



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES

Departamento de Ciencias Biológicas
Cátedra de fitopatología

INFORME DE TRABAJO FINAL
Susceptibilidad de *Crotalaria spp.* a *Sclerotinia sclerotiorum*.

Lucila María Kohan

Legajo n°: 26715/0

DNI: 35126972

lukohan@hotmail.com

Director: Dr. Pedro Balatti

Co-director: Dr. Walber Luiz Gavassoni

30 de noviembre de 2016

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| INDICE DE TABLAS | ii |
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| Hipótesis | 6 |
| Objetivos | 6 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 7 |
| Evaluación del comportamiento de <i>Crotalaria spp.</i> frente a <i>S. sclerotiorum.</i> | 7 |
| Material vegetal y tratamientos..... | 7 |
| Medición del progreso de la enfermedad..... | 8 |
| Peso de esclerocios, peso fresco y peso seco. | 9 |
| Diseño y análisis estadístico. | 9 |
| Evaluación de la metodología de inoculación de hojas cosechadas de <i>Crotalaria.</i> | 9 |
| Material vegetal y tratamientos..... | 9 |
| Medición del progreso de la enfermedad..... | 10 |
| Diseño y análisis estadístico. | 11 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 12 |
| Evaluación del comportamiento de <i>Crotalaria spp.</i> frente a <i>S. sclerotiorum.</i>..... | 12 |
| Evaluación de la metodología de inoculación de hojas cosechadas de <i>Crotalaria.</i> | 15 |
| CONCLUSIONES | 18 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 19 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Incidencia de plantas con lesión (%), índice de enfermedad de McKinney, área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE), peso de esclerocios (g) y plantas muertas (%) en especies de <i>Crotalaria</i> inoculadas con <i>S. sclerotiorum</i> . Dourados 2013. | 12 |
| Tabla 2. Peso seco (PS) de hojas (g) de <i>Crotalaria</i> inoculadas (INOC) con <i>S. sclerotiorum</i> y no inoculadas (NI). Dourados 2013..... | 14 |
| Tabla 3. Peso seco (PS) de tallos (g) de <i>Crotalaria</i> inoculadas (INOC) con <i>S. sclerotiorum</i> y no inoculadas (NI). Dourados 2013..... | 15 |
| Tabla 4. Severidad en hojas cosechadas, inoculadas con flores, en función del tiempo de exposición de las flores a <i>S. sclerotiorum</i> y con disco de PDA con micelio, en las caras adaxial y abaxial de hojas de <i>C. anagyroides</i> . Dourados 2013..... | 16 |
| Tabla 5. Severidad en hojas cosechadas, inoculadas con flores, en función del tiempo de exposición de las flores a <i>S. sclerotiorum</i> y con disco de PDA con micelio, en las caras adaxial y abaxial de hojas de <i>C. anagyroide</i> . Dourados 2013. | 17 |
| Tabla 6. Área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE) y peso de esclerocios (g) en hojas cosechadas de <i>C. anagyroides</i> inoculadas con flores con diferentes tiempos de exposición a <i>S. sclerotiorum</i> y con discos de PDA con micelio, en las caras adaxial y abaxial de las hojas. Dourados 2013. | 17 |

RESUMEN

La *Crotalaria* (*Crotalaria spp L*) es utilizada como abono verde ya que produce grandes volúmenes de biomasa, fija N₂ simbiótico y contribuye al biocontrol de nematodos. Sin embargo, las diversas especies se ajustan a diversos sistemas y regiones de cultivo y por ello se debe realizar la selección adecuada de la misma, para un sistema y una región particular. Un aspecto a tener en cuenta, es el comportamiento de la especie frente a los organismos fitopatógeno tradicionalmente presentes en la zona, entre lo que se debe considerar si es hospedante de estos organismos, si eleva la población de los mismos y si afecta el cultivo target. En este trabajo se evaluó el comportamiento de diferentes especies de *Crotalaria*, con el fin de utilizarlas en rotación con soja en áreas con probabilidad de incidencia del hongo fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Se inocularon diferentes especies de *Crotalaria* con *S. sclerotiorum*, para ello se insertaron en los tallos de las plantas escarbadienes con micelio del patógeno. La incidencia se evaluó, haciendo un recuento de plantas infectadas, la severidad en base al tamaño de la lesión causada y mediante el índice de enfermedad de Mckinney, que combina el tamaño de la lesión y su frecuencia de aparición, el área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE), peso fresco y seco de hojas y tallos y peso de los esclerocios. No se observaron diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad entre las especies, sin embargo los valores de índice de enfermedad y de ADCPE en *C. grahamiana* fueron los menores. Los mayores valores fueron para *C. ochroleuca*. Los menores valores de peso seco fueron de *C. ochroleuca* y *C. paulina* y los más altos de *C. grahamiana* y *C. breviflora*. Otro experimento consistió en evaluar un método de inoculación diferente, el mismo se basó en colocar pétalos de flores previamente incubados con micelio de *S. sclerotiorum* sobre hojas de *Crotalaria* cosechadas. El método fue eficiente cuando los pétalos se incubaron por un tiempo de 48 h a 72 h.

INTRODUCCIÓN

La soja (*Glycine max* (L.) Merrill) es una de las oleaginosas cultivadas más importantes del mundo. Estados Unidos es el primer productor acreditando una producción de 108 millones de toneladas, es seguido por Brasil con 85 millones de toneladas y Argentina con 57 millones de toneladas, los que en total representaron el 80% de la producción en la cosecha 2014/2015 (USDA, 2015; SIIA, 2015; CONAB, 2015).

Entre los factores que limitan la máxima productividad de los cultivos se encuentran las enfermedades causadas por fitopatógenos. En el cultivo de soja, a nivel mundial, los patógenos causan pérdidas de rendimiento entre un 10 y un 15%. En la Argentina, dichas pérdidas representan entre el 8% y 10% de la producción (Distefano, 2013) mientras que en Brasil, las pérdidas rondan entre 15% y 20% (EMBRAPA 2013).

El control de las enfermedades puede realizarse mediante diversas estrategias, tales como la utilización de variedades resistentes, control químico, control biológico, y también, mediante el uso de plantas antagónicas, las cuales producen compuestos que afectan al patógeno y su supervivencia (compuestos nematocidas, bactericidas o fungicidas) (Tu, 1997). Un ejemplo de esto acontece en Brasil y en otras partes del mundo con el uso de abonos verdes de *Crotalaria* (*Crotalaria spp* L) en rotación con otros cultivos, para el control de nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne spp*) (EMBRAPA, 2013, Inomoto et. al., 2008). El género *Meloidogyne spp* ha sido citado entre los 6 géneros de nematodos más importantes debido a su gran difusión y por las pérdidas que ocasiona en el mundo en el cultivo de soja (Jones & Fenoll, 2011, EMBRAPA 2010, Doucet 1997). En Argentina se lo ha encontrado y provoca una reducción del rendimiento en las provincias de Córdoba, Tucumán y Santa Fe (Baigorri et al., 1998). El número de cultivares de soja resistentes a *Meloidogyne spp* es muy limitado (Silva, 1998).

Las *Crotalarias* producen compuestos nematocidas a través de tres mecanismos: (1) compuestos repelentes que afectan el desarrollo larval de *Meloidogyne spp*; (2) exudación radicular de compuestos tóxicos también presentes en las hojas y las semillas; (3) estimulación de microflora antagonista durante la descomposición de la planta (EMBRAPA 2013, Ratnadass et. al. 2012, Inomoto et. al. 2008, Wang et. al. 2006).

El género *Crotalaria* (*Crotalaria spp L.*) pertenece a la familia de las leguminosas, subfamilia papilionoidea, incluye 325 especies distribuidas en todo el mundo. En Brasil, las especies más frecuentes son *Crotalaria juncea*, *C. breviflora*, *C. ochroleuca* y *C. spectabilis*. En Argentina existen 12 especies nativas, entre ellas *C. paulina* y *C. spectabilis* (Gómez-Sosa, 2000).

Si bien cada especie presenta características propias, la *Crotalaria* es una planta anual de porte herbáceo o arbustivo de 0.5 a 3 m de altura, tallo erecto o ramificado, herbáceo, semileñoso o leñoso, con hojas 3-5 folioladas, unifoliolada o simples, flores con corola generalmente amarilla, 10 estambres monadelfos y anteras dimorfas, raíces profundas de tipo pivotante que llegan a los 80cm de profundidad (Lewis et. al.1987, Navas & Bernal 1999).

La *Crotalaria* es utilizada como abono verde, en rotación con otros cultivos, a veces también consociada, ya que es poco exigente en calidad de suelo, tiene un gran potencial de fijación biológica de nitrógeno y además produce una considerable cantidad de biomasa. Se estima que un cultivo de *Crotalaria* puede aportar entre 80 y 100 kg. N⁻¹.ha.⁻¹ año⁻¹ y hasta 15,8 ton de materia seca.ha⁻¹ (Miyasaka et. al.1966).

En Brasil, cada vez son más frecuentes las rotaciones que incluyen especies de *Crotalaria*, principalmente en las grandes regiones productoras de soja. Los abonos verdes con especies de *Crotalarias* tales como *C. spectabilis*, *C. juncea*, *C. ochroleuca*, *C. paulina*, *C. breviflora* y *C. grahamiana* como ya se mencionó, también controlan nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne spp*).

La *Crotalaria* además, compite con las malezas, crece vigorosamente, proporciona una buena cobertura del suelo que lo protege contra la erosión (Wang et. al., 2002), contribuye a aumentar el contenido de materia orgánica, mejorando la estructura del suelo y la conservación del agua, favorece el reciclaje de nutrientes, estimula el crecimiento de una flora antagónica que beneficia el control de plagas y la mejora de la actividad microbiológica (Lordello, 1982).

Es por esto que los abonos verdes de *Crotalaria* son piezas fundamentales dentro de los sistemas de producción. Sin embargo, es preciso analizar la especie de *Crotalaria* que se pretende introducir en la rotación para cada sistema y región. Un aspecto importante a tener en cuenta es su susceptibilidad frente a organismos patógenos presentes en la zona de cultivo, de manera que su utilización no conduzca a la multiplicación de los mismos, ya que de la misma forma que esta planta puede reducir la población de nematodos, mediante su acción nematicida, también podría aumentar la fuente de inóculo de otro patógeno que luego afecte al

cultivo target (Reis et al., 2011). Esto sucedió en algunas regiones de Brasil durante el ciclo de cultivo 2013/2014 en que se describió la presencia de *Sclerotinia sclerotiorum* atacando cultivos de Crotalaria utilizados en rotación con soja (Oliveira et. al. 2013).

Sclerotinia sclerotiorum es un fitopatógeno que provoca daños y pérdidas de rendimiento en el cultivo de soja, girasol y colza tanto en la Argentina como en Brasil. En Brasil se estima que *S. sclerotiorum* ocasiona reducciones del rendimiento de los cultivos de soja y girasol del 40%. (EMBRAPA, 2011). En Argentina también es una de las enfermedades más importantes de estos cultivos, ya que provoca pérdidas del rendimiento de soja de hasta 55% (Ploper, 2004).

Sclerotinia sclerotiorum (Lib) de Bary pertenece a la familia Sclerotinaceae, del orden Helotiales, phylum Ascomycota. Este patógeno de suelo ataca primordialmente la raíz y los tallos de las plantas. Se encuentra distribuido mundialmente y afecta cerca de 75 familias, 278 géneros y 408 especies o variedades de plantas, siendo la mayoría dicotiledóneas de gran importancia económica (Boland & Hall, 1994). Por este motivo se ha clasificado como una enfermedad polífaga. *S. sclerotiorum* presenta hifas hialinas septadas ramificadas y multinucleadas, con micelio que varía de color blanco a castaño amarillento. Los esclerocios, las estructuras de resistencia del hongo, están formados por hifas firmemente entrelazadas, constituyendo así cuerpos duros, oscuros, de forma variable, a veces compacta y redondeada y otras chatos y delgados cuando se desarrollan en cavidades del tejido, tomando la forma del mismo.

Al realizar un corte de los esclerocios, se observa una capa delgada, la corteza externa, luego otra más espesa, el pseudoparénquima, y finalmente la masa interior constituida por hifas hialinas entrelazadas, el prosénquima. Estas estructuras juegan un papel importante en la protección contra condiciones adversas y contra ataques de microorganismos. Pueden permanecer en el suelo varios años hasta que las condiciones ambientales sean las adecuadas para germinar (Bolton et. al., 2006).

El crecimiento de este hongo es óptimo en un rango de temperaturas de 15°C a 21°C. Los esclerocios pueden dar lugar al desarrollo del hongo de dos maneras distintas; una consiste en la germinación carpogénica, donde ocurre la formación de apotecios dando origen a las esporas sexuales (ascosporas) dentro de ascas, los cuales al madurar son eyectadas y pueden infectar los estratos superiores de las plantas. Para que ocurra la germinación carpogénica se deben dar temperaturas de entre 10-20°C y luz suficiente (fotoperiodo, calidad e intensidad), caso contrario solo

ocurre la germinación miceliogénica, que promueve la formación de hifas que atacan los tejidos de las plantas (Le Tourneau, 1979; Purdy, 1979) y cuyo potencial epidémico es mucho más reducido (Wong & Willetts, 1980).

Los síntomas de la enfermedad por lo general incluyen lesiones acuosas en tallos, pecíolos y hojas, en las que se desarrolla tejido necrótico, con posterior formación de micelio blanco y de esclerocios. Los esclerocios se forman típicamente en el interior del tejido infectado, a menudo en la médula del tallo, pero se puede formar en la superficie de los tejidos durante condiciones de alta humedad. La enfermedad provoca marchitamiento, detención del crecimiento y frecuentemente muerte de plantas (Bolton et. al. 2006). El control de la enfermedad envuelve una serie de medidas integradas: selección del área de cultivo, rotación con cultivos no susceptibles, tratamiento de semillas, densidad de siembra, control químico y utilización de cultivares resistentes (Tu, 1997).

Caracteres morfológicos como arquitectura de la planta, días a floración, el patrón de ramificación y contenido de lignina y ceras, funcionan como mecanismos de escape para controlar la enfermedad. Tales caracteres además, afectan las condiciones micro climáticas, como humedad, luminosidad y aireación, que influyen en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad (Kolkman & Kelly, 2002).

Las distintas respuestas que desarrollan las plantas cuando interactúan con organismos fitopatógenos dependen de la presencia y activación de los mecanismos de defensa. Las plantas tolerantes interactúan con patógenos y desarrollan algunos síntomas pero el rendimiento no es afectado y esto se conoce como resistencia horizontal (Agrios, 2005). Por otro lado existen plantas que contienen genes de resistencia que reconocen los genes de avirulencia del patógeno y así no se enferman, esta resistencia se conoce como vertical. Estas últimas interactúan con el patógeno y desarrollan áreas necróticas conocidas como reacciones de hipersensibilidad que demuestran que la planta resiste la interacción con el patógeno y no se enferma (Agrios, 2005). Por lo tanto, es importante conocer cuáles son las especies de *Crotalaria* que podrían ser utilizadas en rotación con la soja en base a su comportamiento frente a *S. sclerotiorum* ya que, debido a los mecanismos de defensa estructurales y bioquímicos particulares de cada especie, podrían presentar distinto comportamiento frente *Sclerotinia sclerotiorum*, y así responder de manera diferencial al fitopatógeno (Agrios, 2005).

Hipótesis

-Las especies del género *Crotalaria* difieren en su respuesta a la inoculación con el fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

-Es posible evaluar la respuesta a *Sclerotinia sclerotiorum* a través de la inoculación de hojas de *Crotalaria* cosechadas y no necesariamente de la planta entera.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo fueron:

1. Evaluar la respuesta de ocho especies de *Crotalaria*, al inocular las plantas con el agente etiológico *Sclerotinia sclerotiorum*.
2. Evaluar el uso de hojas de *Crotalaria* para estudiar la respuesta a la inoculación con *Sclerotinia sclerotiorum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología y Fitopatología agrícola (LMAF) y en el invernáculo de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidade Federal de Grandes Dourados (UFGD), localizada en la ciudad de Dourados, en el Estado de Mato Grosso do sul, Brasil, en el periodo octubre 2013-marzo 2014, en el marco del programa MARCA (Programa de Movilidad Académica del MERCOSUR).

Evaluación del comportamiento de *Crotalaria* spp. frente a *S. sclerotiorum*.

Se evaluó el comportamiento de ocho especies de *Crotalaria* que se inocularon con *Sclerotinia sclerotiorum*. Las especies evaluadas fueron: *Crotalaria breviflora*, *C. juncea*, *C. paulina*, *C. ochroleura*, *C. spectabilis*, *C. grahamiana*, *C. sp.* y *C. anagyroides*. Las semillas de estas especies se adquirieron en empresas productoras de semillas, en EMBRAPA Agropecuaria Oeste, en el Instituto Agronômico de Campinas y en la Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Material vegetal y tratamientos.

La siembra de las semillas se realizó el 1/09/2013 en macetas plásticas conteniendo 4,4 dm³ de suelo Latosolo Rojo Distroférico, colocando dos semillas por maceta, en condiciones controladas en invernáculos. Luego de la emergencia de las plantas, se realizó un raleo dejando sólo dos plantas por maceta. Se regó diariamente, manteniendo el suelo en un estado de capacidad de campo que equivale a un 60% de contenido de agua.

A los 50 días de la emergencia, las plantas se inocularon con el agente etiológico por el método del escarbadiante (Gasperi, 2000). Para obtener los escarbadiantes infectados, se esterilizaron segmentos de escarbadiantes de 15 mm a 120°C durante 20' que luego fueron colocados en posición vertical en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA), dejando la punta sobresaliendo del medio de cultivo. Una vez realizado esto, se colocó en cada caja de Petri, entre los escarbadiantes, un esclerocio de *S. sclerotiorum* (obtenido de la micoteca del LMFA), desinfectado superficialmente previamente con alcohol al 70% durante 1' y en hipoclorito de sodio durante 1', seguido de lavados con agua destilada.

Las cajas de Petri con escarbadiantes y esclerocios, fueron incubadas durante 5 días en cámara de ambiente controlado BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 21°C

en condiciones de oscuridad permanente, para promover la germinación miceliogénica de los esclerocios y la colonización de los escarbadietes por el micelio del hongo. Una vez que desarrolló el micelio se procedió a la inoculación de las ocho especies de *Crotalaria*, insertando un escarbadietes con micelio en el tallo de las plantas. En las plantas utilizadas como testigo solamente se insertó un escarbadietes desinfectado, sin micelio. Se realizó una cámara húmeda en las plantas inoculadas por un período de 12 h, rociando las plantas con agua, las que luego se cubrieron con una bolsa atada a la base de la maceta de manera de generar un ambiente saturado de humedad.

Medición del progreso de la enfermedad.

La medición de los síntomas y del progreso de la enfermedad de las plantas comenzó luego de retirar la cámara húmeda y se realizó a intervalos de dos días hasta que los síntomas inducidos por el patógeno provocaron el quebrado de los tallos y/o la muerte de las plantas. En cada planta de cada uno de los tratamientos se observó, la zona donde fue introducido el escarbadietes con micelio y se registró mediante la escala descrita por Venturoso (2012). Esta consiste en nota 0 = ausencia de síntomas, nota 1 = inicio de una lesión circular, nota 2 = lesión de hasta 1 cm, nota 3 = lesión de entre 1,1cm y 2,0cm; nota 4= lesión entre 2,1cm a 5,0cm, nota 5= lesión mayor que 5,0cm sin esclerocio, nota 6 = lesión mayor que 5,0cm con esclerocio, nota 7 = planta quebrada, nota 8 = planta muerta. Con estos datos se calculó el área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE) mediante la fórmula propuesta por Shanner & Finney (1977):

$$ADCPE = \sum = \frac{Nt_2 + Nt_1}{2} * (t_2 - t_1)$$

En la cual “t” representa el tiempo entre mediciones sucesivas y “Nt₁” la nota en el tiempo “t₁” y “Nt₂” la nota en el tiempo “t₂”.

Se calculó también una media ponderada de las notas (índice de enfermedad de Mckinney, 1923) mediante la fórmula:

$$IE = \frac{\sum(\text{nota de la escala} * \text{frecuencia}) * 100}{(n^\circ \text{ total de unidades} * \text{nota máxima de la escala})}$$

Peso de esclerocios, peso fresco y peso seco.

Pasados 30 días desde la inoculación, se procedió a cosechar las plantas. Se pesaron los esclerocios formados en cada planta, ya que representan una fuente de inóculo, y la materia fresca y seca de la parte aérea, para comparar los valores de biomasa con los testigos y entre los tratamientos. El peso fresco se determinó inmediatamente luego de la cosecha de las plantas. Este material luego fue colocado en estufa de secado a 60 °C hasta peso constante, determinándose así el peso seco. El peso de los esclerocios se determinó pesándolos en balanza analítica luego de cosecharlos manualmente.

Diseño y análisis estadístico.

Para la realización del ensayo se siguió un delineamiento experimental de bloques al azar con 8 tratamientos (las 8 especies de *Crotalaria*) y 7 repeticiones.

Los datos de ADCPD y de Índice de enfermedad de McKinney fueron analizados aplicando el test F, previamente transformados en $\sqrt{x + 1}$ con el objetivo de reducir los coeficientes de variación. Estos datos sumados y los de materia fresca y seca y peso de esclerocios fueron analizados aplicando el test de Tukey a 5% de probabilidad, para la comparación entre las medias mediante el programa SISVAR 5.1.

Evaluación de la metodología de inoculación de hojas cosechadas de *Crotalaria*.

Mediante esta metodología se evaluó la posibilidad de inocular solamente hojas cosechadas y no la planta entera, significando esto un ahorro de material, tiempo y espacio. La inoculación se realizó en hojas de *C. anagyroides*.

Material vegetal y tratamientos.

Para realizar la inoculación de las hojas se utilizaron (1) flores colonizadas por *S. sclerotiorum* y (2) discos de papa dextrosa agar (PDA) colonizados por *S. sclerotiorum*. El micelio de *S. sclerotiorum* para lograr las flores y los discos de PDA colonizados por *S. sclerotiorum* fue obtenido a partir de aislados de micelio de plantas infectadas y posterior cultivo del mismo en medio PDA.

Mediante esta metodología se simularía un ataque de la parte aérea mediante la germinación de ascosporas. Los tejidos de las flores actúan como fuente de energía para que el patógeno luego se desarrolle en tejido sano como son las hojas, ya que

ascosporas de *S. sclerotiorum* no infectan tejido sano sin nutrientes externos. En el campo las flores infestadas con ascosporas caen sobre la cara adaxial de las hojas y así ocurre la infección a través de esas flores (Abawi & Grogan, 1974).

Para lograr las flores colonizadas, durante 4 días consecutivos se colectaron flores de *C. anagyroides* y se fueron colocando en cajas de Petri con micelio de *S. sclerotiorum*. Con esta estrategia, se obtuvieron flores con diferentes grados de colonización por el patógeno ya que las flores colectadas cada día tuvieron un tiempo diferente de exposición al micelio de *S. sclerotiorum*; las flores de *C. anagyroides* colectadas el primer día quedaron expuestas al micelio durante 96 h, las colectadas el segundo día 72 h, las colectadas en el tercer día 48 h y las colectadas el último día 24 h. Para obtener los discos de PDA colonizados, se cultivó en cajas de Petri durante cuatro días micelio en PDA, y luego con un sacabocados se obtuvieron discos cilíndricos de PDA colonizados con micelio.

Al cuarto día se realizó la inoculación de las hojas. Para ello se colectaron las hojas de *C. anagyroides* y se inocularon con las flores con los distintos tiempos de exposición y con los discos de PDA colonizados por micelio del hongo. Las hojas testigo no se inocularon, sólo se les colocó un disco de PDA sin micelio.

La inoculación de las hojas colectadas se realizó en cámara de flujo laminar. Las flores colonizadas por el micelio del patógeno se colocaron en la cara abaxial de 4 hojas y en la cara adaxial de otras 4, cada una en una caja plástica de 11x11x3,5 cm. También se colocó en la cara abaxial de 4 hojas y en la cara adaxial de otras, un disco de 1cm de diámetro de PDA con micelio. Todas las hojas inoculadas más los testigos fueron incubadas en cámara tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand). Por lo tanto los 6 tratamientos correspondientes fueron: inoculación de hojas con flores con 96 h de exposición, inoculación con flores con 72 h de exposición, inoculación con flores con 48 h de exposición, inoculación con flores con 24 h de exposición, inoculación con discos de micelio y discos sin micelio (testigo).

Medición del progreso de la enfermedad.

Las mediciones del progreso de la enfermedad comenzaron 48 h después de la inoculación, durante 4 días, determinando el porcentaje de área necrosada por *S. sclerotiorum* entre 0% a 100%. Se pesaron y contaron los esclerocios formados en cada tratamiento.

Diseño y análisis estadístico.

El experimento fue realizado en el LMFA, siguiendo un delineamiento experimental de 6 tratamientos (exposición de flores a 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, disco de PDA y testigo) 2 metodologías (cara abaxial y adaxial de la hoja) y 4 repeticiones. Los datos de severidad (área necrosada), ADCPE y peso de esclerocios fueron transformados en $\sqrt{x+1}$ y sometidos a análisis de la varianza y las medias comparadas mediante el test de Tukey a 5% de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del comportamiento de *Crotalaria* spp. frente a *S. sclerotiorum*.

A las 24 h de realizar la inoculación de *S. sclerotiorum* mediante el método del escarbadientes de las diferentes especies de *Crotalaria*, se observaron lesiones circulares de color marrón alrededor del escarbadientes con que se inoculó la planta, síntomas que no se observaron en las plantas testigo.

En la tabla 1 se presentan los resultados del análisis de los datos de incidencia, ADCPE, índice de enfermedad, peso de esclerocios formados y porcentaje de plantas muertas.

El porcentaje de plantas enfermas (incidencia de la enfermedad) fue de casi 100% lo que demostró que la alta eficiencia del método de inoculación. Los coeficientes de variación de los parámetros evaluados fueron bajos, lo que sugiere que los resultados son confiables.

Tabla 1. Incidencia de plantas con lesión (%), índice de enfermedad de McKinney, área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE), peso de esclerocios (g) y plantas muertas (%) en especies de *Crotalaria* inoculadas con *S. sclerotiorum*. Dourados 2013.

| Tratamientos | Incidencia de plantas con lesión (%) | Índice de enfermedad de McKinney | ADCPE | Peso esclerocios (g) | Plantas muertas (%) |
|-----------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------|----------------------|---------------------|
| <i>C. anagyroides</i> | 100 a | 83,93 a | 2333,33ab | 0,13 bc | 78,65 abc |
| <i>C. breviflora</i> | 100 a | 87,5 a | 1932,14 bc | 0,07 cd | 28,57 cd |
| <i>C. grahamiana</i> | 100 a | 58,93 b | 1700 c | 0,03 d | 0,00 d |
| <i>C. juncea</i> | 100 a | 91,07 a | 2250,89 ab | 0,23 a | 53,57 bc |
| <i>C. ochroleuca</i> | 100 a | 100 a | 2702,68 a | 0,23 a | 100,00 a |
| <i>C. paulina</i> | 100 a | 91,96 a | 2658,93 a | 0,12 bc | 85,57 a |
| <i>C. sp.</i> | 100 a | 87,5 a | 2351,79 ab | 0,16 bc | 70,14 bc |
| <i>C. spectabilis</i> | 92,86 a | 84,82 a | 2321,43 ab | 0,09 cd | 64,28 bc |
| CV (%) | 5 | 11,09 | 13,13 | 1,98 | 38,24 |

Medias seguidas por la misma letra en la columna no difieren significativamente entre sí por el test de Tukey al 5% de probabilidad.

C. grahamiana presentó el menor valor de índice de enfermedad, de ADCPE, de peso de esclerocios y además no presentó plantas muertas. Muchas de las plantas de esta especie se quebraron en el punto de inserción del escarbadientes, sin embargo la enfermedad no continuó extendiéndose por debajo de este punto y las plantas brotaron y sobrevivieron. Dentro de los demás tratamientos no hubo diferencias significativas en el índice de enfermedad.

C. breviflora presentó el segundo menor valor de ADCPE probablemente porque la mayoría de las plantas que se quebraron en el punto de inserción del escarbadientes también brotaron y no murieron. Sin embargo, en la Tabla 1 se puede ver que las diferencias entre el índice de enfermedad *C. grahamiana* y *C. breviflora* fueron significativamente menores debido a la diferencia en el porcentaje de plantas muertas. Las plantas de la especie *C. ochroleuca* y *C. paulina* fueron las que presentaron los valores más altos de ADCPE lo que refleja un alto porcentaje de plantas muertas. *C. anagyroides*, *C. juncea*, *C. sp* y *C. spectabilis* no poseen diferencias significativas en el ADCPE y en el porcentaje de plantas muertas.

Kolkman y Kelly (2002) demostraron que el contenido de lignina es una característica del tallo que influye en el desarrollo de la enfermedad. *C. paulina* posee tallos huecos tiernos y poco lignificados, mientras que *C. grahamiana* y *C. breviflora* poseen tallos más densos y lignificados. La respuesta a esta enfermedad de estas dos últimas especies podría estar relacionada con el contenido de lignina en sus tallos. Adicionalmente, si se observan los datos del peso de los esclerocios, si bien no se observaron diferencias significativas los menores valores correspondieron a *C. grahamiana*, *C. breviflora* y *C. spectabilis* y los mayores valores a *C. ochroleuca* y *C. juncea*. Estos resultados sugieren que estas últimas dos especies podrían causar un aumento de inóculo en el área en la cual fueron utilizadas.

Considerando el peso de tallos y de hojas (Tabla 2 y 3), *C. ochroleuca* no presentó resultados debido a que la totalidad de las plantas murieron. El análisis estadístico del resto de los tratamientos mostró que *C. anagyroides* y *C. paulina* fueron los cultivares más afectados debido a la muerte de una mayor número de plantas. El resto de los resultados de alguna manera reflejó los valores de severidad encontrados; esto es, *C. juncea*, y *C. spectabilis* presentaron valores medios de peso de hojas debido a que la mayoría de las plantas se quebraron y murieron, mientras que *C. grahamiana* y *C. breviflora* presentaron los valores más altos de peso de hojas, ya que después de quebrarse las plantas brotaron y se ramificaron y produciendo nuevas hojas.

Los altos valores de peso del tallo observados en *C. juncea* se debe a que estas plantas son altas y sus tallos crecen rápidamente. Por otro lado los valores más bajos de peso seco de tallos corresponden a las especies de *C. ochroleuca*, *C. paulina* y *C. anagyroides*. No se observaron diferencias significativas entre *C. grahamiana* inoculada y no inoculada y entre *C. breviflora* inoculada y no inoculada.

Tabla 2. Peso seco (PS) de hojas (g) de *Crotalaria* inoculadas (INOC) con *S. sclerotiorum* y no inoculadas (NI). Dourados 2013.

| Especies | PS de hojas (g) | |
|-----------------------|-----------------|----------|
| | INOC | NI |
| <i>C. anagyroides</i> | 2,43 cdA | 25,29 aB |
| <i>C. breviflora</i> | 18,58 aA | 18,60 aA |
| <i>C. grahamiana</i> | 18,72 aA | 20,67 aA |
| <i>C. juncea</i> | 14,79 abA | 27,46 aB |
| <i>C. ochroleuca</i> | 0,00 dA | 18,48 aB |
| <i>C. paulina</i> | 4,97 bcdA | 11,81 aB |
| <i>C. sp.</i> | 15,27 aA | 19,53 aA |
| <i>C. spectabilis</i> | 10,32 abcA | 17,96 aB |
| CV (%) | 27,42 | |

Medias seguidas por letras iguales minúsculas en la columna y de mayúscula en la fila, no difieren significativamente entre sí por el test de Tukey al 5% de probabilidad.

Tabla 3. Peso seco (PS) de tallos (g) de *Crotalaria* inoculadas (INOC) con *S. sclerotiorum* y no inoculadas (NI). Dourados 2013.

| Especies | PS de tallos (g) | |
|-----------------------|------------------|----------|
| | INOC | NI |
| <i>C. anagyroides</i> | 2,28 cA | 30,99 aB |
| <i>C. breviflora</i> | 18,17 abA | 18,46 aA |
| <i>C. grahamiana</i> | 20,99 abA | 28,09 aA |
| <i>C. juncea</i> | 27,01 aA | 31,66 aA |
| <i>C. ochroleuca</i> | 0,00dA | 24,09 aB |
| <i>C. paulina</i> | 5,89 cA | 15,13 aB |
| <i>C. sp.</i> | 21,63 abA | 25,48 aA |
| <i>C. spectabilis</i> | 9,34 bcA | 20,00 aB |
| CV (%) | 26,82 | |

Medias seguidas por letras iguales minúsculas en la columna y de mayúscula en la fila, no difieren significativamente por el test de Tukey al 5% de probabilidad.

Evaluación de la metodología de inoculación de hojas cosechadas de *Crotalaria*.

En las tablas 4 y 5 se presentan los resultados del ensayo de inoculación de las hojas de *C. anagyroides*. No se observaron diferencias significativas entre la inoculación en la cara adaxial y en la cara abaxial de las hojas. Al cuarto día, final del periodo de evaluación, se observó que la inoculación con disco de PDA con micelio presentó los valores más altos siendo el método de infección más eficiente, a continuación se ubicaron las flores con 48 h de incubación con micelio. Los valores más bajos correspondieron a las hojas inoculadas con flores incubadas durante 24 h y 96 h. En el tratamiento de 24 h la flor no ha sido colonizada totalmente y en el tratamiento de 96 h se inició el proceso de formación de esclerocios.

Los tratamientos de 24h y 96h presentaron los menores valores de ADCPE, y los mayores correspondieron a los tratamientos con disco de PDA, de 48h y de 72h.

García y Juliatti (2012) evaluando resistencia de diferentes variedades de soja, utilizando la técnica de la inoculación de hojas aisladas y de la planta entera, encontraron una correlación significativa entre ambas metodologías. Los autores

destacaron que con este método, utilizando hojas colectadas, se puede estudiar la respuesta de diferentes genotipos, con economía de tiempo, de espacio y de material comparado con el método de inoculación de la planta entera.

Tabla 4. Severidad en hojas cosechadas, inoculadas con flores, en función del tiempo de exposición de las flores a *S. sclerotiorum* y con disco de PDA con micelio, en las caras adaxial y abaxial de hojas de *C. anagyroides*, en el día 1 y 2 de evaluación. Dourados, Brasil 2013.

| Tratamiento | DIA 1 | | DIA 2 | |
|-------------|-----------|-----------|----------|----------|
| | Adaxial | Abaxial | Adaxial | Abaxial |
| 24 h | 22,50 abA | 22,50 abA | 22,50 bc | 35,75 b |
| 48 h | 36,25 aA | 53,75 aA | 61,25 a | 81,25 a |
| 72 h | 45,00 aA | 41,25 aA | 56,25 ab | 56,25 ab |
| 96 h | 13,75 abA | 51,25 aB | 37,50 ab | 58,75 ab |
| Disco PDA | 32,50 abA | 55,00 aA | 47,50 ab | 60,25 ab |
| Testigo | 0,00 c | 0,00 c | 0,00 c | 0,00 c |
| CV (%) | 41,95 | | 30,34 | |

Medias seguidas por letras iguales minúsculas en la columna y de mayúscula en la fila, no difieren significativamente por el test de Tukey al 5% de probabilidad.

Tabla 5. Severidad en hojas cosechadas e inoculadas con flores, en función del tiempo de exposición de las flores a *S. sclerotiorum* y con disco de PDA con micelio, en las caras adaxial y abaxial de hojas de *C. anagyroides*, en el día 3 y 4 de evaluación. Dourados 2013.

| Tratamiento | DIA 3 | | DIA 4 | |
|-------------|----------|----------|-----------|-----------|
| | Adaxial | Abaxial | Adaxial | Abaxial |
| 24 h | 25,00 bc | 38,75 b | 38,75 bA | 70,75 bB |
| 48 h | 65,00 a | 91,25 a | 78,75 aA | 96,25 aA |
| 72 h | 60,75 a | 57,00 ab | 89,50 aA | 72,50 abA |
| 96 h | 47,50 ab | 67,00 ab | 53,75 abA | 81,25 abA |
| Disco PDA | 85,75 a | 83,75 a | 100,0 aA | 99,00 aA |
| Testigo | 0,00 c | 0,00 c | 0,00 cA | 0,00 cA |
| CV (%) | 26,48 | | 23,79 | |

Medias seguidas por letras iguales minúsculas en la columna y de mayúscula en la fila para cada día de evaluación, no difieren significativamente por el test de Tukey al 5% de probabilidad.

Tabla 6. Área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE) y peso de esclerocios (g) en hojas cosechadas de *C. anagyroides* inoculadas con flores con diferentes tiempos de exposición a *S. sclerotiorum* y con discos de PDA con micelio, en las caras adaxial y abaxial de las hojas. Dourados 2013.

| Tratamiento | ADCPE | | Peso esclerocios (g) | |
|-------------|------------|-----------|----------------------|---------|
| | Adaxial | Abaxial | Adaxial | Abaxial |
| 24 h | 78,125 bA | 121,12 bA | 4,25 aA | 2,5 aB |
| 48h | 183,75 aA | 247,5 aA | 1,75 bcA | 2,25 aA |
| 72 h | 184,25 aA | 170,0 abA | 2,5 abA | 2,5 aA |
| 96 h | 118,75 abA | 192,0 abA | 2,5 abA | 2,0 aA |
| Disco PDA | 199,5 aA | 221,0 aA | 0,00 cA | 0,00 cA |
| Testigo | 0,00 cA | 0,00cA | 0,00 cA | 0,00 cA |
| CV (%) | 25,51 | | 14,94 | |

Medias seguidas por letras iguales minúsculas en la columna y de mayúscula en la fila, no difieren significativamente por el test de Tukey al 5% de probabilidad.

CONCLUSIONES

Con una incidencia del 100% todas las especies de *Crotalaria* pueden ser consideradas como susceptibles a *S. sclerotiorum*, sin embargo los resultados indican que *C. grahaminiana* es la especie de *Crotalaria* con mayor potencial para utilizar en la rotación para controlar nematodos en áreas con historia de ocurrencia de *S. sclerotiorum*, ya que esta especie fue la que presentó el mejor comportamiento frente al patógeno, mientras que *C. ochroleuca* es la especie con menor potencial para utilizar en áreas con historia de ocurrencia de *S. sclerotiorum* y fue la especie más peligrosa considerando que produjo más esclerocios.

Es posible evaluar la respuesta a *Sclerotinia sclerotiorum* a través de la inoculación de hojas de *Crotalaria* cosechadas con discos de PDA con micelio y flores con un periodo de incubación de 48 h a 72 h, ya que esos tratamientos aumentaron la eficiencia de la inoculación, siendo además necesarios 4 días de incubación de las hojas inoculadas.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. N. 2005. Plant pathology. 5 Ed. New York: Academic Press, 922p.
- Awabi, G. S. & Grogan R. G. 1974. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. Phytopathology .Saint Paul, v.65, n. 6, p. 673-678, 1974.
- Baigorri, H., Salines, L. A., Fuentes, F., Serrano, R. & Masiero, B. 1998. Evaluación de la respuesta de cultivares de soja de grupos de madurez II al IX al Nematodo de la Agalla (*Meloidogyne javanica*). Actas: III Reunión Nacional de Oleaginosos, Bahía Blanca. pp.: 69-70.
- Boland, G. J. & Hall, R.1994. Index of plant hosts for *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology, Ottawa, v.16, n.2, pp.:93-108.
- Bolton, M. D.; Thomma, B. P. & Nelson, B. D. 2006. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology, London, V. 7, pp.: 1-16.
- CONAB. Companhia nacional de abastecimento. 2015. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v. 1 - Safra 2014/15, n. 5 - Quinto Levantamento, Brasília, pp.: 1-69.
- Distefano, S. G. Informe sanitario de la campaña de soja 2012/2013. INTA. Instituto nacional de tecnología agropecuaria. Disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/informe-sanitario-de-la-campana-de-soja-2012-13>. Ultimo acceso marzo 2015.
- Doucet, M. 1997. El Cultivo de la soja en Argentina Capítulo 13. INTA. pp.: 291-308.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2010. Nematoides em Soja: Identificação e Controle. Londrina, PR Abril, p. 8.

EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2011. Manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* para a sustentabilidade da produção. Santo Antônio de Goiás. V. 21, n. 3, p.15.

EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2013. Sistemas de produção. Tecnologias de produção de soja- região central do Brasil 2012-2013. Londrina, p. 261.

García, R. A & Juliatti, F. C. 2012. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inoculo. Tropical Plant Pathology. v. 37, p. 196-203.

Gasperi, A. C. 2000. Variabilidade de isolados, reação de cultivares e danos causados por *Fusarium solani* f. sp. *Glycines*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 91p.

Gómez-Sosa E. 2000. Species of crotalaria (leguminosae-crotalarieae) from Argentina: new reports, descriptions and key. *Instituto de Botánica Darwinion, Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CC 22, 1642 San Isidro, Buenos Aires, Argentina. Gayana Bot. v.57 n.1.*

Inomoto, M. M.; Antedomênico, S. R.; Santos, V. P; Rosangela, A. S. & Almeida G. C. 2008. Avaliação em casa de vegetação do uso de sorgo, milho e crotalaria no manejo de *Meloidogyne javanica*. Trop. plant pathol. vol.33 no.2 Brasília.

Jones J., Gheysen, G. & Fenoll, C. 2011. Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer Science. 557p, 21-43.

Kolkman J. M. & Kelly J. D. 2002. Agronomic traits affecting resistance to white mold in common bean. Crop Science, Madison, v. 42, n. 3.

Le Tourneau, D. 1979. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. Phytopathology. 69:887-890.

Lewis, G.P., Schrire, B., Machinder, B. & Lock, M. 1987. Legumes of the world. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 577.

Lordello, L. G. E. 1982. Nematoides das plantas cultivadas. 7. Ed. São Paulo: Nobel, 146-147 p.

McKinney, H.H. 1923. Influence of soil, temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. Journal of Agricultural Research, Washington, V. 26, p.195-217.

Miyasaka, S.; Freire, E. S.; Mascarenhas, H. A. A.; Nery, C.; Campana, M. & De Sordi, G. 1966. Efeito da adubação verde com uma gramínea e quatro leguminosas sobre a produção do “feijoeiro da seca” em terra roxa misturada. Boletim científico do Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo. Campinas, v. 25.

Navas G. E. & Bernal J. H. 1999. Caracterización de leguminosas como abono verde para los sistemas de producción del Piedemonte llanero y Altillanura plana colombiana. Corporación colombiana de investigación agropecuaria regional. Boletín técnico no 16, Villavicencio, Meta.

Oliveira, R. R.; Braz, G. B. P.; Oliveira, Jr R. S.; Hentges, M.; Takano, H. K. & Vida J. B. 2013. First report of Sclerotinia blight caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on *Crotalaria spectabilis* in Brazil. Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brazil. Plant Disease. v. 7, no 99.

Purdy, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. Phytopatology, Saint Paul, v. 69, p. 875-880.

Ploper, L. D. 2004. Economic importance of and control strategies for the major soybean disease in Argentina. VII World soybean research conference, IV Inter. Soybean

Ratnadass A, Fernandes P, Avelino J, Habib R. 2012. Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. *Agronomy for sustainable development*. *Agron. Sustain. Dev.* 32:273–303.

Reis, E. M.; Casa, R. T. & Bianchin, V. 2011. Controle de doenças de plantas pela rotação de culturas. *Summa phytopathol.* V.37, n.3, pp. 85-91.

Shanner, E. & Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of the show mildewing resistance in Know wheat. *Phytopathology*. V. 67, pp. 1051-1058.

SIIA (Sistema integrado de información agropecuaria). Ministerio de agricultura, ganadería y pesca de la Nación. 2014/2015. Disponible en <http://www.siia.gob.ar/informes>. Último acceso: septiembre 2015.

Silva J.F.V. 1998. Problemas fitossanitários da soja no Brasil com ênfase em fitonematóides. Anais, XXI Congresso Brasileiro de Nematologia, Maringá PR. pp. 16-20.

Tu, J. C. 1997. An integrated control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans, with emphasis on recent advances in biological control.. *Bot. Bull. Acad. Sin.* v. 38, p. 73-76.

USDA (United States Department of Agriculture). Crop Production 2014/2015 Summary. Disponible en <http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/CropProdSu/CropProdSu-01-12-2015.pdf>. Último acceso septiembre 2015.

Venturoso, L. Dos R. 2012. Implicações da inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em culturas bioenergéticas. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 58p.

Wang K.H.; Sipes B. S. & Schmitt D. P. 2002. Crotalaria as a cover crop for nematode management: a review. *Nematropica* 32:35-57.

Wang K.H.; McSorley R.; Marshall A.J., Gallaher R.N. 2006. Influence of organic Crotalaria juncea hay and ammonium nitrate fertilizers on soil nematode communities. Appl Soil Ecol 31:186–198.

Wong J. A. L. & Willets H. J. 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum*, and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. The Botanical Review. v. 46.