización morfológica y molecular del patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* en las principales zonas de cultivo de poroto de Argentina para aportar conocimiento a los programas de mejoramiento”.

Los aislados de *S. sclerotiorum* relevados de seis lotes comerciales de poroto, ubicados en seis localidades diferentes, mostraron una alta variabilidad fenotípica, genética y patogénica, por lo que se aceptó la hipótesis de que “los aislados de *S. sclerotiorum* obtenidos de las principales zonas de producción de poroto de Argentina presentan variabilidad fenotípica”. En el total de los aislados analizados, se encontraron 52 MCG, 59 haplotipos URP y 30 haplotipos MLH. Todos los MCG fueron específicos de cada sitio, mientras que los haplotipos URP y MLH se compartieron entre lotes. Asimismo, todas las técnicas revelaron una mayor variabilidad genética *dentro* de las poblaciones analizadas que *entre* ellas.

Las tres técnicas (MCG, marcadores URP y SSR) detectaron altos niveles de diversidad genotípica. La población de Tartagal fue la más diversa, con pocos genotipos duplicados, mientras que Orán fue la menos diversa, donde prácticamente no hubo genotipos diferentes entre sí. Debido a la falta de correlación entre los MCG y los marcadores moleculares se rechazó la hipótesis de que “los diferentes grupos de MCG de *S. sclerotiorum* pueden diferenciarse a partir del análisis molecular con marcadores URP y SSR”.

En ambas técnicas moleculares (URP y SSR) las distancias genéticas no se correlacionaron con las distancias geográficas. Asimismo, los análisis de diferenciación poblacional en base a los haplotipos de URP compartidos y los MCG, mostraron que algunas poblaciones de *S. sclerotiorum* estaban diferenciadas significativamente según su origen geográfico. Sin embargo, un estudio más preciso utilizando marcadores microsatélites y realizando la correspondiente corrección de clones sugirió que no existe diferenciación poblacional en la muestra analizada. Esto podría deberse a la existencia de migración de genotipos entre lotes, que puede ocurrir por la dispersión de inóculo fúngico, en forma de esclerocios o semillas colonizadas con micelio, de un campo a otro, al transportar restos de la cosecha y suelo contaminado mediante la maquinaria agrícola (Abawi & Grogan, 1979).

Los estudios realizados con los MCG y los URP fueron útiles para proporcionar información preliminar sobre la variabilidad genética de *S. sclerotiorum*. Sin embargo, el análisis con microsatélites proporcionó una visión más detallada de la diversidad genética y la estructura poblacional, pero fundamentalmente permitió estudiar el comportamiento reproductivo del patógeno a partir del análisis de desequilibrio de ligamiento entre loci. El mismo sugirió la ocurrencia de ambos tipos de reproducción, clonal y sexual, pero con predominancia de la reproducción sexual en la mayoría de las poblaciones de *S. sclerotiorum*. Por tal motivo, se rechazó la hipótesis de que “Existe estructuración de la variabilidad genética de *S. sclerotiorum*, la cual queda determinada por el tipo de reproducción predominantemente clonal de la especie”. Las poblaciones con evidencia de recombinación y con niveles altos de diversidad genética tienen un mayor potencial para evolucionar más rápidamente, y en consecuencia, aumenta la probabilidad de que el patógeno supere la resistencia de la planta hospedante y/o que por la presión de selección, de origen abiótico o biótico, se seleccionen individuos con genes de resistencia a los fungicidas ampliamente utilizados (Milgroom, 1996; Carmona & Sautua, 2017), lo que implica un gran desafío en el manejo de la esclerotinia del poroto ya que el control de la misma se realiza principalmente con fungicidas.

Los resultados generados en el presente estudio proporcionan, por primera vez, información sobre la resistencia fisiológica de 20 genotipos de poroto, pertenecientes a la colección de trabajo del programa de mejoramiento del INTA EEA Salta, contra aislados representativos de la principal área de producción de poroto de Argentina. En las evaluaciones de invernadero no se encontró resistencia fisiológica en ninguno de los genotipos de poroto. De hecho, todas las variedades fueron susceptibles a los 21 días post-inoculación, con excepción de la línea A 195 utilizada como control positivo. La resistencia encontrada en esta línea concuerda con los estudios previos realizados en Estados Unidos, España y Brasil (Singh *et al.*, 2007; Terán & Singh, 2009b, 2010; Pascual *et al.*, 2010; Pérez-Vega *et al.*, 2012; Schwartz & Singh, 2013; Lehner *et al.*, 2015a, 2016). Debido a que los programas de mejoramiento de poroto en Argentina no han logrado hasta la fecha desarrollar variedades resistentes a esclerotinia, la línea A 195, por sus características agronómicas y sanitarias (Singh *et al.*, 2007), sería un candidato prometedor para ser utilizado por los mejoradores para el mejoramiento de las líneas y variedades de poroto de Argentina, ya que el uso de variedades resistentes es crucial para el manejo integrado de la esclerotinia, especialmente bajo presión severa de la enfermedad (Miklas *et al.* 2013).

En las evaluaciones en invernadero también se encontró una interacción significativa entre los aislados locales de *S. sclerotiorum* y los genotipos de poroto, lo que

sugiere que la respuesta a la resistencia fisiológica a esclerotinia puede variar según el aislado de *S. sclerotiorum*. Por lo tanto, se aceptó la hipótesis de que “los aislados de diferentes MCG de *S. sclerotiorum* presentan agresividad diferencial frente a determinados genotipos de poroto”.

Fue fundamental evaluar los genotipos cubriendo las etapas vegetativas y reproductivas para descartar genotipos que en evaluaciones tempranas aparentaron ser resistentes (Viteri *et al.*, 2015a). Aunque el Straw test es un método agresivo para evaluar la resistencia fisiológica, la reacción de estas líneas debe evaluarse a campo ya que las evaluaciones en invernadero favorecen el crecimiento del hongo en condiciones óptimas, situación poco probable que se encuentre en el campo.

Los resultados generados en este estudio son valiosos para los programas regionales de mejoramiento genético de poroto destinados a obtener variedades ampliamente adaptadas con resistencia duradera, lo que contribuye al desarrollo de estrategias de manejo sostenible para minimizar las pérdidas de rendimiento debido al esclerotinia en la producción de poroto.

CAPÍTULO VI

Referencias bibliográficas

- Abán CL, Taboada G, Spedaletti Y *et al.*, 2018. Molecular, morphological and pathogenic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from common bean (*Phaseolus vulgaris*) fields in Argentina. *Plant Pathology* **67**, 1740-1748.
- Abawi G, Grogan R, 1979. Epidemiology of Diseases Caused By *Sclerotinia* Species. *The american phytopathological society* **69**, 899-904.
- Abd-Elmagid A, Garrido PA, Hunger R *et al.*, 2013. Discriminatory simplex and multiplex PCR for four species of the genus *Sclerotinia*. *Journal of Microbiological Methods* **92**, 293-300.
- Abreu MJ, Souza E a, Lavras UF De, 2015. Investigation of Ss strains variability in Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **14**, 6879-6896.
- Agapow P-M, Burt A, 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* **1**, 101-102.
- Aldrich-Wolfe L, Travers S, Nelson BD, 2015. Genetic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* from multiple crops in the North Central United States. *PLoS ONE* **10**.
- Amselem J, Cuomo CA, van Kan JAL *et al.*, 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *sclerotinia sclerotiorum* and *botrytis cinerea*. *PLoS Genetics* **7**.
- Andersen AL, 1985. Common names for plant diseases bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Disease* **69**, 653.
- Anderson JB, Kohn LM, 1995. Clonality in soilborne, plant-pathogenic fungi. *33*, 369-391.
- Atallah ZK, Larget B, Chen X, Johnson D a, 2004. High Genetic Diversity, Phenotypic Uniformity, and Evidence of Outcrossing in *Sclerotinia Sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State. *Phytopathology* **94**, 737-742.
- Attanayake RN, Carter P a, Jiang D, Del Río-Mendoza L, Chen W, 2013. *Sclerotinia sclerotiorum* populations infecting canola from China and the United States are genetically and phenotypically distinct. *Phytopathology* **103**, 750-61.
- Attanayake RN, Porter L, Johnson DA, Chen W, 2012. Genetic and phenotypic diversity and random association of DNA markers of isolates of the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* from soil on a fine geographic scale. *Soil Biology and Biochemistry* **55**, 28-36.
- Attanayake RN, Tennekoone V, Johnson DA *et al.*, 2014. Inferring outcrossing in the homothallic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* using linkage disequilibrium decay. *Heredity* **113**, 353-363.
- Bardin SD, Huang HC, 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada1. *Canadian Journal of Plant Pathology* **23**, 88-98.
- Boland GJ, Hall R, 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of*

- Plant Pathology* **16**, 93-108.
- Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD, 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* **7**, 1-16.
- Brown AHD, Weir BS, 1983. Measuring genetic variability in plant populations. *Developments in Plant Genetics and Breeding* **1**, 219-239.
- Bruvo R, Michiels NK, D'Souza TG, Schulenburg H, 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology* **13**, 2101-2106.
- Burkart A, 1943. *Las leguminosas Argentinas, silvestres y cultivadas*. Buenos Aires: Editorial ACME, SACI.
- Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW, 1996. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 770-3.
- Carbone I, Anderson JB, Kohn LM, 1999. Patterns of Descent in Clonal Lineages and Their Multilocus Fingerprints are resolved with combined gene genealogies. *Evolution* **53**, 11.
- Carbone I, Kohn LM, 2000. Population history and process: nested clade and coalescent analysis of multiple gene genealogies in a parasite of agricultural and wild plants. *Department of Botany*, 270.
- Carbone I, Kohn LM, 2001. A microbial population – species interface : nested cladistic and coalescent inference with multilocus data. *Molecular Ecology* **10**, 947-964.
- Carmona M, Sautua F, 2017. La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. *Agronomía y ambiente* **37**, 1-19.
- Carpenter M a., Frampton C, Stewart A, 1999. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **27**, 13-21.
- Casalderrey NB, 2013. Contribución al manejo integrado de enfermedades de *Phaseolus vulgaris* en el Noroeste Argentino. Tesis de especialización. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Chung YS, Sass ME, Nienhuis J, 2008. Validation of RAPD markers for white mold resistance in two snap bean populations based on field and greenhouse evaluations. *Crop Science* **48**, 2265-2273.
- Clarkson JP, Coventry E, Kitchen J, Carter HE, Whipps JM, 2013. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in crop and wild hosts in the UK. *Plant Pathology* **62**, 309-324.
- Clarkson JP, Warmington RJ, Walley PG *et al.*, 2017. Population structure of *Sclerotinia subarctica* and *Sclerotinia sclerotiorum* in England, Scotland and Norway. *Frontiers in*

- Microbiology* **8**.
- Cooke BM, 2006. *The Epidemiology of Plant Diseases. (2nd edition) - Edited by B.M. Cooke, D. Gareth Jones and B. Kaye.*
- Cother EJ, 1977. Isolation of important fungi from seeds of *Cicer arietinum*. *Seed Science Techonolgy* **5**, 593-597.
- Crisci JV, López Armengol MF, 1983. Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. 128.
- Cubeta MA, Cody BR, Kohli Y, Kohn LM, 1997. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on Infected Cabbage in Eastern North Carolina. 1000-1004.
- Debouck DG, Hidalgo R, 1985. Morfología de la planta de frijol común. *CIAT, Cali, Colombia.*
- De Simone M, Failde V, 2002. El cultivo de poroto en la República Argentina. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, 297.
- Di Renzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW, 2014. InfoStat versión 2014.
- Dice LR, 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26**, 297-302.
- Dueck J, Sedun FS, 1983. Distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* in western Canada as indicated by sclerotial levels in rapeseed unloaded in Vancouver, 1973-1 981. *Canadian Plant disease Survey* **63**, 27-29.
- Dunn AR, Kikkert JR, Pethybridge SJ, 2017. Genotypic characteristics in populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from New York State, USA. *Annals of Applied Biology* **170**, 219-228.
- Durman SB, Menéndez AB, Godeas AM, 2003. Mycelial compatibility groups in Buenos Aires field populations of *Sclerotinia sclerotiorum* (Sclerotiniaceae). *Australian Journal of Botany* **51**, 421-427.
- Earl DA, vonHoldt BM, 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359-361.
- Ekins MG, Aitken EAB, Goulter KC, 2007. Aggressiveness among isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* from sunflower. *Australasian Plant Pathology* **36**, 580-586.
- Ekins MG, Hayden HL, Aitken EAB, Goulter KC, 2011. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on sunflower in Australia. *Australasian Plant Pathology* **40**, 99-108.
- Ender M, Kelly JD, 2005. Identification of QTL associated with white mold resistance in common bean. *Crop Science* **45**, 2482-2490.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using

- the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin (v. 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK, 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567-1587.
- FAO, 2018. FAOSTAT - División Estadística. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/>
- Ford EJ, Miller R V., Gray H, Sherwood JE, 1995. Heterokaryon formation and vegetative compatibility in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research* **99**, 241-247.
- Galván MZ, Aulicino MB, Medina SG, Balatti PA, 2001. Genetic diversity among Northwestern Argentinian cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **48**, 251-260.
- García Medina S, 2004. POROTO: Información sobre el manejo del cultivo. INTA EEA Salta. Salta.
- Geil PB, Anderson JW, 1994. Nutrition and health implications of dry beans: A review. *Journal of the American College of Nutrition* **13**, 549-558.
- Genetics P, Genetics P, Botany A, 1998. Curriculum Vitae of Shree P . Singh.
- Glass NL, Kaneko I, 2003. Fatal Attraction : Nonself Recognition and Heterokaryon Incompatibility in Filamentous Fungi. *Eukaryotic cell* **2**, 1-8.
- Gomes EV, Breseguello L, Augusto M, Nasser LCB, Petrofeza S, 2011. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. *Journal of Phytopathology* **159**, 94-99.
- González N, Godoy-Lutz G, Steadman JR, Higgins R, Eskridge KM, 2012. Assessing genetic diversity in the web blight pathogen *Thanatephorus cucumeris* (anamorph = *Rhizoctonia solani*) subgroups AG-1-IE and AG-1-IF with molecular markers. *Journal of General Plant Pathology* **78**, 85-98.
- Goodwin SB, Allard RW, Hardy SA, Webster RK, 1992. Hierarchical structure of pathogenic variation among *Rhynchosporium secalis* populations in Idaho and Oregon. *Canadian Journal of Botany* **70**, 810-817.
- Gower JC, 1966. Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis. *Biometrika* **53**, 325.
- Gracia-Garza JA, Neumann S, Vyn TJ, Boland GJ, 2002. Influence of crop rotation and tillage on production of apothecia by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant*

- Pathology* **24**, 137-143.
- Grünwald NJ, Goodwin SB, Milgroom MG, Fry WE, 2003. Analysis of Genotypic Diversity Data for Populations of Microorganisms. *Phytopathology* **93**, 738-746.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
- Hambleton S, Walker C, Kohn LM, 2002. previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology* **24**, 309-315.
- Heck KL, Belle GV, Simberloff D, 1975. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology* **56**, 1459-1461.
- Hemmati R, Javan-Nikkhah M, Linde CC, 2009. Population genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in Iran. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 617-628.
- Hirschhäuser S, Fröhlich J, 2007. Multiplex PCR for species discrimination of Sclerotiniaceae by novel laccase introns. *International Journal of Food Microbiology* **118**, 151-157.
- Holst-Jensen a, Vaage M, Schumacher T, Johansen S, 1999. Structural characteristics and possible horizontal transfer of group I introns between closely related plant pathogenic fungi. *Molecular biology and evolution* **16**, 114-126.
- Hurlbert SH, 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* **52**, 577-586.
- IICA, 2008. Guía de identificación y manejo integrado de enfermedades del frijol en América Central. Red SICTA, COSUDE. *Red SICTA, COSUDE, Managua*.
- Irani H, Heydari A, Javan-Nikkhah M, İbrahimov AŞ, 2011. Pathogenicity Variation and Mycelial Compatibility Groups in *Sclerotinia Sclerotiorum*. *Journal of Plant Protection Research* **51**, 329-336.
- Kamvar ZN, Amaradasa BS, Jhala R, McCoy S, Steadman JR, Everhart SE, 2017. Population structure and phenotypic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* from dry bean (*Phaseolus vulgaris*) in the United States. *PeerJ* **5**, e4152.
- Kamvar ZN, Brooks JC, Grünwald NJ, 2015. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics* **6**, 1-10.
- Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ, 2014. *Poppr*: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* **2**, e281.
- Kang H, Park D-S, Go S-J, 2002. M olecules Rice Primers Generated from Repetitive Sequence of Korean. *Molecules and Cells* **13**, 281-287.
- Karimi E, Safaie N, Shams-bakhsh M, 2012a. Isolates from different regions and host plants in Iran. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* **45**, 942-954.

- Karimi E, Safaei N, Shams-Bakhsh M, 2012b. Mycelial compatibility groupings and pathogenic diversity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations on canola in Golestan Province of Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* **14**, 421-434.
- Kohli Y, Morrall RAA, Anderson JB, Kohn LM, 1992. Local and trans-canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on Canola. *Phytopathology* **82**, 875-880.
- Kohli Y, Kohn LM, 1998. Random association among alleles in clonal populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *The American Phytopathological Society* **139**, 139-149.
- Kohn LM, 1979. Delimitation of the economically important plant pathogenic sclerotinia species. *The American Phytopathological Society* **69**, 881-886.
- Kohn LM, 1988. Restriction fragment polymorphism in nuclear and mitochondrial DNA of Sclerotinia species. *Phytopathology* **78**, 1047-1051.
- Kohn LM, Carbone I, Anderson J, 1990. Mycelial interactions in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Experimental Mycology* **267**, 255-267.
- Kohn LM, Stasovski E, Carbone I, Royer J, Anderson JB, 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology* **81**, 480-485.
- Kolkman JM, Kelly JD, 2002. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. *Crop Science* **42**, 693-699.
- Kolkman JM, Kelly JD, 2003. QTL conferring resistance and avoidance to white mold in common bean. *Crop Science* **43**, 539-548.
- Kull LS, Pedersen WL, Palmquist D, Hartman GL, 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* **88**, 325-332.
- Kull LS, Vuong TD, Powers KS, Eskridge KM, Steadman JR, Hartman GL, 2003. Evaluation of resistance screening methods for Sclerotinia stem rot of soybean and dry bean. *Plant Disease* **87**, 1471-1476.
- Legendre P, Legendre L, 1998. *Numerical ecology, Volume 24*. Amsterdam: Elsevier B.V.
- Lehner MS, Lima RC, Carneiro JES, Paula Junior TJ, Vieira RF, Mizubuti ESG, 2015a. Similar aggressiveness of phenotypically and genotypically distinct isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* **100**, 1-31.
- Lehner MS, Paula Júnior TJ, Hora Júnior BT et al., 2015b. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. *Plant Pathology* **64**, 921-931.
- Lehner MS, de Paula Júnior TJ, Vieira RF, Lima RC, Soares BA, Silva RA, 2016. Reaction of sources of resistance to white mold to microsatellite haplotypes of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientia Agricola* **73**, 184-188.

- Lehner MS, Mizubuti ESG, 2017a. Are *Sclerotinia sclerotiorum* populations from the tropics more variable than those from subtropical and temperate zones? *Tropical Plant Pathology* **42**, 61-69.
- Lehner MS, De Paula Júnior TJ, Del Ponte EM, Mizubuti ESG, Pethybridge SJ, 2017b. Independently founded populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from a tropical and a temperate region have similar genetic structure. *PLoS ONE* **12**, 1-14.
- Leslie JF, 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* **31**, 127-150.
- Litholdo Junior CG, Gomes E, 2011. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. *Genetics and molecular research : GMR* **10**, 868-877.
- Malvárez G, Carbone I, Grünwald NJ, Subbarao K V, Schafer M, Kohn LM, 2007. New Populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Lettuce in California and Peas and Lentils in Washington. *Phytopathology* **97**, 470-483.
- Mamaní González S, Vizgarra ON, Méndez D, Espeche C, Jalil A, Ploper D, 2015. *Campaña de poroto 2015: resultado de ensayos y análisis de campaña*. Reporte Agroindustrial, Estadísticas y márgenes de cultivos tucumanos EEAOC Nº 108.
- Manjunatha N, Prameela Devi T, Prabhakaran N, Navali VG, Swathi PS, 2014. Morphological and molecular diversity of *Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) De Bary isolates of India. *The bioscan* **9**, 1763-1767.
- Mann MB, Spadari CC, Feltrin T, Frazzon APG, Germani JC, Sand ST Van Der, 2014. Genetic variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates using URP-PCR. *Tropical Plant Pathology* **39**, 163-171.
- Mantel N, 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**, 209-220.
- Marín-Martínez R, Veloz-García R, Veloz-Rodríguez R et al., 2009. Antimutagenic and antioxidant activities of quebracho phenolics (*Schinopsis balansae*) recovered from tannery wastewaters. *Bioresource Technology* **100**, 434-439.
- Maxwell JJ, Brick MA, Byrne PF et al., 2007. Quantitative trait loci linked to white mold resistance in common bean. *Crop Science* **47**, 2285-2294.
- Mazzi Gonzales de Prada E, 2013. Ácido fólico y la prevención de los defectos del tubo neural. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría* **52**, 136-137.
- McDermott JM, McDonald BA, 1993. Gene Flow in Plant Pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* **31**, 353-373.
- McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and

- durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349-379.
- Meinhardt LW, Wulff N a, Bellato CM, Tsai SM, 2002. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. *Fitopatologia Brasileira* **27**, 211-215.
- Melzer MS, Smith EA, Boland GJ, 1997. Index of plant hosts of *Sclerotinia minor*. *Canadian Journal of Phytopathology* **19**, 272-280.
- Mert-Türk F, Ipek M, Mermer D, Nicholson P, 2007. Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Çanakkale Province of Turkey. *Journal of Phytopathology* **155**, 182-187.
- MHyFP, 2016. Informes de cadenas de valor: Legumbres. *Ministerio de Hacienda y Finanzas Publicas*, 1-35.
- Miklas PN, Grafton KF, Nelson BD, 1992. Screening for partial physiological resistance to white mold in dry bean using excised stems. *J. Amer.Soc. Hort. Sci.* **117**, 321-327.
- Miklas PN, Johnson WC, Delorme R, Gepts P, 2001. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. *Crop Science* **41**, 309-315.
- Miklas PN, Hauf DC, Henson RA, Grafton KF, 2004. Inheritance of ICA bensi-derived resistance to white mold in a navy x pinto bean cross. *Crop Science* **44**, 1584-1588.
- Miklas PN, Grafton KF, Hauf D, Kelly JD, 2006. Registration of partial white mold resistant pinto bean germplasm Line USPT-WM-1. *Crop Science* **46**, 2339.
- Miklas PN, Singh SP, 2007. Common Bean. In: *Pulses, Sugar and Tuber Crops*. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants 3, 1-27
- Miklas PN, Porter LD, Kelly JD, Myers JR, 2013. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. *European Journal of Plant Pathology* **135**, 525-543.
- Milgroom MG, 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 457-477.
- Mitidieri I de, 1980. Antecedentes y observaciones de la podredumbre del tallo de la soja *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. IDIA 385-386, 16-20.
- Mkwaila W, Terpstra KA, Ender M, Kelly JD, 2011. Identification of QTL for agronomic traits and resistance to white mold in wild and landrace germplasm of common bean. *Plant Breeding* **130**, 665-672.
- Mueller DS, Hartman GL, Pedersen WL, 1999. Development of Sclerotia and Apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from Infected Soybean Seed and Its Control by Fungicide Seed Treatment. *Plant Disease* **83**, 1113-1115.
- Negrillo AC, Pascual Gonzalez A, Ferreira Fernandez JJ, 2009. El moho blanco: una

- enfermedad común en el cultivo de la faba granja asturiana. *Tecnología agroalimentaria. SERIDA* **6**, 7-9.
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Nei M, Li W-H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 5269-5273.
- Njambere EN, Vandemark G, Chen W, 2010. Development and characterization of microsatellite markers of the fungal plant pathogen *Sclerotinia trifoliorum*. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* **53**, 494-500.
- Otto-Hanson L, Steadman JR, Higgins R, Eskridge KM, 2011. Variation in *Sclerotinia sclerotiorum* bean isolates from multisite resistance screening locations. *Plant Disease* **95**, 1370-1377.
- Paoli HP, Volante JN, Vale LM, Noé YE, Mosciaro MJ, Elena HJ, 2017. *Monitoreo de cultivos del Noroeste Argentino a partir de sensores remotos*. Salta.
- Park SO, Coyne DP, Steadman JR, Skroch PW, 2001. Mapping of QTL for resistance to white mold disease in common bean. *Crop Science* **41**, 1253-1262.
- Pascual A, Campa A, Pérez-Vega E, Giraldez R, Miklas PN, Ferreira JJ, 2010. Screening common bean for resistance to four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates collected in northern Spain. *Plant Disease* **94**, 885-890.
- Peakall R, Smouse PE, 2012. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* **28**, 2537-2539.
- Pérez-Vega E, Campa A, De la Rosa L, Giraldez R, Ferreira JJ, 2009. Genetic diversity in a core collection established from the main bean genebank in Spain. *Crop Science* **49**, 1377-1386.
- Pérez-Vega E, Pascual A, Campa A, Giraldez R, Miklas PN, Ferreira JJ, 2012. Mapping quantitative trait loci conferring partial physiological resistance to white mold in the common bean RIL population Xana × Cornell 49242. *Molecular Breeding* **29**, 31-41.
- Pethybridge SJ, Cobb AC, Dillard HR, 2015. Production of Apothecia and Ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Plant Health Instructor*.
- Petzoldt R, Dickson MH, 1996. Straw test for resistance to white mold in beans. *Annual Report Bean Improvement Cooperative*, 142-143.
- Pielou EC, 1975. Ecological diversity. *John Wiley and Sons, New York*, 165.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P, 2000. Inference of population structure using

- multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Remesal E, Jordán-Ramírez R, Jiménez-Díaz RM, Navas-Cortés JA, 2012. Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from sugar beet crops in Mediterranean-type climate regions. *Plant Pathology* **61**, 739-753.
- Robison FM, Turner MF, Jahn CE *et al.*, 2018. Common bean varieties demonstrate differential physiological and metabolic responses to the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell and Environment*, 1-14.
- Rohlf JF, 1998. *NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide*.
- Rohlf F, Sokal R, 1981. Comparing numerical taxonomic studies. *Systematic zoology* **30**, 459-490.
- Romero-Arenas O, Huato-Damián MA, Tapia-Rivera JA, Simón-Báez A, Lara-Huerta M, Huerta-Cabrera E, 2013. The Nutritional value of Beans (*Phaseolus vulgaris L.*) and its importance for Feeding of Rural communities in Puebla-Mexico. *Journal of Biological Sciences* **2**, 59-65.
- Saharan GS, Mehta N, 2008. *Sclerotinia diseases of crop plants: Biology, ecology and disease management*. Haryana: Springer Science Business Media B.V
- Sanford CE, Coley-Smith JR, 1992. Production and germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology* **41**, 154-156.
- Schafer MR, Kohn LM, 2006. An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia* **98**, 593-597.
- Schlotterer C, 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**, 365-371.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S *et al.*, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 6241-6246.
- Schwartz HF, Pastor-Corrales MA, 1988. *El Moho Blanco Del Frijol Y Su Manejo*. Cali, Colombia: CIAT.
- Schwartz HF, Otto K, Terán H, Lema M, Singh SP, 2006. Inheritance of White Mold Resistance in *Phaseolus vulgaris* × *P. coccineus* Crosses. *Plant Disease* **90**, 1167-1170.
- Schwartz HF, Singh SP, 2013. Breeding common bean for resistance to white mold: A review. *Crop Science* **53**, 1832-1844.
- Sexton AC, Howlett BJ, 2004. Microsatellite markers reveal genetic differentiation among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. *Current Genetics* **46**, 357-365.

- Sexton AC, Whitten AR, Howlett BJ, 2006. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in an Australian canola field at flowering and stem-infection stages of the disease cycle. *Genome* **49**, 1408-1415.
- Sgarbieri VC, Whitaker JR, 1982. Physical, chemical, and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Advances in food research* **28**, 93-166.
- Shaner G, Finney RE, 1977. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. *Phytopathology* **77**, 1051-1056.
- Shannon CE, 1948. A mathematical theory of communication. *Bell system technical journal*, **27**(3), 379-423.
- Shannon CE, Weaver W, 1963. The Mathematical Theory of Communication. *The mathematical theory of communication* **27**, 117.
- Sid Ahmed A, Ezziyyani M, Perez Sanchez C, Candela M, 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 633-637.
- Silva PH, Santos JB, Lima IA, Lara LAC, Alves FC, 2014. Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. *Genetics and molecular research : GMR* **13**, 9138-9151.
- Simpson EH, 1949. Measurement of diversity. *Nature* **163**:688.
- Singh SP, Gepts P, Debouck D, 1991. Races of Common Bean. *Economic Botany* **45**, 379-396.
- Singh SP, Terán Santofimio H, Molina Castañeda A, Gutiérrez F. JA, 1992. Combining ability for seed yield and its components in common bean of Andean origin. *Crop Science (USA)* **32**(1):81-84.
- Singh SP, Terán H, Lema M, Schwartz HF, Miklas PN, 2007. Registration of white mold resistant dry bean germplasm Line A 195. *Journal of Plant Registrations* **1**, 62-63.
- Singh SP, Terán H, Schwartz HF, Otto K, Lema M, 2009a. Introgressing white mold resistance from *Phaseolus* species of the secondary gene pool into common bean. *Crop Science* **49**, 1629-1637.
- Singh SP, Terán H, Schwartz HF, Otto K, Lema M, 2009b. White Mold-Resistant interspecific common bean germplasm lines VCW 54 and VCW 55. *Journal of Plant Registrations* **3**, 191.
- Singh SP, Terán H, Schwartz HF *et al.*, 2013. White Mold-Resistant, Interspecific Common Bean Breeding Line VRW 32 Derived from. *Journal of Plant Registrations* **7**, 95.
- Singh SP, Schwartz HF, Terán H, Viteri D, Otto K, 2014a. Pyramiding white mould resistance between and within common bean gene pools. *Canadian Journal of Plant Science* **94**, 947-954.

- Singh SP, Schwartz HF, Viteri D, Terán H, Otto K, 2014b. Introgressing white mold resistance from *Phaseolus coccineus* PI 439534 to common pinto bean. *Crop Science* **54**, 1026-1032.
- Singh SP, Schwartz HF, Terán H, Centeno C, Otto K, 2016. Registration of Common Bean Pinto PRP 153 and VCP 13 with High Levels of Broad-Spectrum White Mold Resistance. *Journal of Plant Registrations*, 291-295.
- Sirjusingh C, Kohn LM, 2001. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Ecology Notes* **1**, 267-269.
- Slatkin M, 1994. Gene flow and population structure. En: Ecological Genetics (ed Real LA). Pp. 3-18. Princeton University Press.
- Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG, 1993. How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 4384-4388.
- Sneath P, Sokal RR, 1973. Numerical Taxonomy. *The principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman and Company. San Francisco, USA. 574p
- Soule M, Porter L, Medina J, Santana GP, Blair MW, Miklas PN, 2011. Comparative QTL map for white mold resistance in common bean, and characterization of partial resistance in dry bean lines VA19 and I9365-31. *Crop Science* **51**, 123-139.
- Steadman JR, 1983. White mold - A serious yield limiting disease of bean. *Plant Disease* **67**, 346-350.
- Steadman JR, Boland GJ, 2005. White Mold. In: H.F. Schwartz, J.R. Steadman, R. Hall and RLF, ed. *Compendium of Bean Diseases 2nd ed.* St. Paul, MN., 44-46.
- Stenglein S, 2007. Mancha angular del poroto. Variabilidad del agente etiológico *Phaeoisariopsis griseola* y tolerancia de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*. Universidad de Buenos Aires.
- Stoddart JA, Taylor JF, 1988. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics*, **118**:705-711.
- Suarez Martinez SE, Ferriz-Martinez RA, Campos-Vega R, Elton-Puente JE, De La Torre Carbot K, Garcia-Gasca T, 2016. Bean seeds: Leading nutraceutical source for human health. *CYTA - Journal of Food* **14**, 131-137.
- Sun J, Irzykowski W, Jedryczka M, Han F, 2005. Analysis of the genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations from different regions and host plants by random amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**, 385-395.
- Taylor J, Jacobson D, Fisher M, 1999. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology* **37**, 197-246.

- Terán H, Lema M, Schwartz HF, Duncan R, Gilbeilson R, Singh SP, 2006. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* **49**, 115-116.
- Terán H, Singh SP, 2009a. Gamete selection for improving physiological resistance to white mold in common bean. *Euphytica* **167**, 271-280.
- Terán H, Singh SP, 2009b. Efficacy of three greenhouse screening methods for the identification of physiological resistance to white mold in dry bean. *Canadian Journal of Plant Science* **89**, 755-762.
- Terán H, Singh SP, 2010. Recurrent selection for physiological resistance to white mould in dry bean. *Plant Breeding* **129**, 327-333.
- Terpstra KA, Kelly JD, 2008. Qtl Analysis of white mold resistance in an inbred backcross mapping population derived from a wild mexican bean. *BIC Annual Report*, 3-4.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: 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.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J *et al.*, 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 5129-5133.
- Tu JC, 1988. The Role of White Mold-Infected White Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seeds in the Dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of Phytopathology*, **121**(1), 40-50.
- Uhm J., 1983. Ascospore dimorphism in *Sclerotinia trifoliorum* and cultural characters of strains from different-sized spores. *Phytopathology* **73**, 565-569.
- Uhm JYY, Fujii H, 1983. Heterothallism and mating type mutation in *Sclerotinia trifoliorum*. *Phytopathology* **73**, 569-572.
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J, 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 472-489.
- Viteri DM, Otto K, Terán H, Schwartz HF, Singh SP, 2015a. Use of four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different aggressiveness, three inoculations per plant, and delayed multiple evaluations to select common beans with high levels of white mold resistance. *Euphytica* **204**, 457-472.
- Viteri DM, Singh SP, 2015. Inheritance of White Mold Resistance in an Andean Common Bean A 195 and its relationship with Andean G 122. *Crop Science* **55**, 44.
- Vizgarra ON, Espeche C, Mamaní González S, Velazquez D, Ploper LD, 2012. Consideraciones generales de la campaña de poroto 2012 y resultados de los ensayos evaluados en el

- Noroeste Argentino. *Avance Agroindustrial*, 33:29–34.
- Vizgarra ON, Espeche C, Ploper LD, 2016. *Manual Técnico del Cultivo del Poroto para el Noroeste Argentino*. Las Lajitas, Tucumán, Argentina.
- Volante JN, García Medina S, Paoli HP, Fili M, Bianchi A, Garkus C, 2004. *Evaluación de daños por heladas en cultivos de poroto en Salta y Jujuy. Campaña agrícola 2003-2004*. Salta, Argentina.
- Voysest O, 2000. *Mejoramiento genético del frijol*. CIAT, Cali, Colombia.
- Vuong TD, Hoffman DD, Diers BW, Miller JF, Steadman JR, Hartman GL, 2004. Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop Science* **44**, 777-783.
- Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358.
- Whipps JM, Sreenivasaprasad S, Muthumeenakshi S, Rogers CW, Challen MP, 2008. Use of *Coniothyrium minitans* as a biocontrol agent and some molecular aspects of sclerotial mycoparasitism. *European Journal of Plant Pathology* **121**, 323-330.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 315-322.
- Willetts HJ, Wong J a.-L, 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S.trifoliorum*, and *S.minor* with emphasis on specific nomenclature. *The Botanical Review* **46**, 101-165.
- Winton LM, Krohn AL, Leiner RH, 2006. Genetic diversity of Sclerotinia species from Alaskan vegetable crops. *Canadian Journal of Plant Pathology* **28**, 426-434.
- Zancan WLA, Steadman JR, Higgins R, Jhala R, Da Machado JC, 2015. Variação genética e agressividade entre isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* provindos de campos de feijão do Brasil. *Bioscience Journal* **31**, 1143-1151.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T, 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* **11**, 1-16.
- Zeng W, Kirk W, Hao J, 2012. Field management of Sclerotinia stem rot of soybean using biological control agents. *Biological Control* **60**, 141-147.
- Zhan J, Pettway RE, McDonald BA, 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology* **38**, 286-297.

ANEXO

Tabla A1. Perfil de microsatélites de los 109 aislados de *S. sclerotiorum*.

Aislado	Localidad	Locus										MLH ^a	MCG ^b
		7-2	9-2	12-2	13-2	106-4	114-4	8-3	36-4	92-4			
SS2	Orán	170	349	215	259	488	386	239	366	344	30	2	
SS4	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS5	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS6	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS7	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS8	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS9	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS10	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS11	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS12	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS13	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS14	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS15	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS16	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS17	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS18	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS19	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS20	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS21	Orán	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	3	
SS22	Campichuelo	170	339	207	259	451	376	253	366	344	6	4	
SS23	Campichuelo	170	339	207	259	451	376	253	366	344	6	5	
SS24	Campichuelo	170	339	207	259	451	376	253	366	344	6	5	
SS25	Campichuelo	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	6	
SS26	Campichuelo	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	6	
SS27	Campichuelo	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	6	
SS28	Campichuelo	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	6	
SS29	Campichuelo	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	6	
SS30	Campichuelo	170	339	207	259	488	363	234	366	344	7	7	
SS31	Campichuelo	162	339	210	296	451	390	234	366	344	1	8	
SS32	Campichuelo	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	9	
SS33	Campichuelo	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	9	
SS34	Campichuelo	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	9	
SS35	Campichuelo	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	9	
SS37	Pichanal	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	10	
SS38	Pichanal	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	10	
SS39	Pichanal	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	11	
SS40	Pichanal	170	339	207	259	451	376	253	366	344	6	12	
SS41	Pichanal	170	339	210	259	451	376	253	366	344	11	13	
SS42	Pichanal	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	12	
SS43	Pichanal	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	14	
SS44	Pichanal	170	339	207	259	451	376	253	366	344	6	14	
SS45	Pichanal	170	339	207	259	488	363	234	366	344	7	14	
SS46	Pichanal	170	339	210	259	488	363	234	366	344	12	14	
SS47	Pichanal	170	349	210	277	488	390	239	366	344	21	12	
SS48	Pichanal	170	349	210	277	488	390	239	366	344	21	12	
SS49	Pichanal	170	349	210	277	488	390	239	366	344	21	12	
SS50	Pichanal	170	349	210	277	488	390	239	366	344	21	12	
SS51	Palma Sola	170	339	215	277	488	363	239	366	344	14	15	
SS52	Palma Sola	170	339	215	277	488	363	239	366	344	14	16	

Tabla A1. (Continuación).

Aislado	Localidad	Locus										MLH ^a	MCG ^b
		7-2	9-2	12-2	13-2	106-4	114-4	8-3	36-4	92-4			
SS54	Palma Sola	170	339	215	277	488	363	239	366	344	14	16	
SS55	Palma Sola	170	339	215	277	488	363	239	366	344	14	16	
SS56	Palma Sola	170	364	215	277	451	386	239	366	344	3	17	
SS57	Palma Sola	170	339	210	296	488	390	239	366	344	9	18	
SS59	Palma Sola	170	349	215	277	488	363	239	366	344	26	16	
SS60	Palma Sola	170	349	215	277	488	363	239	366	344	26	16	
SS61	Palma Sola	170	349	215	277	488	363	239	366	344	26	16	
SS62	Palma Sola	170	339	210	277	488	390	239	366	344	10	19	
SS63	Palma Sola	170	349	215	259	488	386	253	366	344	29	19	
SS64	Palma Sola	170	349	207	277	488	390	234	366	344	16	19	
SS65	Palma Sola	170	339	215	277	488	363	234	366	344	13	20	
SS87	Gral. Ballivian	170	349	207	277	471	390	239	366	344	15	21	
SS90	Gral. Ballivian	162	339	210	296	451	390	234	366	344	1	22	
SS93	Gral. Ballivian	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	21	
SS95	Gral. Ballivian	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	21	
SS97	Gral. Ballivian	162	349	210	296	451	386	234	366	344	2	23	
SS99	Gral. Ballivian	170	339	207	277	488	386	239	366	344	4	24	
SS100	Gral. Ballivian	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	24	
SS101	Gral. Ballivian	170	349	207	277	488	386	239	366	344	17	24	
SS102	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	24	
SS103	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	25	
SS104	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	26	
SS105	Gral. Ballivian	170	349	210	277	451	386	253	366	344	20	27	
SS106	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	28	
SS107	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	28	
SS109	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	29	
SS110	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	30	
SS111	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	30	
SS112	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	390	239	366	344	21	30	
SS113	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	390	239	366	344	21	30	
SS114	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	390	239	366	344	21	30	
SS115	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	30	
SS116	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	30	
SS117	Gral. Ballivian	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	30	
SS118	Gral. Ballivian	170	339	207	259	488	363	234	366	344	7	31	
SS142	Tartagal	170	349	210	277	488	390	239	366	344	21	33	
SS143	Tartagal	170	349	210	277	488	390	239	366	344	21	34	
SS144	Tartagal	170	349	215	259	488	376	253	366	344	28	35	
SS145	Tartagal	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	36	
SS146	Tartagal	170	349	210	277	471	376	239	366	344	19	37	
SS149	Tartagal	170	339	207	259	451	376	253	366	344	6	38	
SS150	Tartagal	170	339	207	259	488	363	234	366	344	7	39	
SS151	Tartagal	170	349	210	296	488	386	239	366	344	18	40	
SS152	Tartagal	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	41	
SS154	Tartagal	170	339	207	259	488	386	234	366	344	8	42	
SS155	Tartagal	170	349	210	277	471	376	239	366	344	19	43	
SS156	Tartagal	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	36	
SS157	Tartagal	170	349	210	277	471	376	239	366	344	19	44	
SS158	Tartagal	170	349	210	277	488	376	239	366	344	22	44	
SS160	Tartagal	170	339	207	259	451	390	234	366	344	5	45	
SS164	Tartagal	170	339	207	259	488	363	234	366	344	7	41	

Tabla A1. (Continuación).

Aislado	Localidad	Locus									MLH ^a	MCG ^b
		7-2	9-2	12-2	13-2	106-4	114-4	8-3	36-4	92-4		
SS165	Tartagal	170	349	210	277	488	386	239	366	344	23	41
SS168	Tartagal	170	349	210	296	488	386	239	366	344	18	41
SS170	Tartagal	170	339	207	259	488	363	234	366	344	7	47
SS171	Tartagal	170	349	210	277	488	390	239	366	344	21	48
SS172	Tartagal	170	349	215	277	488	376	253	366	344	27	49
SS173	Tartagal	170	349	210	259	471	376	239	366	344	24	50
SS175	Tartagal	170	349	215	259	488	376	253	366	344	28	52
SS176	Tartagal	170	349	210	259	488	390	239	366	344	25	51

^aMLH: Haplótipo multilocus. ^bMCG: Grupo de compatibilidad micelial.

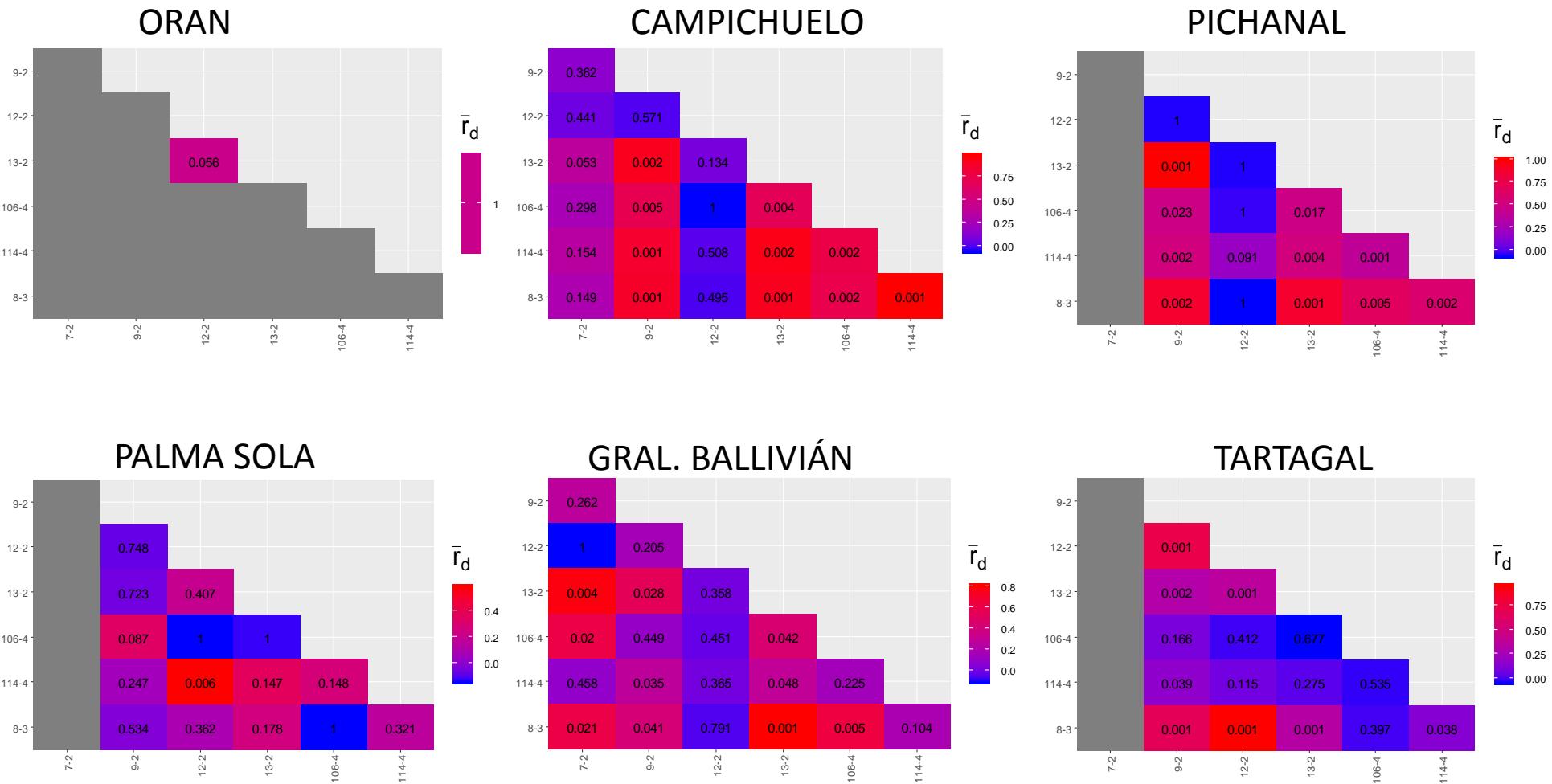


Figura A1. Mapa de calor (heatmap) de los valores del desequilibrio de ligamiento (\bar{r}_d) de los siete loci de microsatélites de *S. sclerotiorum* por población, antes de la corrección de clones. Dentro de los cuadrados figura el valor P para su correspondiente \bar{r}_d .

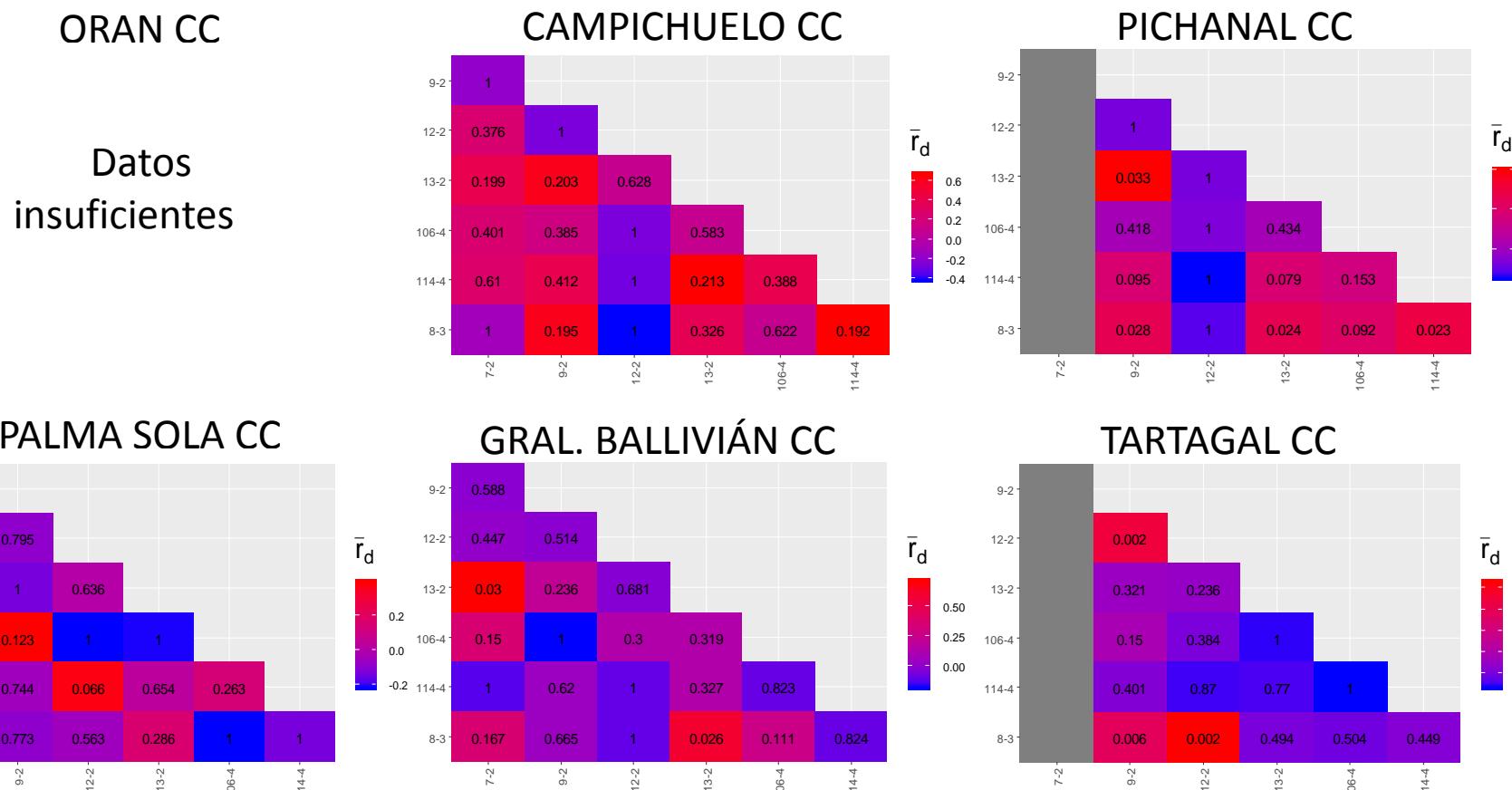


Figura A2. Mapa de calor (heatmap) de los valores del desequilibrio de ligamiento (\bar{r}_d) de los siete loci de microsatélites de *S. sclerotiorum* por población, después de la corrección de clones. Dentro de los cuadrados figura el valor P para su correspondiente \bar{r}_d .

