



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Estudio taxonómico, molecular y fitopatológico del complejo *Diaporthe-Phomopsis* que afecta el cultivo de girasol en la región semiárida”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Ciencias Biológicas

Ing. Agr. Denis Nahuel Colombo

Director de Tesis: Dra. Norma Beatriz Paniego

Director Adjunto: Dr. Ricardo Mario Comerio

Consejero de Estudios: Dr. Esteban Hopp

Lugar de trabajo: Estación Experimental Agropecuaria INTA Anguil “Guillermo Covas”

Fecha de defensa: 10 de junio de 2024

A mi familia y a mis queridos abuelos, cuyo amor y sabiduría han sido mi inspiración constante. Su legado vive en cada página de esta Tesis Doctoral. Con gratitud infinita, celebro este logro juntos.

"A journey is a person in itself; no two are alike."

John Steinbeck

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	6
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	9
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN GENERAL	16
Historia del girasol.....	16
Producción mundial y local de girasol.....	17
Tipos de girasol y sus usos	19
El cultivo de girasol: requerimientos y labores culturales.....	19
Fechas de siembra en la región Sur, densidad de siembra, espaciamiento entre hileras (surcos) y profundidad de siembra.....	22
Manejo de malezas, insectos y enfermedades	23
Cosecha	24
Enfermedades fúngicas como un factor limitante en la producción de girasol	25
Cancro del tallo de girasol y podredumbre seca del capítulo.....	27
Descripción y taxonomía de Diaporthe.....	30
El complejo de especies del género Diaporthe que afecta girasol	31
Ciclo de ambas enfermedades	32
Síntomas y daños	35
Manejo de las enfermedades.....	37
HIPÓTESIS	42
OBJETIVO GENERAL	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
CAPÍTULO I.....	45
Introducción	45
Materiales y Métodos	48
Relevamiento de cancro del tallo y podredumbre seca del capítulo	48
Recolección de material sintomático y aislamiento de Diaporthe spp.	49
Conservación de aislamientos.....	50
Estudio morfológico.....	52
Caracterización molecular	53
Mating type	57
Resultados	59
Relevamiento de cancro del tallo y podredumbre seca del capítulo	59
Recolección de material sintomático y aislamiento de Diaporthe spp.	62

Conservación de aislamientos	62
Estudio morfológico	63
Caracterización molecular	68
Mating type	78
Discusión	84
Relevamiento de cancro del tallo y podredumbre seca del capítulo	84
Conservación de aislamientos	85
Estudio morfológico	86
Caracterización molecular	90
Mating type	92
Conclusiones	94
CAPÍTULO II	96
Introducción	96
Materiales y Métodos	99
Extracción de ADN	101
Análisis filogenético y estructura poblacional	104
Resultados	105
Extracción de ADN	105
Análisis filogenético y estructura poblacional	112
Discusión	117
Conclusiones	123
CAPÍTULO III	124
Introducción	124
Materiales y Métodos	128
Estudio de la patogenicidad de aislamientos de Diaporthe	128
Inoculación y Evaluación	129
Postulados de Koch	132
Resultados	133
Estudio de la patogenicidad de aislamientos de Diaporthe	133
Inoculación y Evaluación	134
Postulados de Koch	138
Discusión	139
Conclusiones	142
CONCLUSIÓN GENERAL	143
BIBLIOGRAFÍA	146
APÉNDICE	167

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Universidad de Buenos Aires y, en particular, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por brindarme la invaluable oportunidad de iniciar mi camino en la investigación científica a través de esta Tesis Doctoral.

Expreso mi sincero agradecimiento al CONICET y al INTA por la beca doctoral que me fue otorgada para la realización de este proyecto. Además, extendiendo mi gratitud a la Estación Experimental Agropecuaria Anguil y al Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, así como a sus directivos, por permitir y respaldar el desarrollo de esta investigación.

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Norma Paniego. Gracias, Norma, por tu continua presencia, tus ideas inspiradoras y por abrirme las puertas al fascinante mundo de la biotecnología. Aprecio enormemente tu visión federal y de excelencia en la ciencia, así como tu paciencia y energía para enfrentar nuevos proyectos y desafíos. Gracias por fomentar la idea de abrazar siempre nuevos retos y por la confianza y apoyo inquebrantables.

Mi reconocimiento al Dr. Ricardo Comerio por su predisposición desde el primer día que llegué a la EEA Anguil en 2019. Agradezco su guía y acompañamiento en el apasionante campo de la fitopatología clásica, así como su atención a cada detalle y su estímulo constante para superarme. Más allá de las habilidades profesionales adquiridas,

destaco y agradezco su calidad humana y las lecciones valiosas que he recibido a nivel personal durante estos años compartidos. Gracias por respaldar y respaldarme en cada una de mis decisiones.

Agradezco al Ing. Agr. (Mg) Andrés Corró Molas por confiar en mí y abrirme las puertas del INTA. Su incentivo constante a la curiosidad y la investigación, así como la enseñanza detallada de la fitopatología, han sido fundamentales para el desarrollo de esta Tesis. También agradezco la ayuda en los viajes de recolección de material sintomático de girasol que han sido cruciales para el avance de mi trabajo y sin su apoyo no hubieran sido posibles.

Expreso mi gratitud al grupo de Protección y Tecnología de Cultivos de la EEA Anguil por su colaboración, ayuda en los trabajos de campo y laboratorio, y el apoyo diario que he recibido.

A Dra. Lumila Fuchs, Lic. Valeria Baldone y Dra. Maria Rojas les agradezco su incansable ayuda durante las etapas iniciales de extracciones de ADN y las PCR. Su orientación y sugerencias han sido fundamentales para llevar a cabo este trabajo.

Reconozco y agradezco a todos los integrantes del grupo de mejoramiento de girasol de INTA, especialmente a Dr. Matias Dominguez por su apoyo ininterrumpido, a Caro Troglia y Sofia Deperi por su dedicación en los ensayos en Miramar, a Daniel Álvarez y el equipo de Manfredi por su excelente predisposición, a la Dra. Monica Fass y al Dr.

Emiliano Ben Guerrero por su ayuda y paciencia en el Laboratorio de Castelar, y a la Dra. Carla Filippi, la Dra. Natalia Aguirre y especialmente al Lic. Pablo Aguilera por su colaboración en los análisis de datos. A la Dra. Veronica Lia y Dra. Carolina Martinez, agradezco su disposición constante para resolver dudas y brindar consejos que han enriquecido este trabajo.

Mi agradecimiento se extiende a la Unidad de Genómica de INTA Castelar, en especial a Andrea Puebla, Pablo Vera, Veronica Nishinakamasu y Marianne Muñoz, por su enseñanza y apoyo inestimable en todas las secuenciaciones de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Febina Mathew y a todo su equipo de trabajo por abrirme las puertas de la NDSU, brindarme capacitación y colaborar en la clarificación de métodos aplicados en esta Tesis.

Finalmente, dedico un profundo agradecimiento a mis padres y mi hermano por su apoyo incondicional y constante presencia. Sin ustedes, este trabajo no hubiera sido posible.

Y a todas esas personas que durante este tiempo colaboraron en esta Tesis y han sido fundamentales para el éxito de este gratificante proyecto. ¡¡¡Mi más sincero agradecimiento!!!

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C. Grados Celsius

%. Porcentaje

AA. Agar agua

AAPRESID. Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ADNc. ADN complementario

AFLP. Amplified fragment length polymorphism

AIC. Criterio de Akaike

APG. Agar Papa Glucosado

ASAGIR. Asociación Argentina de Girasol

BIC. Criterio de información bayesiana

BLAST. Basic Local Alignment Search Tool

CHAS. Contenido de humedad de almacenamiento seguro

CICVyA. Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agropecuarias de INTA

CREA. Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola

CT. Cancro del Tallo

d. Días

d.C. Después de Cristo

ddRADSeq. Genotipado por secuenciación con doble digestión con enzimas de restricción

Dpi. Días post inoculación

EEA. Estación Experimental Agropecuaria

EE. UU. United States of America

EF1 - α . Elongation factor 1-alpha

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee

Gb. Gigabases

GBS. Genotyping by sequencing

GGB-IABiMo. Grupo de Genómica y Bioinformática del Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular INTA-CONICET Hurlingham

GWAS. Genome Wide Association Studies

Has. Hectáreas

Hd. Diversidad haplotípica

IAF. Índice de área foliar

INC. Incidencia

INRA. Institut National de la Recherche Agronomique

INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

ITS. Internal Transcribed Spacer

k. Número de poblaciones ancestrales

kh. Número de diferencias entre pares de haplotipos

m². Metro cuadrado

MAT. Mating type

Mb. Megabyte

MEA. Agar Extracto de Malta

MIP. Manejo Integrado de Plagas

mM. Milimolar

MnT. Millones de Toneladas

Mpb. Mega par de bases

NCBI. National Center for Biotechnology Information

NGS. Next Generation Sequencing

OA. Agar avena.

pb. Par de bases

PCR. Polymerase Chain Reaction

Pi. Diversidad nucleotídica

PMA. Población de mapeo por asociación de girasol de INTA

PSC. Podredumbre Seca del Capítulo

QTL. Quantitative Trait Loci

RAPD. Random Amplification of Polymorphic DNA

RFLP. Restriction Fragment Length Polymorphism

Rpm. Revoluciones por minuto

Sem. Semillas

SEV. Severidad

sNMF. Factorización de Matrices No negativas dispersas

SNP. Single Nucleotide Polymorphisms

TUB. β - Tubulina

UV. Ultravioleta

USDA. United States Department of Agriculture

V. Voltios

VCF. Variant Calling Format

RESUMEN

Las enfermedades causadas por el complejo *Diaporthe-Phomopsis* están ampliamente difundidas en las principales regiones girasoleras de Argentina ocasionando importantes pérdidas económicas. El objetivo de esta Tesis consistió en el estudio taxonómico, molecular y fitopatológico del complejo *Diaporthe/Phomopsis* en la región semiárida pampeana. Se confirmó que *D. helianthi* es el agente causal predominante del cancro del tallo y la podredumbre seca del capítulo de girasol en la región de estudio. Eventualmente, con muy baja frecuencia se detectó a *D. ambigua* en material sintomático de tallo. La prevalencia de CT y PSC aumentó con el transcurso de las campañas analizadas y se observaron variaciones interanuales en la incidencia de ambas enfermedades. Como resultado del relevamiento realizado se construyó un cepario de 393 aislamientos. Las características morfológicas de ambos taxones específicos encontrados se enmarcaron en los respectivos protólogos de cada especie. El análisis filogenético con distintos marcadores (ITS, EF1- α y TUB) confirmó ambas especies y evidenció diferencias entre los aislamientos de *D. helianthi* de la región semiárida y aislamientos reportados en otras regiones productoras de girasol. El estudio de la diversidad genética interespecífica de *Diaporthe* spp. reafirmó los resultados filogenéticos y reveló la eficacia informativa de cada marcador utilizado, sustentando su uso en el diagnóstico molecular. La exploración de los loci *mating type* en 139 aislamientos permitió describir por primera vez el locus MAT 1-2-1 para *D. helianthi*. Se observó de forma inédita que el 55 % de éstos amplificó los genes MAT1-1-1 y MAT1-2-1. Para estudiar la diversidad intraespecífica se seleccionaron 49 aislamientos según tejido de origen y localización geográfica. Se identificaron polimorfismos de nucleótido simple (SNP) utilizando la estrategia de genotipificación por secuenciación con doble digestión con enzimas de restricción (ddRADseq) teniendo como referencia la cepa pública 7/96 (GCA_001702395.2). El estudio de la filogenia a partir de una matriz de 1066 SNPs permitió observar dos grupos filogenéticos que se diferenciaron a su vez de

la cepa de referencia. Las inferencias de ancestría sugirieron al menos dos orígenes diferentes de la población local estudiada. La diversidad intraespecífica de los aislamientos observada en los análisis previos no se correlacionó con el tejido sintomático de origen, su ubicación geográfica, los *mating type* que portan y diferentes niveles de patogenicidad. Para estudiar la agresividad, inicialmente se realizaron ensayos *in vitro* diseñados a partir del conocimiento de los loci *mating type* a fin de obtener ascosporas de *D. helianthi*. Si bien se alcanzaron resultados positivos estos no pudieron reproducirse, razón por la cual se utilizó micelio como inóculo en las pruebas de patogenicidad. Se observaron diferencias significativas en la agresividad entre diez aislamientos de *D. helianthi* frente a híbridos de girasol. Se identificaron aquellos aislamientos que permitieron determinar comportamientos diferentes de dos híbridos de girasol frente a cancro del tallo, resultados que fueron consistentes con el comportamiento de estos materiales a campo. Los avances generados en esta Tesis contribuyeron al entendimiento del patosistema, la actualización de los protocolos de diagnóstico, así como al progreso de los programas de mejoramiento en el estudio de fuentes de resistencia.

Palabras clave (5): *Diaporthe*, cancro del tallo, podredumbre seca del capítulo, patogenicidad, girasol.

“Taxonomic, molecular, and phytopathological study of the *Diaporthe-Phomopsis* complex affecting sunflower crops in the semiarid region”

ABSTRACT

Diseases caused by the *Diaporthe-Phomopsis* complex are widespread in the main sunflower growing areas in Argentina, causing significant economic losses. The aim of this doctoral thesis was to conduct a taxonomic, molecular, and phytopathological study of the *Diaporthe/Phomopsis* complex in the semi-arid Pampas region. It was confirmed that *D. helianthi* is the predominant causal agent of sunflower Phomopsis stem canker and Phomopsis head rot in the study region. *D. ambigua* was occasionally detected in symptomatic stem material, although at very low frequency. The prevalence of Phomopsis stem canker and Phomopsis head rot increased during the campaigns analyzed, with interannual variations observed in the incidence of both diseases. The survey conducted resulted in a collection of 393 isolates. The morphological characteristics of the two specific taxa found agreed with the respective protologues of each species. Phylogenetic analysis using the different markers (ITS, EF1- α , and TUB) confirmed both species and revealed differences between *D. helianthi* isolates from the semi-arid region and isolates reported from other sunflower growing regions. The study of interspecific diversity of *Diaporthe* spp. consolidated the phylogenetic analysis and revealed the informative value of the individual markers used, validating their use in molecular diagnosis. The study of *mating type* loci in 139 isolates allowed the first description of the MAT 1-2-1 gene for *D. helianthi*. It was observed, unprecedentedly, that 55% of the isolates amplified both the MAT1-1-1 and the MAT1-2-1 genes. To study intraspecific diversity, 49 isolates were selected based on tissue of origin and geographic location. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified using double digest restriction-site associated DNA sequencing (ddRADseq) methodology, taking the public strain 7/96 (GCA_001702395.2) as a reference. A phylogenetic study using a matrix of

1066 SNPs revealed two phylogenetic groups that differed from the reference strain. The ancestry inferences suggested at least two different origins of the local population studied. The intraspecific diversity of isolates observed in previous analyses showed no correlation with factors such as symptomatic tissue of origin, geographical location, carried *mating types*, or different levels of pathogenicity. To investigate aggressiveness, *in vitro* tests based on knowledge of *mating type* loci were first performed to obtain ascospores of *D. helianthi*. Although positive results were obtained, they could not be reproduced, leading to the use of mycelium as inoculum in pathogenicity tests. Significant differences were found in the aggressiveness of 10 *D. helianthi* isolates against sunflower hybrids. Isolates that allowed to determine the different behavior of two sunflower hybrids against Phomopsis stem canker were identified, which is consistent with the behavior of these materials in the field. The progress made in this Thesis contributed to the understanding of the pathosystem, the updating of the diagnostic protocols, as well as to the progress of breeding programs in the investigation of sources of resistance.

Keywords (5): *Diaporthe*, Phomopsis stem canker, Phomopsis head rot, pathogenicity, sunflower.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Historia del girasol

El girasol (*Helianthus annuus* L.) se originó en América del Norte y pertenece a la familia Compuestas (Asteraceae). Algunos autores sugieren que el girasol se domesticó antes que el maíz (*Zea mays* L.) por los nativos norteamericanos hace entre 4500 y 3000 años (Diamond, 1999). Después de su domesticación, se utilizó como una fuente importante de semillas comestibles, así como elemento ornamental y ceremonial (Heiser et al., 1969, Seiler y Rieseberg, 1997).

Los sitios arqueológicos precolombinos en México sugieren la posibilidad de un segundo centro de domesticación independiente (Heiser, 1998). No obstante, Blackman et al. (2011) llevaron a cabo un estudio que abarcó 60 poblaciones de girasoles en Estados Unidos, México y Canadá, donde analizaron la diversidad de secuencias de tres genes candidatos de domesticación (c4973, HaFT1 y HaGA2ox), así como marcadores neutrales adicionales. Este estudio indicó que los girasoles domesticados que se cultivan hoy en México descienden del mismo linaje genético que el girasol domesticado en el noreste de Estados Unidos.

Alrededor del año 1500 d.C., exploradores españoles llevaron el girasol a Europa, donde este se convirtió en una planta ornamental (Putt, 1997). Desde España, el girasol se extendió rápidamente a través de Francia e Italia inicialmente, y continuó hacia el norte y el este de Europa. Antes de 1800 d.C., el girasol llegó a Rusia y se lo reconoció como fuente de aceite vegetal.

Las primeras referencias sobre girasol en la República Argentina se remontan al siglo XIX (Ingaramo et al., 2008), cuando los colonos realizan las primeras introducciones de semilla para su propio consumo. Su difusión como cultivo comienza a partir de 1900 por agricultores inmigrantes. La primera información estadística oficial del área sembrada

data de la campaña 1928/1929 con 400 hectáreas (has). En la campaña 48/49, la superficie sembrada fue de 1,8 millones de has. Esta superficie se superó recién en la campaña 77/78 con 2,2 millones de has. El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) obtuvo su primera variedad en 1960. En 1982 se creó la Asociación Argentina de Girasol, ASAGIR.

Producción mundial y local de girasol

La expansión geográfica de la producción de girasol a nivel internacional se ha producido a partir de variedades e híbridos de alto contenido en aceite. El aceite de girasol es altamente valorado por el mercado mundial, en particular el europeo y presenta una creciente demanda en el asiático, debido a su alto contenido de ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico y linolénico) y bajo contenido de ácidos saturados (esteárico y palmítico). La evolución del cultivo a escala mundial ha pasado de 10 millones de toneladas (MnT) para 9,6 millones de has en 1975 a 52 MnT para 27 millones de has en 2018 lo que refleja tanto un mercado dinámico, como un progreso técnico sostenido (Pilorgé, 2020). A nivel mundial la producción del girasol está concentrada en Ucrania, Rusia y la Unión Europea que en conjunto acumulan tres cuartos de la producción mundial total. Los demás países productores de importancia son Argentina, Estados Unidos y el sudeste de África. Argentina es el tercer productor de girasol a nivel mundial, y contribuye aproximadamente con el 8 % de la producción global de esta oleaginosa (USDA-NASS 2023). Respecto de la campaña 2019/2020, el 5 % de la producción se destinó a exportación, otro 5 % a producción de semilla y balanceados, en tanto que el 90 % se industrializó para producir aceite y harina (Di Yenno y Sigaudó, 2020). Según ASAGIR, para el ciclo 2022/23 se proyectó una producción global de girasol de 50,8 millones de toneladas, con una caída interanual del 11,4 %, debida al conflicto bélico entre Ucrania y Rusia.

En Argentina, el cultivo de girasol actualmente se extiende de norte a sur desde el Chaco hasta el sur de la provincia de Buenos Aires y desde el sur de San Luis y centro de La Pampa, hasta Entre Ríos. El área cultivada puede dividirse en tres grandes regiones, Norte, Centro y Sur (Figura N° 1) (Castaño, 2018). Buenos Aires es la provincia que concentra la mayor parte de la superficie sembrada, seguida por Santa Fe, La Pampa y Chaco (ASAGIR, 2023).

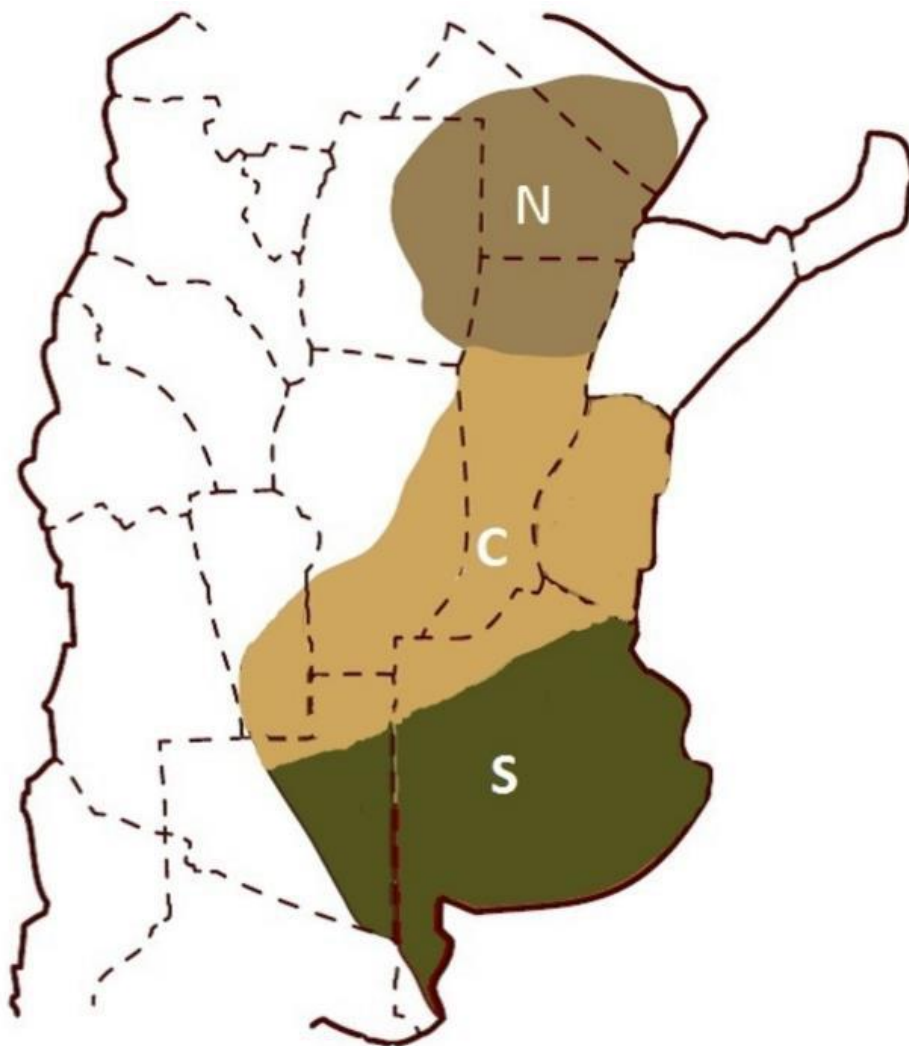


Figura N° 1. Área de cultivo de girasol, dividida en tres regiones: Norte (N), Centro (C) y Sur (S). Imagen extraída de (Castaño, 2018).

Tipos de girasol y sus usos

Las semillas de girasol contienen, en general, entre un 45 y un 53 % de aceite y entre un 15 y un 18 % de proteína (Skorić, 2009). Además, estas contienen tocoferoles, minerales y vitaminas. Hay dos tipos de híbridos de girasol: el tipo de semillas oleaginosas y el tipo de confitería (girasol confitero). Los de tipo de semillas oleaginosas producen aquenios negros relativamente más pequeños con un pericarpio delgado que se adhiere firmemente a la pepita. El destino de la semilla oleaginosa de girasol es el aceite que se utiliza mayormente para consumo humano, aunque también es apto para biocombustibles. El tipo confitería produce los aquenios grandes y rayados que se utilizan principalmente como alimento para humanos. Las semillas de girasol se utilizan principalmente por su contenido de aceite, que representa el 80 % de su valor en el mundo (Žilić et al., 2010). Según ASAGIR, en el mercado mundial de aceites, el de girasol es el cuarto en orden de importancia desde el punto de vista productivo, superado por el aceite de palma, soja y colza. Entre las campañas 2012/2013 y 2021/2022 su participación en la producción global fue, en promedio, del 9,2 %. En dicho período, la producción mundial de aceite de girasol tuvo un incremento del 53 %. Para el ciclo 2022/2023 se proyectó una producción mundial de 20,6 millones de Tn (+3,7 % variación interanual), mientras que la participación en el total se mantendría en torno al 9 %.

Los esfuerzos de mejoramiento llevaron a la obtención de girasoles híbridos con diferentes perfiles de aceite (tipos de grasas saturadas e insaturadas) (Skorić, 2009). Las categorías son estándar o linoleico, medio oleico (en EE. UU. NuSun) y alto oleico.

El cultivo de girasol: requerimientos y labores culturales

El tiempo requerido para el desarrollo de una planta de girasol y la duración de las distintas etapas del mismo dependen de la genética de la planta y el período de

crecimiento. Casi todas las variedades comerciales de girasol son híbridos, y se seleccionan en base a un alto rendimiento, con elevado contenido de aceite de semilla (al menos 40 %) y resistencia a enfermedades e insectos. La madurez fisiológica se alcanza dentro de los 2200-2300 grados días o 120-150 días después de la siembra. Schneiter y Miller (1981) crearon un esquema estandarizado de etapas de crecimiento para girasoles en etapas vegetativas y reproductivas (Tabla N° 1).

Tabla N° 1. Etapas de crecimiento del girasol y descripciones (Schneiter y Miller, 1981).

Estado	Descripción
Emergencia (VE)	Emergencia de la plántula, la primera hoja verdadera tiene menos de 4 cm de largo.
Estados Vegetativos (V) (V1, V2, V3, V4...etc.)	Se determina contando el número de hojas verdaderas de al menos 4 cm de largo comenzando como V1, V2, V3, V4, etc.
Estado Reproductivo (R1)	El botón floral comienza a diferenciarse. Visto desde arriba, las brácteas inmaduras forman una apariencia de estrella de muchas puntas.
R2	El botón floral se encuentra entre 0,5 y 2 cm de la hoja más cercana inserta en el tallo.
R3	El botón floral se encuentra a más de 2 cm de la hoja más cercana.
R4	La inflorescencia comienza a abrirse. Vista desde arriba, las flores liguladas aún inmaduras son visibles.
R5 (decimales) (ej. R5.1, R5.2, R5.3... etc.)	Comienzo de la antesis (floración). Se divide en sub-estados dependiendo del porcentaje del área del capítulo que ha completado su floración. Ej.: R5.2, el 20 % de las flores se encuentra en antesis o post antesis
R6	La antesis está completa y las flores liguladas se están marchitando.
R7	El envés del capítulo vira al amarillo pálido.

Tabla N° 1. Continuación.

R8	El envés del capítulo es amarillo, pero las brácteas permanecen verdes.
R9	Las brácteas se vuelven amarillas y marrones. La mayor parte del envés del capítulo se ha tornado marrón. Esta etapa se considera madurez fisiológica.

Los girasoles crecen mejor en suelos bien drenados con un pH neutro (6,5-7,5) (Berglund, 2007). Los regímenes de labranza practicados en todas las regiones girasoleras de Argentina incluyen labranza convencional, mínima y cero. Los factores a considerar al momento de decidir qué régimen de labranza utilizar incluyen el tipo de suelo, el clima, el régimen de fertilización y la rotación, entre otros.

Se recomienda una rotación de cultivos que ayude a reducir los niveles de inóculo de patógenos en el suelo, disminuir el uso de pesticidas, controlar las poblaciones de insectos que hibernan, las malezas, el uso del agua y el manejo de la fertilidad. La incidencia de enfermedades puede verse exacerbada por la falta de rotación de campos y/o por una secuencia demasiado cercana de girasol en las rotaciones practicadas. Por ejemplo, la pudrición del capítulo por *Sclerotinia* puede causar un alto nivel de pérdida de rendimiento, y otros cultivos de hoja ancha son hospedantes del mismo patógeno (Bolton et al., 2006). Por lo tanto, las rotaciones de al menos cuatro años, incluidos los cereales, generalmente se recomiendan para ayudar a controlar enfermedades como la pudrición del capítulo por *Sclerotinia*.

Las aplicaciones de fertilizantes deben hacerse en base a un análisis de suelo (Franzen, 2010) y tener en cuenta los requerimientos del cultivo (Díaz Zorita y Duarte, 2002) (Tabla N° 2).

Tabla N° 2. Cantidad total de nutrientes absorbidos y extraídos en los granos, expresada en kg de nutriente por tonelada de órgano cosechable en base seca.

Absorción Total (kg/tn)							Extracción de grano (kg/tn)						
N	P	K	Ca	Mg	S	B	N	P	K	Ca	Mg	S	B
40	11	29	18	11	5	0,07	24	7	6	1	3	2	0,049

Con base en las recomendaciones derivadas del análisis del suelo, las aplicaciones de nitrógeno pueden llevarse a cabo antes, durante o después de la siembra, así como mediante una combinación de estos momentos. El fósforo y el potasio también se pueden aplicar en otoño o primavera antes de una operación de labranza. Deficiencias de hierro, manganeso, zinc, cobre, molibdeno, boro y cloro no son comunes, pero pueden presentarse (Berglund, 2007).

Fechas de siembra en la región Sur, densidad de siembra, espaciamiento entre hileras (surcos) y profundidad de siembra

La siembra de girasol en la región semiárida pampeana comienza a partir del 1 de octubre y finaliza alrededor del 10 de diciembre. En general, las siembras tempranas se concentran en el mes de octubre y las siembras tardías se concentran en la última decena de noviembre y principio de diciembre. Estas fechas coinciden con la otra gran zona de producción en Argentina que es el sudoeste de la provincia de Buenos Aires. La fecha de siembra ideal se alcanza cuando la temperatura del suelo se estabiliza en 15 °C, medida a la profundidad de siembra. Con menor temperatura, el proceso de germinación se demora y la emergencia es heterogénea y toma más de 10 días en germinar (Guía práctica para el cultivo de Girasol INTA, 1997).

La densidad de siembra de girasol depende en mayor medida del potencial del lote, mientras en los ambientes de menor potencial la densidad de siembra varía entre 30000

y 40000 sem/ha, en los ambientes de alto potencial varía entre 60000 y 80000 sem/ha. El número de semillas a sembrar debe ser un 10-15 % superior al número de plantas a lograr para compensar pérdidas de plantas (Guía práctica para el cultivo de Girasol INTA, 1997).

La mayoría de los lotes en Argentina se siembran con un distanciamiento entre hileras de 52 o 70 cm. En un relevamiento hecho por Kandel (2012) se encontró que los lotes de girasol con un espaciamiento entre hileras mayor a 50 cm son prevalentes en las todas las regiones productoras de girasol en EE. UU.

La profundidad de siembra recomendada para el girasol es a no más de 5 cm y en tierra húmeda (Pereyra et al., 2001). Esto coincide con los 3,80 a 5,08 cm de profundidad recomendados para EE. UU. (Mathew, 2014).

Manejo de malezas, insectos y enfermedades

Los girasoles no cubren el suelo lo suficientemente rápido como para evitar el establecimiento temprano de malezas por lo que éstas presentan problemas para los productores girasoleros en Argentina. Entre las malezas que más frecuentemente compiten con el girasol se destacan: sorgo de alepo (*Sorghum halepense*), cardo ruso (*Salsola kali*), amor seco (*Bidens pilosa*), quínoa (*Chenopodium album*), sanguinaria (*Polygonum aviculare*), abrojos (*Xanthium sp.*), algodonosa (*Gnaphalium spicatum*), perejilillo (*Bowlesia incana*), lecherón (*Euphorbia dentata*), rama negra (*Conyza bonariensis*), yuyo colorado (*Amaranthus quitensis*) y roseta (*Cenchrus incertus*) entre otras (Pereyra et al., 2001; Montoya et al., 2008). La competencia de malezas con los girasoles durante las primeras cuatro a seis semanas después de la emergencia puede reducir el rendimiento del girasol en un 30 % (Cayón Salinas, 2018). Por lo tanto, las buenas prácticas de producción deben incluir una combinación de métodos culturales y químicos para manejar las malezas. La introducción de los híbridos de girasol tolerantes

a herbicidas, como por ejemplo “Clearfield”, brindó a los productores nuevas opciones para el control posterior a la emergencia de malezas de hoja ancha y gramíneas. Ambos sistemas requieren tratamientos herbicidas previos a la emergencia, como por ejemplo sulfentrazone, para combatir las malezas gramíneas y de hoja ancha clave durante el cultivo (Zollinger, 2014).

Los girasoles son afectados por una amplia serie de plagas, incluidos insectos, malezas y enfermedades. Los campos deben monitorearse con frecuencia para determinar las especies de plagas presentes y si las poblaciones se encuentran en niveles de umbral económicos. El Manejo Integrado de Plagas (MIP) se puede utilizar para manejar plagas mediante la combinación de herramientas biológicas, culturales y químicas a fin de minimizar los riesgos económicos, de salud y ambientales. Varios factores influyen en la abundancia y diversidad de plagas en los girasoles de un año a otro. La integración de diferentes herramientas de manejo puede minimizar el número de plagas y el costo, al evitar pérdidas innecesarias de cultivos. Este enfoque resulta particularmente importante para el manejo de las enfermedades del girasol. En este sentido, cabe destacar que patógenos como *Plasmopara halstedii* y *Verticillium dahliae* presentan múltiples razas capaces de superar la resistencia de los materiales sembrados (Markell et al., 2015). Por otra parte, *Pustula helianthicola* es naturalmente insensible a los fungicidas del grupo 3 FRAC (Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas), y son varios los patógenos que no pueden controlarse con una sola herramienta (Gulya et al., 2013, Harveson et al., 2016).

Cosecha

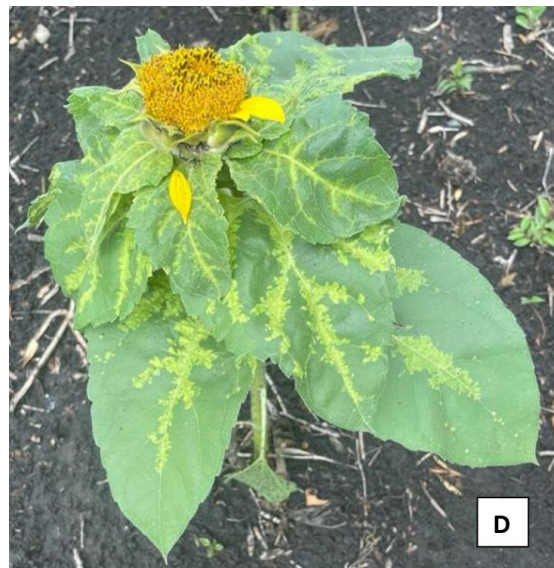
El girasol se cosecha en la región semiárida y el sudeste de Buenos Aires entre la última quincena de febrero y la primera quincena de marzo. La humedad base de comercialización del girasol en Argentina es del 11 % con una tolerancia de recibo de

hasta el 14 % (SAGyP, 1994), mientras que el contenido de humedad de almacenamiento seguro (CHAS) a 20 °C, dependiendo del contenido de aceite de la semilla, se encuentra entre 7 y 12 % (Maciel et al., 2015); aunque debido al elevado contenido de aceite de los híbridos actuales, el CHAS es cercano a 8-9 % en la mayoría de los casos. Cosechar girasoles cuando la humedad de la semilla es superior al 16 % puede provocar problemas durante la cosecha, el secado y el almacenamiento (Berglund, 2007).

Enfermedades fúngicas como un factor limitante en la producción de girasol

Se han informado más de 90 enfermedades del girasol en todo el mundo (Gulya et al., 1997; Gulya et al., 2016; Markell et al., 2023). El impacto de las pérdidas causadas por los patógenos está relacionado con la etapa de crecimiento del cultivo en el momento en que se inicia la enfermedad y esto puede afectar el rendimiento. Por lo tanto, comprender los factores que desencadenan el desarrollo de enfermedades e identificar rápidamente los agentes fitopatógenos es fundamental para crear e implementar estrategias efectivas para el manejo de las mismas. En Argentina, las enfermedades más comunes del girasol son causadas por hongos y oomicetos que incluyen la roya negra (*Puccinia helianthi* Schwein.), el mildiu (*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. & de Toni), la marchitez por *Verticillium* (*Verticillium dahliae* Kleb.), pudrición del tallo y capítulo por *Sclerotinia* (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), el escudete negro (*Plenodomus lindquistii* (Frezzi) Gruyter, Aveskamp & Verkley), la roya blanca (*Pustula helianthicola* sp. nov. Rost & Thines) pudrición del capítulo por *Rhizopus* (*Rhizopus* spp.), podredumbre carbonosa (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid) y cancro del tallo (CT) y podredumbre seca del capítulo (PSC) (*Diaporthe* spp.) (Pereyra & Escande, 1994; Pérez Fernández & Figueruelo, 2008; Kandel, 2012; Ivancovich & Lavilla, 2016; Harveson et al., 2016) (Figura N° 2). Cuando está disponible, el manejo más sustentable y eficaz de las enfermedades del girasol es la siembra de híbridos resistentes. En el

mercado existen híbridos con resistencia a algunas razas de *P. halstedii* y *V. dahliae* (Gulya et al., 1997; Markell et al., 2015). Además, los aquenios se pueden tratar con fungicidas para controlar los patógenos transmitidos por las semillas, como *P. halstedii*. Un trabajo reciente sugiere que, si bien la roya se puede controlar de manera efectiva y económica mediante una aplicación foliar (Friskop et al., 2014), las aplicaciones para el control de la pudrición del capítulo por *Sclerotinia* no son efectivas ni económicamente viables (Wunsch et al., 2014).



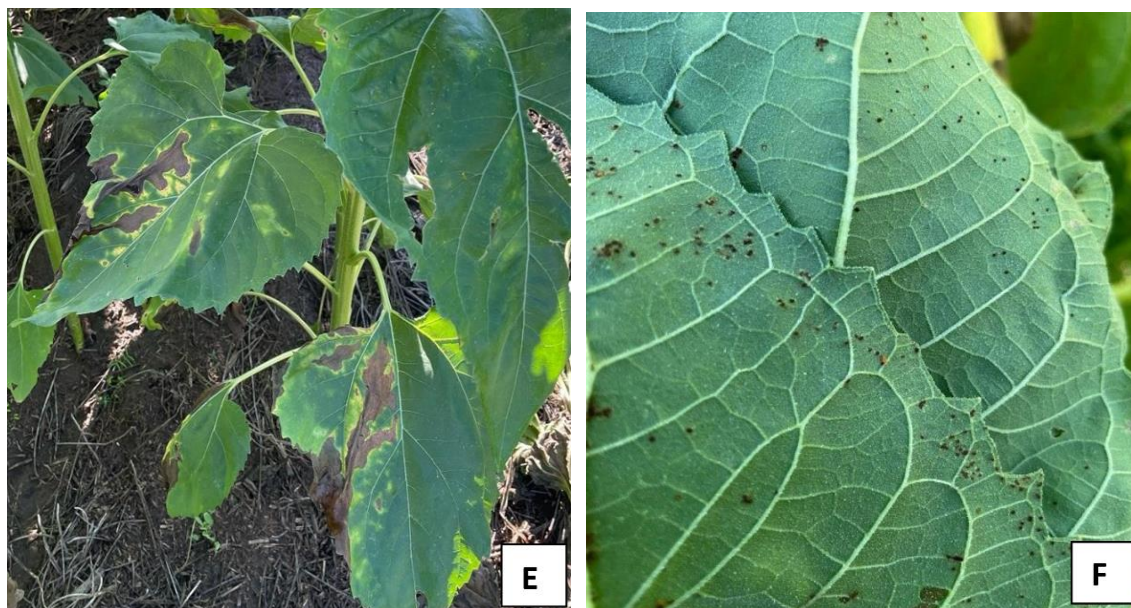


Figura N° 2. Síntomas de las enfermedades más relevantes del cultivo en Argentina. A: Cancro de tallo; B: Podredumbre seca del capítulo; C: Podredumbre húmeda del capítulo; D: Downey mildew; E: Verticilosis; F: Roya negra, (fotos propias, D. N. Colombo).

Cancro del tallo de girasol y podredumbre seca del capítulo

El cancro del tallo (CT) es una enfermedad fúngica responsable de grandes pérdidas de rendimiento en cultivos de girasol en las principales regiones productoras del mundo (Masirevic y Gulya, 1992; Gulya et al., 1997; Debaeke et al., 2003; Harveson et al., 2016).

El CT se describió por primera vez en la antigua Yugoslavia en 1980 identificando y caracterizando a *Diaporthe helianthi* M. Muntañola-Cvetkovic et al. (Muntañola-Cvetkovic et al., 1985) como agente causal de la enfermedad. Posteriormente, la enfermedad se reportó en varios países productores de girasol como Rumania, Hungría, Francia, Rusia, Ucrania, Estados Unidos y sur de África (Voros et al., 1983; Lamarque y Perny 1985; Regnault, 1985; Masirevic y Gulya, 1992; Skripka et al., 1993; Gulya et

al., 1997). A partir de la década del 90, el impacto de *Diaporthe* creció, ocasionando daños que provocaron pérdidas en el rendimiento de hasta el 50 % (Alonso, 1988). A partir de finales de la década del 90, se reportó la PSC en Francia, pero sin mayor relevancia (Pinochet y Estragnat, 1996.).

En Estados Unidos, el CT se citó por primera vez en 1983, como una enfermedad menor, pero aumentó su prevalencia en el año 1995 encontrándose hasta un 80 % de lotes afectados (Gulya, 1996). En la última década se documentó la presencia de *D. helianthi* y *D. gulyae*, entre otras especies del género, ocasionando cancro del tallo en girasol (Mathew et al., 2011; 2013; 2015b; Olson et al., 2017).

En Uruguay se registró una epifitía de CT y PSC en la campaña 2002/2003 (Stewart, 2005). En la región girasolera de Mercedes, Uruguay, el CT alcanzó incidencias entre 80 % y 100 % (Stewart et al., 2004; Fassio et al., 2007) con estimaciones que sugieren pérdidas de hasta el 75 % en la producción de granos, un 21 % en el contenido de aceite y un 26 % en el peso de mil granos (Stewart y Rodríguez, 2018). Este fenómeno, que tuvo consecuencias sustanciales en el rendimiento del cultivo, provocó una disminución significativa en el área sembrada de girasol y un desplazamiento geográfico de la zona de cultivo (Stewart, 2005).

En Argentina el CT se desarrolló como epifitía en Paraná, Entre Ríos, en la campaña 1992/1993 (Fálico de Alcaraz et al., 1994). En los años siguientes se presentó de manera esporádica sin pérdidas importantes en lotes comerciales (Pérez Fernández, 2002; Huguet, 2006, Verschoor et al., 2014). En el sudeste de la provincia de Buenos Aires, se registraron lotes con 15 % de incidencia (tallos quebrados) de CT en la campaña 1994/1995 (Favere et al., 1996). Por su parte, en Argentina, la PSC comenzó a observarse desde 2014, en lotes de producción en el sur y noroeste de la provincia de Buenos Aires y este de La Pampa, convirtiéndose esta en la primera observación en Argentina. En las campañas agrícolas 2013/2014 y 2014/2015, la Red Territorial de Sanidad Vegetal (RETSAVE), vinculada a INTA-FCA, UNMdP, identificó una

prevalencia del 17% de CT en un total de 36 lotes, sin evidencia de PSC en las áreas evaluadas. En la campaña 2016/17, aunque la prevalencia de CT se mantuvo consistente con los valores previamente mencionados, se observaron los primeros casos de lotes con PSC, localizados en la localidad de Necochea y Balcarce, ambos con incidencias bajas. Es relevante señalar que la mayoría de los lotes afectados por CT se ubicaron en el centro oeste de la provincia y en la región sur, específicamente en la zona costera cercana a Necochea. En 2015/2016 se produjo una epifitía de CT en el este de La Pampa y oeste de Buenos Aires. Durante ese período se observaron pérdidas de calidad severas en la zona norte de La Pampa atribuidas más tarde a PSC por *Diaporthe* (Corró Molas et al., 2016a).

En la actualidad, estas enfermedades cobraron relevancia en cuanto a la prevalencia (número de lotes con presencia de la enfermedad/número de lotes totales evaluados) y la incidencia (número de plantas enfermas/número de plantas totales evaluadas). Corró Molas et al., (2016a) analizaron cultivares de girasol convencionales y confiteros en el campo experimental de la EEA Anguil (La Pampa) y observaron valores de incidencia promedio de CT entre 20 y 30 % durante la campaña 2015/2016. Mientras que, en la misma campaña se reconocieron capítulos con 100 % de incidencia de PSC en algunos lotes de producción de la región semiárida. En la siguiente campaña 2016/17, los niveles de enfermedad en la región disminuyeron en incidencia y severidad. Esta disminución fue más importante para infecciones en tallos que para infecciones en capítulos (Perlo Gallio et al., 2021). En la región del sudeste bonaerense, Mancebo (2021) llevó a cabo un relevamiento durante las campañas agrícolas 2016/2017, 2017/2018 y 2018/2019, y registró prevalencias crecientes para CT y la PSC (17 %, 32 % y 59 % para el CT, y 6 %, 13 % y 32 % para PSC). Cabe destacar que esta autora no identificó ninguna relación significativa entre el cultivo antecesor y la prevalencia de ambas enfermedades.

Descripción y taxonomía de *Diaporthe*

Dentro del reino Fungi, el género *Diaporthe* se incluye en los Ascomycota, clase Sordariomycetes orden Diaporthales, familia Diaporthaceae. (*Index Fungorum*)

El estado sexual de *D. helianthi* se caracteriza por ascomas periteciales que ostentan cuerpos esféricos a globulares, amarillentos a negros y de 290 a 430 micrómetros (µm) de diámetro y cuellos largos. Los ascos son globulares a subcilíndricos, de 60 a 76,5 µm de largo por 8,7 a 12,5 µm de ancho. Las ascosporas son bicelulares, elipsoidales y constreñidas en el tabique, de 15 a 17,5 µm de largo por 8,7 a 12,5 µm de ancho (Muntañola-Cvetkovic et al., 1985, Udayanga et al., 2011). El estado asexual de *D. helianthi* se caracteriza por picnidios negros ostiolados que contienen fiálides cilíndricas alargadas que pueden producir dos tipos de conidios hialinos, no septados: conidios α unicelulares que son bigutuladas, fusiformes y germinan fácilmente en medios artificiales, y beta conidios que son filiformes y rara vez germinan (Wehmeyer, 1933; Muntañola-Cvetkovic et al., 1985; Rehner y Uecker, 1994). Generalmente, los conidióforos son hialinos, ramificados y ocasionalmente cortos y 1-2 septados (Muntañola-Cvetkovic et al., 1985, Udayanga et al., 2011). Los conidiomas, llamados picnidios, se producen en las lesiones del tallo durante el ciclo de la enfermedad. Los picnidios son globulares, de 120 a 290 µm de diámetro, de color marrón oscuro, ostiolados y sumergidos en tejido (Wehmeyer, 1933; Maric y Masirivic, 1980; Muntañola-Cvetkovic et al., 1985; Uecker, 1988).

Debido a la transición nomenclatural a un solo nombre de género para los estados sexual y asexual de los hongos (Wingfield et al., 2012) y la prioridad nomenclatural usamos *Diaporthe* Nitschke (1870) y no *Phomopsis* (Sacc.) Bubák (1905) a lo largo de este documento.

El complejo de especies del género *Diaporthe* que afecta girasol

La identificación del agente causal del CT es un tema controvertido desde que se identificó por primera vez en 1980 (Muntañola-Cvetkovic et al., 1985). Muntañola-Cvetkovic et al. (1985) encontraron que múltiples especies de *Diaporthe* estaban asociadas con canchros en girasol, aunque solo *D. helianthi* fue responsable de los brotes de enfermedades graves.

Áćimović y Štraser (1982) y Masirevic y Gulya (1992) determinaron diferencias en los síntomas causados por aislamientos de *D. helianthi* en girasoles, desarrollo de picnidios, dimensiones de picnidios y conidios, tipo de conidios, requisitos de temperatura para el desarrollo de conidios y formación de ascomas periteciales.

Gulya et al. (1997) sugirieron que las especies patógenas de *Diaporthe* en el girasol podrían consistir en más de una especie o biotipo con diferencias biológicas aparentes entre los aislamientos de Europa y los EE. UU.

Para resolver problemas taxonómicos, diversos autores utilizaron filogenias moleculares basadas en el análisis de secuencias de ADN incluyendo las regiones del espaciador interno transcrito (ITS) de los genes de ARN ribosomal nuclear, la región del gen del factor de elongación de la traducción-1 α (EF-1 α), la región del gen de la β -tubulina (TUB), la región del gen de actina (ACT) y genes *mating type* (MAT), entre otros. (Ash et al., 2010; Santos et al., 2010; Thompson et al., 2011; Udayanga et al., 2011). De acuerdo con Mostert et al., (2001) y Rehner y Uecker (1994) el hospedante presenta una importancia menor respecto de la identificación de las especies de *Diaporthe*. Además, estudios recientes demostraron que *Diaporthe* spp. tienen un amplio rango de hospedantes (Santos y Phillips, 2009; Ash et al., 2010; Udayanga et al., 2011; Gomes et al., 2013), y que más de una especie de *Diaporthe* pueden encontrarse en un solo hospedante (Santos y Phillips, 2009).

Diversas especies de *Diaporthe* se reportaron como patógenos para varias compuestas, que actúan como hospedantes alternativos o reservorios de inóculo. Por ejemplo, el abrojo (*Xanthium sp.*) es un hospedante de una especie de *Diaporthe* patógena para el girasol (Carriere y Petrov, 1990). No obstante, Mihaljcevic y Vukovevic (1994) concluyeron que el girasol es la principal fuente de inóculo de *D. helianthi* en Yugoslavia. Por otra parte, se confirmó que múltiples especies de *Diaporthe* están involucradas en el desarrollo de la enfermedad del CT en Croacia (Vrandecic et al., 2009) y Australia (Thompson et al., 2011).

Resumiendo, hasta la actualidad se han reportado las siguientes especies de *Diaporthe* como responsables del CT en los girasoles en todo el mundo, a saber, *Diaporthe helianthi* M. Muntañola-Cvetkovic et al. (Muntañola-Cvetković et al., 1985), *Diaporthe gulyae* Shivas, Thompson and Young (Thompson et al., 2011), *Diaporthe kongii* Shivas, Thompson and Young (Thompson et al., 2011), *Diaporthe kochmanii* Shivas, Thompson and Young (Thompson et al., 2011), *Diaporthe stewartii* A. L. Harrison (Mathew et al., 2012), *Diaporthe longicolla* (Hobbs) J. M. Santos, Vrandečić & A. J. L. Phillips (Mathew et al., 2012), *Diaporthe novem* J. M. Santos, Vrandečić & A. J. L. Phillips (Thompson et al., 2018), *Diaporthe caulivora* (Athow & Caldwell) Santos, Vrandecic & Phillips (Zambelli et al., 2020) y *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc. (Cooke y Ellis, 1878). De estas, se ha informado que *D. helianthi*, *D. gulyae*, *D. kongii*, *D. sojiae*, *D. caulivora* y *D. longicolla* causan el CT en la región del sudeste bonaerense (Zambelli et al., 2020; Mancebo, 2021).

Ciclo de ambas enfermedades

El CT es una enfermedad monocíclica, solo se produce un ciclo durante la estación de cultivo sin infecciones secundarias; los conidios producidos sobre los canchros en tallos no pueden generar nuevas infecciones en plantas sanas de girasol; se desconoce su

función biológica en el ciclo de la enfermedad (Mathew et al., 2015a; Corró Molas et al., 2019). La PSC comparte el ciclo con el CT y se considera también una enfermedad monocíclica, que se manifiesta sobre el fin del ciclo del cultivo. Por estas razones, la variable biológica que determina el posible desarrollo de la epidemia de CT o PSC es la cantidad de inóculo primario (las ascosporas que se esparcen desde los ascomas periteciales que están en el rastrojo). Además, es de suma importancia la presencia de condiciones climáticas que favorezcan eventos sucesivos de liberación de ascosporas, fundamentales en el establecimiento y posterior desarrollo de la epidemia (Stewart, 2005).

El ciclo del CT comienza con la producción de ascomas periteciales y la liberación de las ascosporas. Las esporas se diseminan por salpicadura de gotas de lluvia y por el viento, viajando distancias de hasta 100 km en las corrientes de aire (Harveson et al., 2016). Estas infectan los márgenes de las hojas de girasol a través de las gotas de gutación de los hidatodos. Después de la infección, el micelio invade los espacios intercelulares y las nervaduras terminales, alcanzando la nervadura central y, finalmente, el pecíolo y el tallo. En general, el período que abarca desde el inicio de la infección de la hoja hasta la presentación de la lesión en el tallo se extiende entre 25 a 30 días (Harveson et al., 2016). Las lluvias frecuentes desde el comienzo de la etapa reproductiva (R1) en adelante aceleran el desarrollo del CT, especialmente durante períodos prolongados de alta temperatura y humedad (Maric et al., 1988). Los picnidios pueden formarse en el tejido del tallo enfermo y, cuando maduran, liberan conidios asexuales (picniosporas). En el tallo se pueden formar dos tipos de conidios, alfa conidios y/o beta conidios. Si bien no se sabe si los conidios alfa contribuyen significativamente a nuevos ciclos de infección, los conidios beta no causan una infección secundaria (Mihaljcevic et al., 1985). El patógeno sobrevive y pasa el invierno como micelio en el rastrojo donde produce ascomas periteciales que darán nuevo inicio al ciclo (Masirevic y Gulya, 1992).

En forma independiente a las infecciones en hojas, que desencadena lo que llamamos CT, se pueden producir infecciones en capítulos. La enfermedad en el capítulo, a la que denominamos PSC, se inicia a través de ascosporas como en el CT, pero en este caso las infecciones comienzan mayoritariamente desde el borde del capítulo ya sea en la inserción de las brácteas, desde la hojilla situada por encima del receptáculo, o en menor frecuencia desde la superficie del receptáculo (Stewart, 2005) (Figura N° 3).

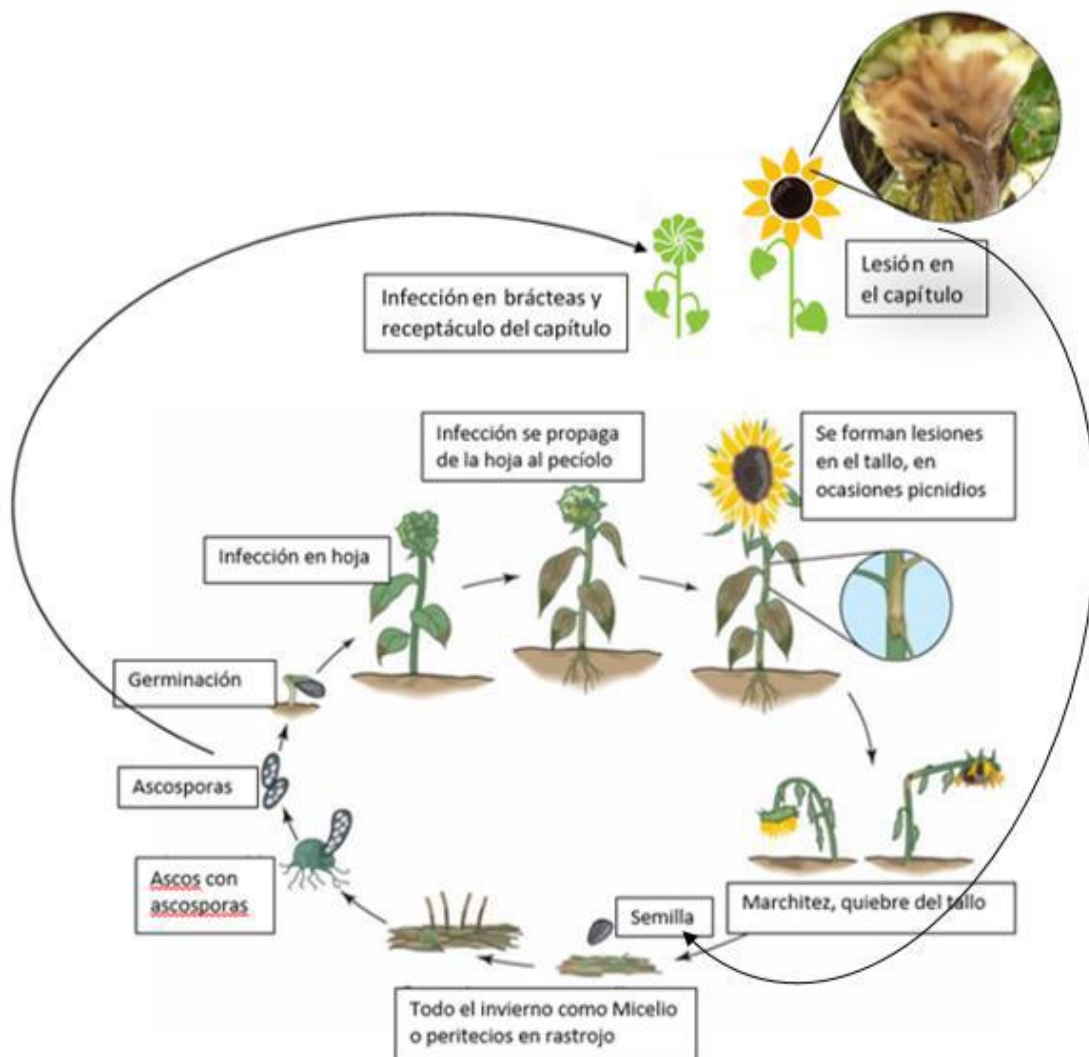


Figura N° 3. Ciclo de las enfermedades “Cancro del tallo” y “Podredumbre seca del capítulo de girasol” causadas por *Diaporthe/Phomopsis*. (Imagen adaptada de Mathew et al., 2018 y de Mancebo 2021).

Síntomas y daños

Las ascosporas de *D. helianthi* que germinan y producen infección, colonizan el parénquima y xilema. A partir del sitio de infección se generan síntomas en hoja que se describen como manchas necróticas en “V”. En promedio, los síntomas son visibles en las hojas 20 días después de la deposición de la espora con temperaturas del aire de 20 a 24 °C (Masirevic y Gulya, 1992). La infección avanza por el pecíolo y llega al tallo. Allí se produce un cancro (Muntañola-Cvetković et al., 1981; Gulya et al., 1997; Agüero, 2000; Stewart y Rodríguez, 2018) con centro en la inserción del pecíolo, que da el nombre a la enfermedad. El cancro es de color castaño claro a oscuro. Esta enfermedad puede ser confundida con el escudete negro causado por *Plenodomus lindquistii* pero esta última presenta manchas negras superficiales que no profundizan en la médula del tallo. La coloración de las lesiones en ambas enfermedades puede ayudar a diferenciar ambas patologías a campo, pero en ocasiones el cancro por *D. helianthi* puede presentar tonalidades oscuras dificultando el diagnóstico. Este puede abarcar pocos centímetros o prolongarse alrededor de 20 cm y circundar el tallo. La infección penetra los tallos y llega a la médula. Esta característica determina que en las hojas situadas por encima del cancro se produzcan síntomas de necrosis internerval sin halo clorótico. Las hojas sintomáticas presentan un patrón de distribución lateral en la planta que se relaciona con el origen de la infección. Estas características son similares, en parte, a los síntomas causados por *V. dahliae* y con frecuencia se confunde la enfermedad. No obstante, el síntoma foliar causado por *V. dahliae* presenta un halo clorótico bien definido que contribuye a su diferenciación (Pereyra & Escande, 1994; Harveson et al., 2016). En el estadio final de la enfermedad se produce el marchitamiento de la planta entera y en situaciones en que el ataque es severo, el tallo se quiebra y se produce entonces la pérdida total de la planta y de su producto. Abundantes picnidios pueden desarrollarse sobre la superficie del tallo, pero no en la médula (Muntañola-Cvetković et al., 1981).

El síntoma característico de la PSC se presenta en la base del receptáculo y se manifiesta como un área de color castaño oscuro (o castaño claro) y consistencia seca, que no permite la perforación completa del capítulo cuando se ejerce presión con los dedos. Estos síntomas podrían confundirse con los de la podredumbre del capítulo por *Sclerotinia sclerotiorum*. Ambas enfermedades infectan tejidos internos del receptáculo. No obstante, en el caso de esta última, la consistencia de la podredumbre es más blanda, permitiendo perforar el capítulo de un lado al otro al presionarlo con los dedos. Además, suele manifestarse con características adicionales como la presencia de micelio de coloración blanca, generalmente perceptible a simple vista, o la formación de esclerocios. Estos rasgos distintivos facilitan la discriminación entre ambas enfermedades. La diferenciación con *Rhizopus stolonifer* es más dificultosa por la apariencia similar de la podredumbre y la fructificación limitada de este último cuando no dispone de condiciones ambientales favorables. Sin embargo, *R. stolonifer* se asocia normalmente con daño en los tejidos que facilitan el ingreso del hongo. Este proceso está relacionado con la ocurrencia tormentas, en especial con caída de granizo, y hace que el análisis de las condiciones ambientales previas a la observación de síntomas sea una herramienta interesante para la diferenciación.

Un síntoma secundario y diagnóstico para la PSC, al igual que para el CT, es la necrosis internerval en hojas adyacentes a la lesión. Esto es consecuencia del efecto de la toxina *phomosina*, que produce el hongo durante la invasión de los tejidos de la planta (Mazars et al., 1990; Pericin et al., 1994; Agüero, 2000). En términos generales, se ha observado que la presencia de la toxina tiende a manifestarse de manera descendente en la infección de capítulo, es decir, se observa necrosis internerval en las hojas superiores. Contrariamente, en el CT la toxina se evidencia de manera ascendente, en consecuencia, la necrosis internerval se observa primeramente en las hojas inferiores.

Manejo de las enfermedades

Labranza y rotación: los residuos de cultivos que quedan en la superficie del suelo facilitan el desarrollo de *Diaporthe*. Enterrar los residuos de los cultivos mediante labranza convencional puede ser eficaz para reducir las enfermedades, pero la velocidad de descomposición de los residuos se verá influenciada por las condiciones climáticas (Mihaljcevic et al., 1985). Además, la amplia adopción de la siembra directa en Argentina hace que esta opción sea poco viable. *Diaporthe* puede sobrevivir en los rastrojos e incluso ha sido aislado en laboratorio a partir de ellos (Muntañola-Cvetković et al., 1981). La siembra de no hospedantes por un período de entre dos y cuatro años contribuye en la reducción del inóculo. En estos años intermedios, se siembran cultivos no hospedantes como las gramíneas (Masirevic y Gulya, 1992).

Densidad de plantas y fertilización nitrogenada: altas densidades de plantas pueden dar como resultado plantas más altas con tallos más delgados, lo que las hace más propensas a quebrarse y volcarse después de una infección. Un canopeo denso que puede deberse a la densidad de plantas o del uso excesivo de nitrógeno, favorece las condiciones ambientales para la aparición de enfermedades por lo que debe evitarse. Debaeke y Moinard (2010) estudiaron los efectos del manejo del cultivo (densidad de plantas, fertilización con nitrógeno e irrigación) y la tolerancia genotípica (cultivares susceptibles y tolerantes) durante dos años. Concluyeron que la infección temprana de *Diaporthe* está relacionada con cambios en el microclima resultantes de las prácticas de manejo del cultivo o de la arquitectura del cultivar. El número de lesiones de CT por planta fue mayor con la fertilización con alto contenido de nitrógeno en comparación con los cultivos que recibieron poca o ninguna fertilización (Debaeke y Moinard, 2010). Por lo tanto, el manejo de la densidad del cultivo y la fertilización con nitrógeno pueden ayudar a disminuir la incidencia y la severidad del cancro del tallo.

Semillas: las especies de *Diaporthe* pueden transmitirse por semillas, por lo que es importante asegurarse de que las semillas de girasol utilizadas para plantar estén libres de patógenos (Masirevic y Gulya, 1992). Thompson et al., (2023) reportaron que *D. gulyae* colonizó semillas en el capítulo de girasol alcanzadas desde infecciones producidas en hojas.

Control biológico y control químico: no se han desarrollado estrategias de control biológico para el manejo del CT ni de la PSC en Argentina hasta el momento, tampoco en otras regiones del mundo como los EE. UU. (Masirevic y Gulya, 1992).

En lo que respecta al control químico, los tratamientos con fungicidas son netamente preventivos y se obtuvieron resultados dispares con el uso de esta herramienta. La alta dependencia de las condiciones ambientales determina dificultades en la evaluación y resultados variables. Se intentaron evaluaciones de fungicidas en 2009 en los Estados Unidos, pero el CT no se desarrolló (Markell et al., 2010). En 2011, se produjo una epidemia natural de CT en un ensayo de roya con fungicidas (Mathew et al., 2012), y los tratamientos con aplicaciones de fungicidas con prothioconazole y tebuconazole en el ensayo redujeron significativamente la incidencia de la enfermedad. De manera similar, el rendimiento de semilla fue significativamente mayor en las parcelas donde se aplicaron fungicidas que en las parcelas no tratadas. Sin embargo, la incidencia de la roya también se redujo con las aplicaciones de fungicidas, por lo que el impacto directo en el rendimiento que tuvo el CT no estuvo claro (Mathew et al., 2012). Stewart (2005) en un ensayo en Mercedes, Uruguay, encontró que la mezcla de trifloxystrobin (GQ: Strobilurina) + tebuconazol (Triazol), fue más eficiente en el control de la enfermedad que el resto de los tratamientos, con una eficiencia de control de 98,4 %, 86,9 % y 64,4 % en los tratamientos a V5/6 + V12/13, V5/6 + R1 y V12/13 + R1, respectivamente. Gilley et al. (2015) observó que aplicaciones con estrobilurinas en el estado fenológico de R1 fueron efectivas para el control de la enfermedad. Dangal et al. (2022) y Kashyap et al. (2023) demostraron que los fungicidas que contienen pyraclostrobina (grupo FRAC

11) son efectivos contra los hongos que causan el cancro del tallo cuando se aplican en la etapa de inicio del desarrollo de la inflorescencia del girasol (estado fenológico R1). Por lo general, en ese momento fenológico no se observan síntomas en las plantas de girasol, aunque parte de estas pueden encontrarse infectadas en forma asintomática.

Por otro lado, el período de posibilidad de infección es muy extenso e incluye primeramente infecciones en hojas/tallos y posteriormente en capítulos. La oportunidad de los tratamientos se basa en la protección del período de mayor susceptibilidad y de la ocurrencia de condiciones ambientales favorables para la liberación de ascosporas y para la posterior germinación de las mismas e infección.

Resistencia genética: La resistencia genética usualmente es la forma de controlar las enfermedades más rentable y amigable con el ambiente.

La complejidad de la resistencia genética no solo involucra numerosos genes con contribuciones infinitesimales al fenotipo de resistencia, sino también múltiples especies de *Diaporthe* responsables del CT y PSC en el girasol y diferentes puntos de entrada del hongo (hoja y capítulo), lo que hace a la búsqueda de resistencia un trabajo laborioso.

Grupos de investigación europeos lideraron inicialmente la búsqueda de fuentes de resistencia a través de estudios de loci de rasgos cuantitativos (QTL) (Besnard et al., 1997; Bert et al., 2002). En los últimos años, con la reaparición del patógeno en los EE. UU. y Argentina, se realizaron nuevos esfuerzos para desentrañar la base genética de la resistencia, utilizando enfoques de genoma completo. Con este fin, utilizando una población de líneas recombinantes derivadas de un cruce entre HA89 (susceptible) y HA-R3 (resistente), Talukder et al. (2020) identificaron 15 QTL asociados con la resistencia a CT. Además, Pogoda et al. (2021) identificaron siete QTL únicos para CT, utilizando un enfoque de Estudio de Asociación de Genoma Completo (GWAS) basado en una población de 218 accesiones preservadas en el USDA. Incluyendo más variables

al patosistema, Guidini et al. (2023) identificaron 28 QTLs comunes a dos especies de *Diaporthe* responsables del CT: *D. gulyae* y *D. helianthi*.

Mientras tanto, en Argentina, numerosos estudios se dedicaron a caracterizar el comportamiento de híbridos y líneas mejoradas genéticamente a través de infecciones naturales o seminaturales con la dispersión adicional de residuos de cultivos infectados (Corró Molas et al., 2016b; Troglia et al., 2022). Utilizando la población de mapeo de asociación del INTA, Filippi et al. (2022) identificaron 19 asociaciones únicas de marcadores para las dos enfermedades: CT y PSC. Esto constituyó el primer informe de identificación de loci asociados a PSC.

Skoric et al. (1985) y Filippi et al. (2022) describieron la resistencia a *D. helianthi* en germoplasma cultivado de girasol, mientras que Besnard et al. (1997) y Griveau et al. (1992) lo hicieron en descendientes de cruces interespecíficos entre girasol y *Helianthus* silvestre. Distintos estudios genéticos revelaron que el control de la resistencia a *D. helianthi* es oligogénico (Vranceanu et al., 1993), de naturaleza cuantitativa y se rige principalmente por una acción génica aditiva (Viguié et al., 1999). Says-Lesage et al. (2002) demostraron que se producen amplias diferencias genéticas entre las cepas de *D. helianthi* de diferentes orígenes geográficos, esta variabilidad genética entre las poblaciones de *D. helianthi* hace que la evaluación del germoplasma a nivel local sea crítica para el manejo de enfermedades.

La forma más efectiva de control de esta enfermedad es a través de cultivares resistentes (Mihaljčević et al., 1982; Jocić et al., 2004). Por ende, priorizar la elección de materiales de mejor comportamiento genético frente a la enfermedad es una buena manera de reducir los daños del cancro del tallo (Masirevic y Forgic, 2000; Debaeke et al., 2003, Vilaró 2007).

El plan de trabajo de esta Tesis surgió de la demanda de conocimientos por parte del sector productivo para el manejo y control del CT y PSC a partir de la epifítia registrada en el noreste de La Pampa en la campaña 2015/2016. Desde ese momento y hasta la fecha, la enfermedad se generalizó a toda la región girasolera Sur. La escasa disponibilidad de cultivares comerciales de buen comportamiento y la falta de conocimiento sobre el agente etiológico promovieron el estudio del patosistema. En este sentido, se plantearon las hipótesis y los objetivos que se desarrollan a continuación.

HIPÓTESIS

El cancro del tallo y la podredumbre seca del capítulo del girasol en la región semiárida pampeana son causados por un complejo de taxones específicos o infraespecíficos íntimamente relacionados con *D. helianthi*. Y que, por otra parte, estos taxones presentan diferentes niveles de patogenicidad e interactúan de manera diferencial con el germoplasma de girasol.

OBJETIVO GENERAL

Generar conocimientos y herramientas para el diagnóstico de enfermedades fúngicas de girasol con énfasis en el estudio taxonómico, molecular, filogenético y fitopatológico del complejo *Diaporthe-Phomopsis* en la región semiárida pampeana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar el agente etiológico asociado al cancro del tallo y la podredumbre seca del capítulo de girasol en la región semiárida pampeana.
2. Estudiar la diversidad genética de las poblaciones del patógeno.
3. Evaluar los niveles de patogenicidad de los taxones específicos o infraespecíficos predominantes y estudiar respuestas de resistencia diferenciales en el germoplasma de girasol.
4. Describir, eventualmente, nuevos taxones específicos o infraespecíficos responsables del cancro del tallo y la podredumbre seca del capítulo.

CAPÍTULO I

El complejo *Diaporthe/Phomopsis* en el cultivo de girasol: detección y caracterización de especies asociadas a síntomas de cancro del tallo y podredumbre seca del capítulo en la región semiárida

Introducción

El CT está distribuido en la mayoría de las regiones productoras de girasol (*Helianthus annuus* L.) de Argentina (Mancebo et al., 2019; Colombo et al., 2021; Colombo et al., 2022), Estados Unidos (Gulya et al., 1997; Mathew et al., 2011; Mathew et al., 2015a), Europa-Asia (Masirevic y Gulya, 1992; Gomzhina et al., 2019) y Australia (Thompson et al., 2011). La importancia agronómica del CT radica en que puede causar pérdidas significativas en el rendimiento (10-50 %) y en el contenido de aceite (10-15 %) (Laville, 1986; Masirevic and Gulya, 1992). Los estudios realizados en la región girasolera semiárida de la provincia de La Pampa, indican que las pérdidas en el rendimiento del grano oscilan entre el 17 % y el 44 %, mientras que las pérdidas en el contenido de aceite se estiman en un 15 % (Ghironi et al., 2018). Es importante destacar que cuando el CT produce quiebre de plantas las pérdidas ascienden al 100 % por imposibilitar la cosecha, además la PSC también genera pérdidas por pudriciones del capítulo (Corró Molas et al., 2016b; Mancebo et al., 2021) que aún no han sido determinadas con precisión. La prevalencia de *Diaporthe* en la región sur de la provincia de Buenos Aires se situó en torno al 50 % para la campaña 2021/2022 con niveles de incidencia bajos a medios (del 5 % a no más del 30 %), lo que indica la presencia del patógeno (RETSAVE, 2023).

El CT se describió por primera vez en 1980, identificando a *D. helianthi* como el agente causal, según Muntañola-Cvetković et al. (1985). Sin embargo, a principios de la década

de 1980, algunos investigadores plantearon la posibilidad de que múltiples especies infectaran a los girasoles (Muntañola-Cvetković et al., 1985). Fállico de Alcaraz et al. (1997) mencionaron la existencia de grupos o especies causantes del CT en girasoles, identificándolos por los conidios que producían los picnidios, alfa y beta conidios. Las epidemias de CT del girasol en Australia (Thompson et al., 2011) y Estados Unidos (Mathew et al., 2015) revelaron que múltiples especies de *Diaporthe* estuvieron involucradas en el desarrollo de la enfermedad.

En la actualidad, se utilizan análisis filogenéticos para establecer los límites entre las especies del género *Diaporthe*, proporcionando evidencia genética más precisa que respalda las decisiones taxonómicas. El *barcoding* de ADN (Kress et al., 2014) se refiere al uso de secuencias génicas cortas estándar para identificar especies. El uso del *barcoding* de ADN implica que se debe hacer un esfuerzo para estandarizar el empleo de los loci en los estudios filogenéticos. El espaciador interno transcrito (ITS) es la región oficial de *barcoding* de ADN en los hongos (Schoch et al., 2012). Los análisis moleculares más utilizados se basan en las secuencias de nucleótidos de los genes: ITS, β -tubulina (TUB), factor de elongación de traducción 1- α (EF1- α), Calmodulina (CAL), Histona (HIS), entre otros, y se consideran criterios confiables para la clasificación de las especies de *Diaporthe* (Riccioni et al., 2005; Udayanga et al., 2011; Thompson et al., 2011; Gomes et al., 2013; Mathew et al., 2015b; Dissanayake et al., 2017). Sin embargo, según Santos et al. (2017) puede resultar sorprendente que el locus ribosomal ITS sea el menos informativo de los cinco loci más populares (ITS, TUB, CAL, HIS y EF1- α) cuando se trata de separar especies de *Diaporthe*. Además, dichos autores sugieren que el uso de ITS como estándar para la discriminación de especies fúngicas debería ser discontinuado, y recomiendan utilizar a EF1- α en su lugar, al menos en el género *Diaporthe*. Por otra parte, Santos et al. (2010) y Udayanga et al. (2014) propusieron EF1- α e HIS como loci alternativos para el *barcoding* en el género. Gomes et al. (2013), utilizando análisis bayesianos, consideran que HIS y TUB son los genes

de mejor resolución para el género. Cabe destacar que la calidad de la separación de especies en los árboles filogenéticos aumenta con el número de loci utilizados para construirlos (Gomes et al., 2013; Santos et al., 2017).

Por otro lado, varios autores defienden el uso de la región genómica de los genes *mating type*, en la resolución filogenética de especies fúngicas sobre otras regiones genómicas como ITS (Turgeon, 1998; Pöggeler, 2001; Du et al., 2005). De hecho, como reguladores principales de la reproducción sexual, los genes *mating type* desempeñan un papel importante en la genética de poblaciones y la evolución en hongos (Kronstad y Staben, 1997). Además, estos genes evolucionan rápidamente en todo el reino eucariota, aparentemente en conjunción con la especiación (Ferris et al., 1997).

La reproducción sexual en hongos ascomicetos está regulada por los loci llamados: *mating type* (MAT). Las variaciones alélicas de los genes MAT generalmente no son homólogas ni están relacionadas por estructura. Por lo tanto, se denominan "idiomorfos" en lugar de "alelos" (Metzenberg y Glass, 1990). El sistema de apareamiento de la mayoría de los ascomicetos es bipolar (Glass y Kuldau, 1992; Nelson, 1996), lo que significa que existen solo dos idiomorfos, determinando la existencia de dos tipos de apareamiento: MAT1-1 y MAT1-2 (Turgeon y Yoder, 2000). En especies heterotálicas (autoestériles), el desarrollo sexual depende del apareamiento entre aislamientos de *mating type* opuestos (Dyer et al., 1992; Pöggeler, 2001). Por otro lado, en especies homotálicas (autofértiles), los aislamientos logran el desarrollo sexual sin necesidad de un compañero de apareamiento (Glass et al., 1990; Coppin et al., 1997; Turgeon, 1998). Sin embargo, al menos parte de ambos *mating type* (MAT1-1 y MAT1-2) están presentes en el genoma de especies homotálicas, ya sea fusionados o separados (Turgeon, 1998; Yun et al., 1999; Pöggeler, 2001; Debuchy y Turgeon, 2006).

Explorar los genes *mating type* dentro de los agentes causales del CT y la PSC podría ayudar a comprender la dinámica de la enfermedad o sumar nuevas herramientas para descifrar el patosistema.

En el ámbito de las especies de *Diaporthe* que afectan al girasol, la caracterización se realiza mediante la evaluación de variables moleculares y se complementa con morfología. Dicha aproximación se adoptó en diversas investigaciones, como lo demuestran los estudios de Mathew et al. (2011), Thompson et al. (2011), Markell et al. (2015), Mathew et al. (2015b), Thompson et al. (2015) y Olson (2017). Este enfoque integrado, que abarca tanto aspectos morfológicos como moleculares, constituye una estrategia robusta para la caracterización de múltiples especies de *Diaporthe* relacionadas con el CT y la PSC del girasol en distintos contextos de investigación.

El objetivo específico del estudio comprendido en este capítulo fue caracterizar morfológica y molecularmente (evaluación filogenética de múltiples locus) aislamientos de *Diaporthe* que causan CT y PSC en girasoles de la región semiárida pampeana.

Materiales y Métodos

Relevamiento de cancro del tallo y podredumbre seca del capítulo

Durante las campañas 2019/2020, 2020/2021 y 2021/2022 se realizaron expediciones a lotes comerciales de cultivo de girasol (*Helianthus annuus L.*) en el noreste de La Pampa y oeste de Buenos Aires. Se eligieron de forma aleatoria lotes comerciales separados entre sí por una distancia no menor a 5 km. En cada uno de ellos se recolectaron ejemplares con síntomas de cancro del tallo y de podredumbre seca del capítulo con el objetivo de obtener aislamientos del agente causal. Se estableció la referencia geográfica para cada uno de los lotes muestreados (Figura N° 4).

Se evaluó la prevalencia (n° de lotes con enfermedad/n° de lotes totales) de las enfermedades considerando únicamente CT, exclusivamente PSC, coexistencia de CT y PSC en el mismo lote y prevalencia total. Asimismo, se determinó la incidencia (n° de plantas enfermas/n° de plantas totales) de CT y de la PSC tanto en la provincia de La

Pampa como en el oeste de la provincia de Buenos Aires; además se calculó la incidencia promedio para ambas enfermedades reuniendo los datos de toda la zona bajo estudio.

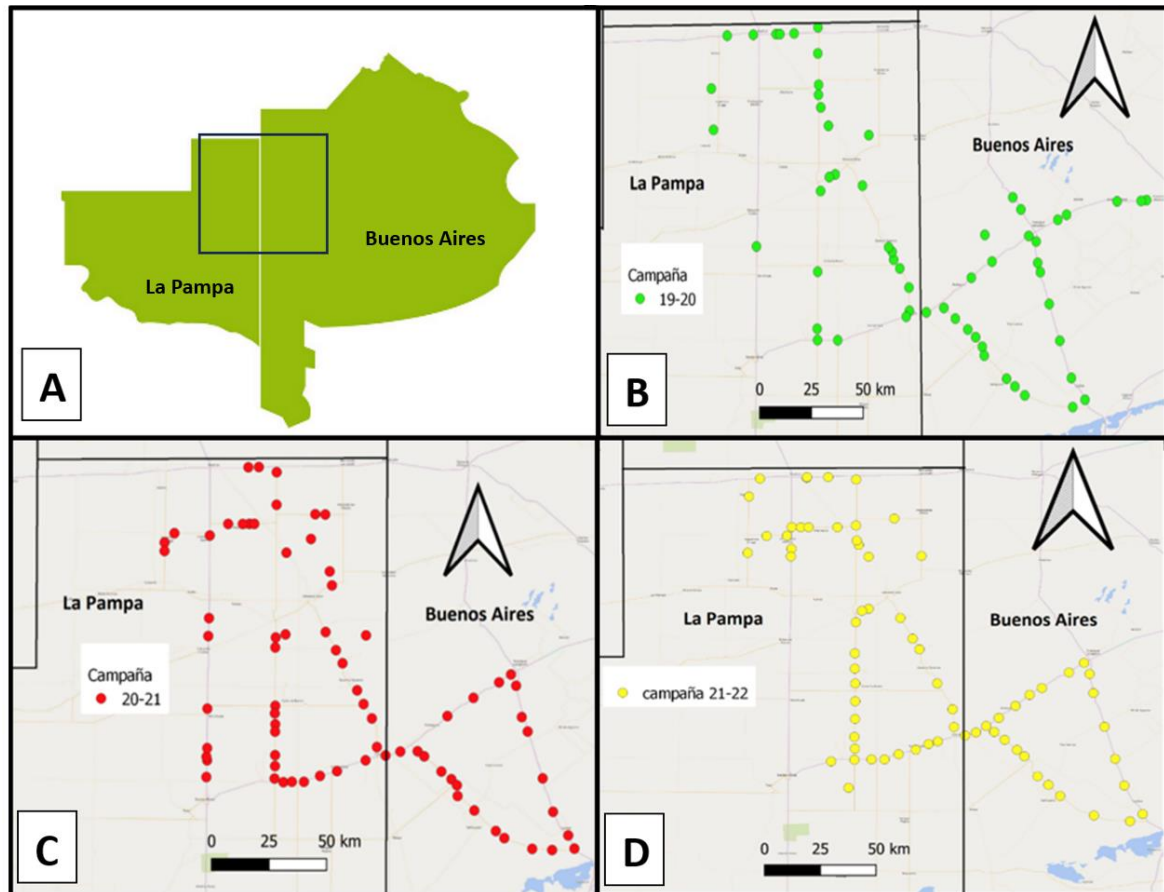


Figura N° 4. Esquema de los recorridos realizados para relevar lotes de girasol y obtener muestras de plantas con síntomas para CT y PSC. A. Región de muestreo comprendida entre noreste de La Pampa y oeste de Buenos Aires. B. Lotes relevados en la campaña 2019/2020. C. Lotes relevados en la campaña 2020/2021. D. Lotes relevados en la campaña 2021/2022.

Recolección de material sintomático y aislamiento de *Diaporthe* spp.

Para la obtención de aislamientos, se lavaron las porciones de tallos con agua y detergente, y se los esterilizó superficialmente sumergiéndolos en alcohol 70 % v/v

durante 30 segundos, seguidos de un minuto de inmersión en solución de NaOCl 10 % v/v (0.6 % v/v cloro activo). El material desinfectado se secó y se cortó longitudinalmente con un machete previamente flameado. En el caso de los capítulos se extrajo tejido sintomático, y se aplicó el mismo proceso de lavado y desinfección. Bajo lupa, 5 pequeños fragmentos del borde sano-enfermo de la médula y de la corteza de los tallos o los capítulos, se colocaron asépticamente en medio de cultivo fresco (Agar-agua).

Los cultivos primarios se incubaron a 25 °C, bajo ciclos alternos de luz UV (345-400nm) /oscuridad durante tres días, se repicaron a medio de cultivo fresco, agar papa glucosado (APG, Apéndice I) y se incubaron bajo las condiciones descritas anteriormente durante 15 días a fin de obtener cultivos puros. Se examinaron las características culturales de los aislamientos. Se observaron los cultivos bajo microscopio estereoscópico (Olympus modelo SZ61) y se realizaron preparados entre porta y cubreobjetos (líquido de montaje: ácido láctico 85 % p/p). La observación microscópica se realizó con un equipo Olympus modelo CX41RF (aumentos totales 100X, 400X y 1000X).

Conservación de aislamientos

Se evaluaron métodos clásicos de conservación: picos de flauta a temperatura ambiente y a 4 °C usando en ambos casos APG como medio de cultivo, fragmentos de cultivos en microtubos de 2 mL a 4 °C, liofilización de cultivos siguiendo el protocolo de Palomar et al. (2015), conservación de fragmentos de cultivos con vaselina en microtubos de 2 mL a temperatura ambiente como lo indica French y Hebert (1980). Los métodos de conservación mencionados se evaluaron a través del análisis de viabilidad del material fúngico considerando diferentes tiempos: 7 d, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años y 3 años.

Se estableció un cepario para lo que se asignó un código de identificación único a cada aislamiento basado en sus características distintivas. Ejemplo ilustrativo, en el código SR-C-20-1-1.

SR: Se refiere al origen geográfico del tejido que dio lugar al aislamiento (Tabla N° 3).

C: el segundo término indica el órgano de la planta desde donde se aisló (T: tallo, C: capítulo).

El primer número “20” se refiere al año de realización del aislamiento. El segundo número indica el número de muestra, y el último número se refiere a la/s estructura/s reproductivas que desarrolló la colonia in vitro (Tabla N° 4). Entonces, para el ejemplo citado, el aislamiento es originario de Santa Rosa, fue aislado de capítulo en el año 2020 de la muestra 1 de esa ubicación y produce solo beta conidios.

Tabla N° 3. Detalle de las localidades próximas a los sitios de recolección de las muestras de girasol utilizadas en este estudio, con las siglas asignadas en la codificación del aislamiento.

Siglas	Origen geográfico
A	Agustoni
AN	Anguil
AT	Alta Italia
B	Bocayuva
C	Catriló
CB	Casbas
CE	Miguel Cané
CS	Ceballos
D	Dorila
GR	Garré
L	Ingeniero Luiggi
M	Maisonave
ML	Mari Lauquen
MS	Villa Mirasol
MO	Metileo
O	Ojeda
P	General Pico
PL	Pellegrini
Q	Quemú Quemú
QM	Quenumá
R	Realicó
S	Saliquelló

Tabla N° 3. Continuación

SR	Santa Rosa
T	Trili
TL	Trenque Lauquen
U	Uriburu
V	Vidania
VP	Adolfo Van Praet
VZ	Vértiz

Tabla N° 4. Estructuras reproductivas presentes en el crecimiento in vitro de las colonias obtenidas en el medio APG y el número asignado en la codificación del aislamiento.

Número	Estructura Reproductiva
1	Solo beta conidios
2	Solo alfa conidios
3	Alfa y beta conidios
4	Solo ascosporas
5	Ascosporas y alfa conidios
6	Ascosporas y beta conidios
7	Ascosporas, alfa y beta conidios

Estudio morfológico

Se realizó la identificación de los aislamientos considerando los trabajos de Hanlin (1990), Thompson et al. (2011), Santos et al. (2011), Gomes et al. (2013) y Hernández et al. (2015).

Se describió el tipo de colonia, color y aspecto (como se disponen las hifas, desarrollo aéreo, adhesión al medio de cultivo) sobre APG con tallo de trigo (Thompson et al., 2011), presencia o ausencia de estromas, como así también características micromorfométricas de picnidios, células conidiógenas, conidios, ascomas periteciales, ascos y ascosporas.

Las estructuras fúngicas asexuales (picnidios, células conidiógenas y conidios) se examinaron luego de 15 días de incubación.

Estudio del teleomorfo

Para obtener las estructuras reproductivas sexuales, se eligieron cinco aislamientos basándose en la información de los genes *mating type* (aislamientos que exhibieron resultados positivos en la PCR para los marcadores MAT 1-1-1 y MAT 1-2-1). Estos aislamientos se cultivaron en cuatro medios de cultivo diferentes: Agar-agua (AA), Agar avena (OA), APG y Agar Extracto de Malta (MEA) (Apéndice I) en combinación con tallos de soja, girasol y trigo. Los cultivos se incubaron a 20 °C, bajo ciclos de alternos de luz UV (345-400 nm) / oscuridad durante 50 días. Los ascomas periteciales conteniendo ascos y ascosporas, se examinaron bajo lupa y microscopio.

Caracterización molecular

La extracción de ADN se realizó a partir de 150/200 mg de micelio raspado meticulosamente con un bisturí de cultivos en APG, incubadas durante 10 días a 25 °C. Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Dellaporta et al. (1983).

El micelio se trituró con un micropilón descartable (Tissue Grinders) y se incubó (15 min a 65 °C) en 700 µL de *buffer* de extracción (SDS 1 % p/v, NaCl 100 mM, EDTA pH 8 50 mM, Tris-HCl pH 8 200 mM y β-mercaptoetanol 10 mM).

Se agregaron 250 µL acetato de potasio 5 M, la mezcla se agitó suavemente y se incubó en hielo 20 min. Se centrifugó 20 min a 12000 rpm (4 °C). Se extrajo el sobrenadante (700 µL aprox), se agregó igual volumen de isopropanol y se mezcló suavemente. Se centrifugó (10 min., 12000 rpm). Se lavó 2 veces con etanol 70 % v/v (5 min., 12000 rpm), y se secó el *pellet* obtenido. El material resultante se resuspendió en 100 µL de agua, se le agregaron 5 µL de ARNasa y se incubó 30 min a 37 °C. El producto final se conservó a -20 °C para su uso posterior.

El ADN extraído se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % p/v teñidos con Nucleic Acid Stain (DSView™, China), para chequear su integridad. Se midió la concentración y la calidad de ADN extraído para cada aislamiento mediante la utilización de Nanodrop.

La PCR se desarrolló en un volumen de final de 25 µl (1X *buffer* de PCR, PB-L, Argentina; dNTP 0,2 mM; 0,4 µM de cada primer; MgCl₂ 1,5 mM; 0,8 unidades de polimerasa Taq) (Udayanga et al., 2012). Se amplificaron los marcadores moleculares ITS (White et al., 1990), EF1-α (Carbone and Kohn, 1999), TUB (Glass and Donaldson, 1995), (secuencias en Tabla N° 5) a partir 30 ng del ADN previamente extraído de cada uno los aislamientos de *Diaporthe* sp. Se utilizaron diferentes parámetros de ciclado, de acuerdo con el marcador a amplificar (Udayanga et al., 2012). El análisis de ITS comprendió la desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 50 s, extensión a 72 °C durante 1 min y extensión final a 72 °C durante 10 min. En relación con EF1-α y TUB, se realizó desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 58 °C durante 50 s, extensión a 72 °C durante 1 min y extensión final a 72 °C durante 10 min. Los amplicones se sometieron a electroforesis simultánea en geles de agarosa al 1,5 % p/v teñidos con Nucleic Acid Stain (DSView™, China), con un marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (PB-L, Argentina). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (100 V) durante 50 min, las bandas se visualizaron en el sistema de imágenes diseñado para tal fin.

Tabla N° 5. Secuencias de los cebadores o *primers* correspondientes a los marcadores moleculares amplificados.

Nombre	Secuencia 5' a 3'
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
β-tubulinBt2aF	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
β-tubulinBt2bR	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC

Los amplicones obtenidos en PCR se purificaron con el producto comercial EXOSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), que consta de las enzimas exonucleasas I y fosfatasa alcalina de camarón (SAP), a fin de eliminar los cebadores y nucleótidos sin hibridar evitando generar pérdidas de muestra. La enzima exonucleasa I degrada los cebadores residuales y cualquier ADN de cadena única, mientras que SAP hidroliza los dNTPs remanentes de la mezcla de PCR.

Se secuenció el ADN de las muestras seleccionadas utilizando los mismos pares de cebadores. Todas las secuencias generadas en este estudio se depositaron en la base de datos *GenBank* en el repositorio del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Se editaron las secuencias *forward* y *reverse* y se alinearon utilizando Bioedit (Hall, 1999). Se analizaron, previamente a la reconstrucción filogenética, diferentes características de los alineamientos de cada uno de los genes individuales y del concatenado usando DnaSP (DNA Sequence Polymorphism, v 6.12.03) (Rozas et al., 2017). El análisis incluyó el número de sitios considerados, número de sitios segregantes, número de haplotipos, número de diferencias entre pares de haplotipos (kh), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (Pi).

El análisis de similitud de las secuencias se realizó utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLASTN) en el Base de datos de nucleótidos (NR)

GenBank (NCBI). A fin de concretar la reconstrucción filogenética se seleccionaron, entre las secuencias contenidas en la mencionada base de datos, aquellas que presentaron identidad mayor al 95 % y valor p inferior a $1e-10$ respecto de las secuencias obtenidas en el presente trabajo.

La reconstrucción filogenética de árboles de genes individuales y concatenados se estimó usando el software RAxML (Kozlov et al., 2019) agregando las secuencias disponibles en *GenBank*. Los modelos evolutivos para los análisis filogenéticos se seleccionaron de forma independiente para cada locus utilizando MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) bajo el criterio de información de Akaike (AIC).

El marcador ITS se analizó con el software RAxML y el modelo super-Yang-Mills (SYM) (Movshev and Schwarz, 2004) de sustitución de nucleótidos con las opciones adicionales de modelado de tasa de heterogeneidad (T) y proporción de sitios invariables (I). Los genes EF1- α y TUB, se analizaron a través del modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa et al., 1985) con la adición de T e I. En el caso de árboles de genes concatenados se eligió el modelo “General Time Reversible” (GTR) (Nei & Kumar, 2000) de sustitución de nucleótidos con T e I. La historia evolutiva de los taxones se representó por los árboles que alcanzaron la máxima probabilidad. Los *bootstraps* se calcularon como porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba soporte (1000 réplicas). Las ramas correspondientes a las particiones reproducidas en menos del 50 % de las réplicas se colapsaron (Felsenstein 1985), usando el software online iTOL v.5 (Letunic and Bork 2021).

Tanto las secuencias ITS, TUB y EF1- α obtenidas en este estudio (Tabla N° 7) como las descargadas de *GenBank* se concatenaron *in silico* para generar una única matriz. Se realizó el análisis de los concatenados con la misma metodología utilizada para los marcadores individuales. Para el enraizamiento, se utilizó *Valsa ambiens* (Pers.) Fr.

(sinónimo *Cytospora populina* [Pers.] Rabenh.) como grupo externo para todos los árboles.

En el presente estudio, se llevó a cabo el análisis de la diversidad interespecífica que comprendió los alineamientos de todos los marcadores (ITS, EF1- α y TUB), utilizando el software MEGA v. 11 (Tamura, Stecher y Kumar, 2021). Además, mediante el empleo de esta herramienta, se exploró la diversidad intraespecífica en el conjunto de secuencias alineadas representantes de cada especie de *Diaporthe* incluida en el análisis filogenético, para cada uno de los marcadores evaluados.

Mating type

Se amplificaron las regiones MAT1-1-1 y MAT 1-2-1 (Santos et al., 2010) (secuencias en Tabla N° 6) a partir del ADN previamente extraído de 139 aislamientos de *Diaporthe* sp.

Los parámetros del ciclado de PCR incluyeron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 50 °C (56 °C para el MAT 1-2-1) durante 30 s, extensión a 72 °C durante 1 min y la extensión final a 72 °C durante 10 min (Udayanga et al., 2012).

Los amplicones se sometieron a electroforesis simultánea, en geles de agarosa al 1,5 % p/v teñidos con Nucleic Acid Stain (DSView™, China), con un marcador de peso molecular de ADN de 25 pb (PB-L, Argentina). La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (100 V) durante 50 min, las bandas se visualizaron en el sistema de imágenes diseñado para tal fin.

Tabla N° 6. Secuencias de los cebadores o *primers* correspondientes a los marcadores moleculares amplificados

Nombre	Secuencia 5' a 3'
MAT1-1-1FW	GCA AMI GTK TIK ACT CAC A
MAT1-1-1RV	GTC TMT GAC CAR GAC CAT G
MAT1-2-1FW	GCC CKC CYA AYC CAT TCA TC
MAT1-2-1RV	TTG ACY TCA GAA GAC TTG CGT G

Para la purificación de los productos de la PCR, se utilizó el reactivo de limpieza EXOSAP-IT (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

Se secuenció el ADN de las muestras seleccionadas utilizando los mismos pares de cebadores. Todas las secuencias generadas en este estudio se depositaron en la base de datos *GenBank* en el repositorio del NCBI.

Se editaron las secuencias *foward* y *reverse* y se alinearon utilizando Bioedit (Hall, 1999). El análisis de similitud de las secuencias se realizó de la misma manera que para el resto de los marcadores estudiados.

La reconstrucción filogenética de árboles del locus MAT 1-1-1 se estimó usando el software MEGA v. 11 (Tamura, Stecher y Kumar, 2021) agregando las secuencias disponibles en *GenBank*. El modelo evolutivo para el análisis filogenético se seleccionó utilizando MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) bajo el criterio de información de Akaike (AIC). Se eligió el modelo GTR (Nei & Kumar, 2000). La historia evolutiva de los taxones se representó por los árboles que alcanzaron la máxima probabilidad. Los *bootstraps* se calcularon como porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba soporte (1000 réplicas).

Resultados

Relevamiento de cancro del tallo y podredumbre seca del capítulo

En la campaña agrícola 2019/2020 se relevaron 63 lotes comerciales de girasol. Durante la campaña 2020/2021 se examinaron 75 lotes comerciales de girasol y en la campaña 2021/2022 se relevaron 70 lotes comerciales de girasol.

En la campaña 2019/2020, el cancro del tallo se identificó exclusivamente en el 32,2 % de los lotes, la podredumbre seca del capítulo se manifestó solo en el 23,7 % de los casos, mientras que ambas enfermedades coexistieron en el 13,6 % de los lotes. Se observó una prevalencia total del 69,5 %. En la provincia de La Pampa, la incidencia promedio de cancro del tallo fue del 0,98 %, mientras que para la podredumbre seca del capítulo fue del 0,22 %. En la provincia de Buenos Aires, la incidencia promedio de cancro del tallo fue del 0,7 %, mientras que para la podredumbre seca del capítulo fue del 3 %. La incidencia promedio de cancro del tallo en la zona bajo estudio fue de 0,9 % mientras que para podredumbre seca del capítulo fue de 1,8 %.

Durante la campaña 2020/2021 se detectó únicamente CT en el 5,4 % de los lotes, solo PSC se observó en el 27,3 % de los casos, mientras que se encontró presente ambas situaciones en el 46 % de los lotes. A su vez, la prevalencia total aumentó a 78,4 %. La incidencia promedio de CT para los lotes evaluados en la provincia de La Pampa fue de 0,7 % mientras que para PSC fue de 1,2 %. En la provincia de Buenos Aires, la incidencia promedio de CT fue del 1,1 %, mientras que para la PSC fue del 11,1 %. La incidencia promedio de CT en la región fue de 0,7 % mientras que para PSC fue de 4,3 %.

En la campaña 2021/2022, el CT fue encontrado exclusivamente en el 28,6 % de los lotes, la PSC se observó solo en el 5,7 % de los casos, mientras que ambas enfermedades estuvieron presentes en el 65,7 % de los lotes. Se observó una

prevalencia del 100 %, encontrándose presente alguna de las dos enfermedades en todos los casos estudiados. En la provincia de La Pampa, la incidencia promedio de CT fue del 6,6 %, mientras que para la PSC fue del 1,1 %. En la provincia de Buenos Aires, la incidencia promedio de CT fue del 8,2 %, mientras que para la PSC fue del 1,3 %. La incidencia promedio de CT en la zona bajo estudio fue de 7,2 % mientras que para la PSC fue de 1,2 %.

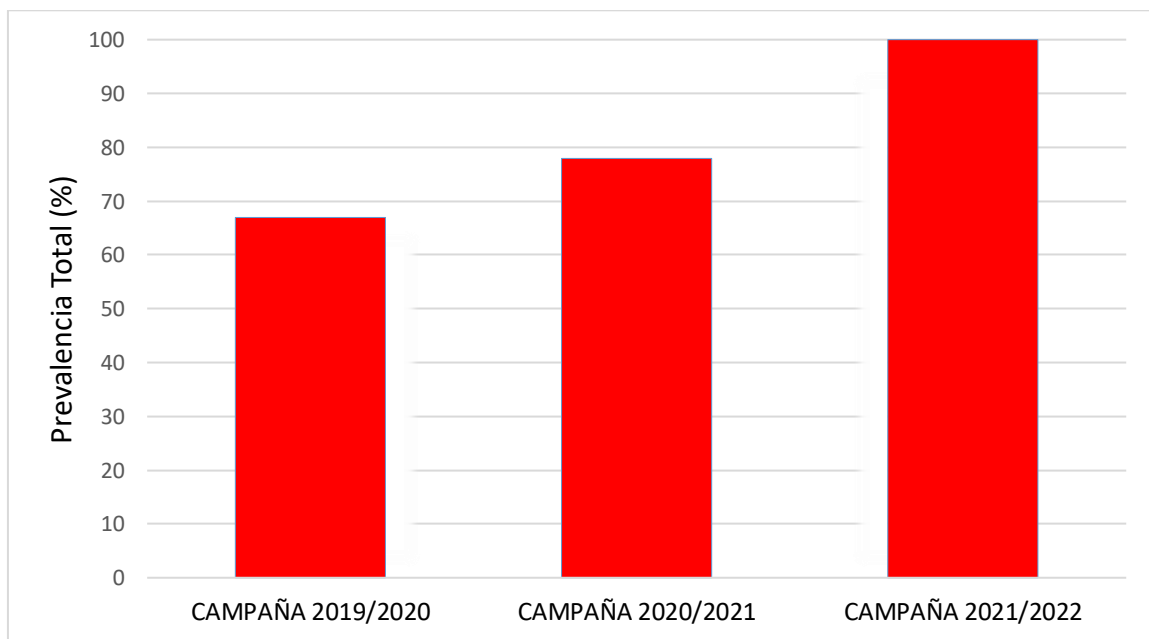


Figura N° 5. Prevalencia de *D. helianthi* durante tres campañas.

En la Figura N° 5 se ilustra la variación de la prevalencia con el transcurso del tiempo en la región de muestreo de CT y PSC. Se evidencia un incremento en la prevalencia a medida que se evalúan las distintas campañas.

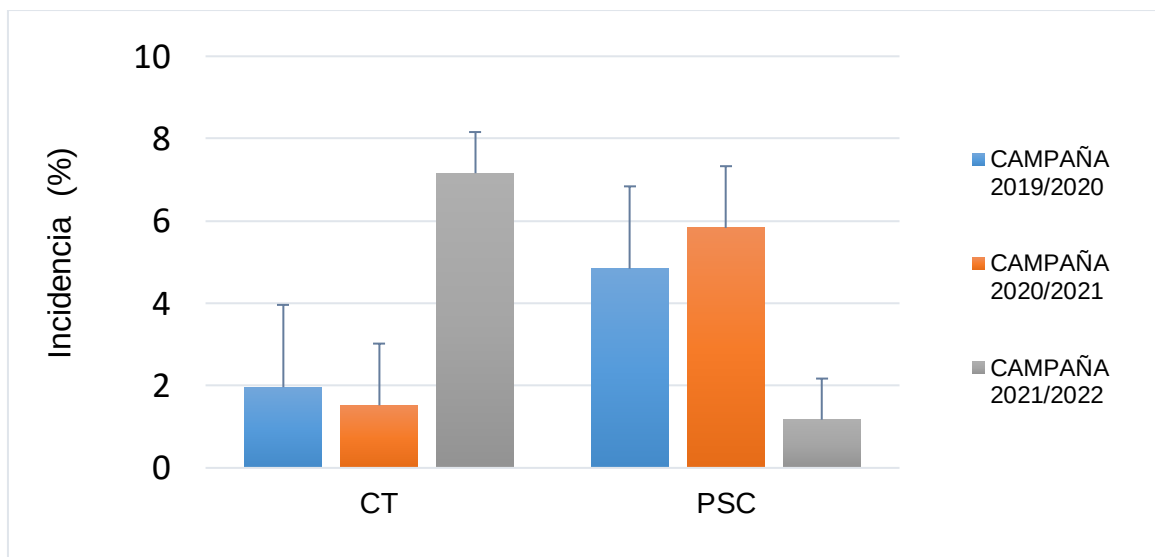


Figura N° 6. Incidencia promedio de cancro del tallo (CT) y podredumbre seca de capítulo (PSC) en la zona bajo estudio a través de las campañas.

En la Figura N° 6 se presenta la incidencia promedio de CT y PSC a lo largo de las distintas campañas en la zona de estudio. Se destaca que durante las campañas 2019/2020 y 2020/2021, la incidencia promedio de PSC superó notablemente a la de CT. Sin embargo, esta tendencia se invirtió por completo en la campaña 2021/2022.



Figura N° 7. Prevalencia de las enfermedades en la zona de estudio.

En la Figura N° 7, se representa la proporción de lotes en cada campaña, evidenciando la presencia de CT, PSC, ambas enfermedades simultáneamente en un mismo lote, o la ausencia de enfermedad. Se observa que a medida que la prevalencia aumenta a lo largo de las campañas, la cantidad de lotes sin enfermedad disminuye hasta llegar a cero en la campaña 2021/2022. Es destacable que en todas las campañas se detectaron cultivos donde ambas enfermedades coexistieron en el mismo lote.

Recolección de material sintomático y aislamiento de *Diaporthe* spp.

En la campaña agrícola 2019/2020 se obtuvieron 165 aislamientos y en la campaña 2020/2021 se lograron 228 aislamientos puros de *Diaporthe* spp.

Entre los 393 aislamientos totales de *Diaporthe* spp., el 53 % se obtuvo de capítulos y el 47 % de tallos. En todos los casos, para ambas enfermedades, el agente causal que predominó fue *D. helianthi*.

Conservación de aislamientos

Entre los métodos evaluados, la conservación de fragmentos de cultivos en microtubos de 2 mL a 4 °C y la conservación en picos de flauta a 4 °C usando APG como medio de cultivo resultaron los más eficaces. Los fragmentos de cultivos se mantuvieron viables incluso después de 3 años de conservación. En cambio, los cultivos en picos de flauta a temperatura ambiente perdieron viabilidad luego de 6 meses. Mientras que, los fragmentos conservados en tubos con vaselina a temperatura ambiente y los cultivos liofilizados manifestaron pérdida completa de viabilidad en el primer examen (7 días).

Estudio morfológico

El estudio morfológico de los aislamientos permitió determinar a la mayoría de los aislamientos como *D. helianthi*; se destacó la presencia significativa de esta especie. Además, se detectó la presencia de *D. ambigua*, aunque su representación fue limitada a un solo aislamiento obtenido desde tallos sintomáticos.

Diaporthe helianthi Munt.-Cvetk., Mihaljč. & M. Petrov, Nova Hedwigia 34(3 & 4): 433 (1981).

Colonias en APG, granulares adpresas, micelio aéreo blanquecino escaso, reverso pálido blanquecino con estromas pardos a negros (Figuras N° 8 y 9). Conidiomas presentes sobre el sustrato y sobre los tallos de trigo, picnidios, 430-620 x 410-520 µm con cirro amarillento, la mayoría solitarios, también agrupados. Conidióforos simples compuestos por una célula basal globosa y una célula conidiógena. Células conidiógenas aciculares hialinas, 9-13 x 1,0-1,6 µm. Beta conidios filiformes sigmoideos falcados o curvos, unicelulares, hialinos, 1,0 x 20-30 µm (Figura N° 10). Alfa conidios no observados. Ascomas periteciales y ascosporas ausentes en todos los aislamientos durante el período de incubación (30 d).

Estudio del teleomorfo

Se seleccionaron aleatoriamente los aislamientos 110, 212, 295, 339 y 375, garantizando únicamente su positividad para ambos genes *mating type*. Tras un período de 50 días, las estructuras reproductivas sexuales solamente se observaron sobre tallos vegetales depositados sobre los medios agarizados. La presencia de ascomas periteciales sobre tallos de soja se evidenció de manera consistente en todos los casos

cuando se utilizó el medio OA, destacándose especialmente los aislamientos 295 y 339, los cuales exhibieron más de 10 ascomas periteciales en cada instancia.

Adicionalmente, se observaron varios ascomas periteciales en tallos de girasol para los aislamientos 110, 212, 339 y 375, así como en tallos de trigo para los aislamientos 212 y 339, al utilizar OA como medio agarizado. En cambio, al emplear el medio AA, solo se registraron dos ascomas periteciales en el tallo de girasol para el aislamiento 212. En el caso del medio APG, se observó un único ascoma peritecial en el tallo de girasol para el aislamiento 375. Por último, en el medio MEA, se identificaron ascomas periteciales exclusivamente en los tallos de girasol para el aislamiento 212 y en los tallos de soja para el aislamiento 295.

Es relevante resaltar que los resultados más sobresalientes se alcanzaron en los tallos de soja cuando se utilizó el medio OA. Es importante tener en cuenta que este estudio se replicó en tres ocasiones, y solo en la primera se logró la presencia de ascomas periteciales.

Los ascomas periteciales sobre tallos de soja se observaron con base globosa (200-300 μm) y cuello evidente (320-610 x 62-75 μm) (Figura N° 11). Ascosporas de 12-14 x 3-4 μm .

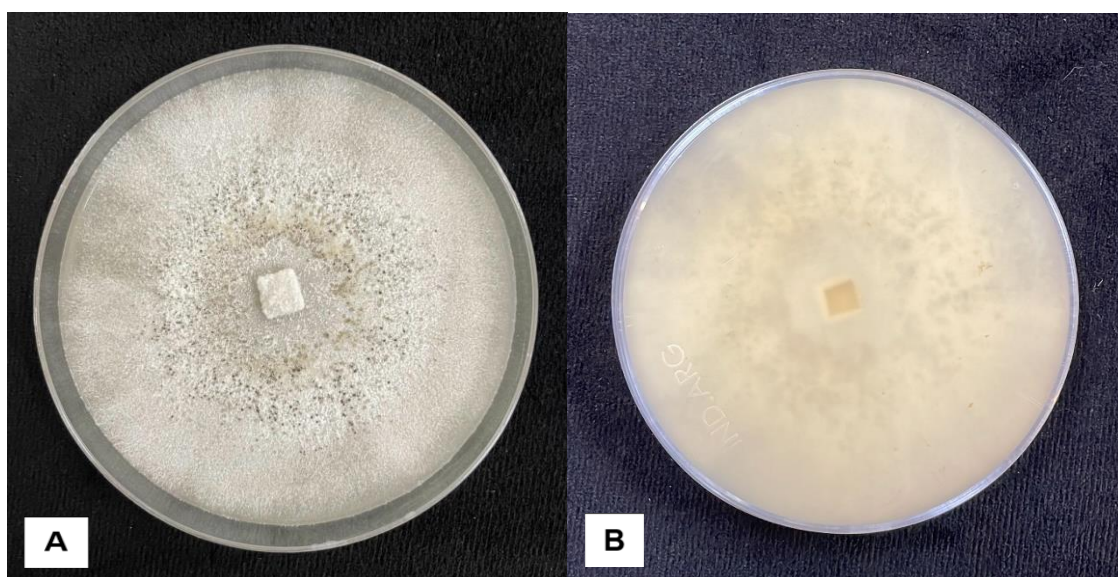


Figura N° 8. Colonia de *D. helianthi*, APG 25 °C, 10 d de incubación. A. Anverso B. Reverso (fotos propias, D. N. Colombo).

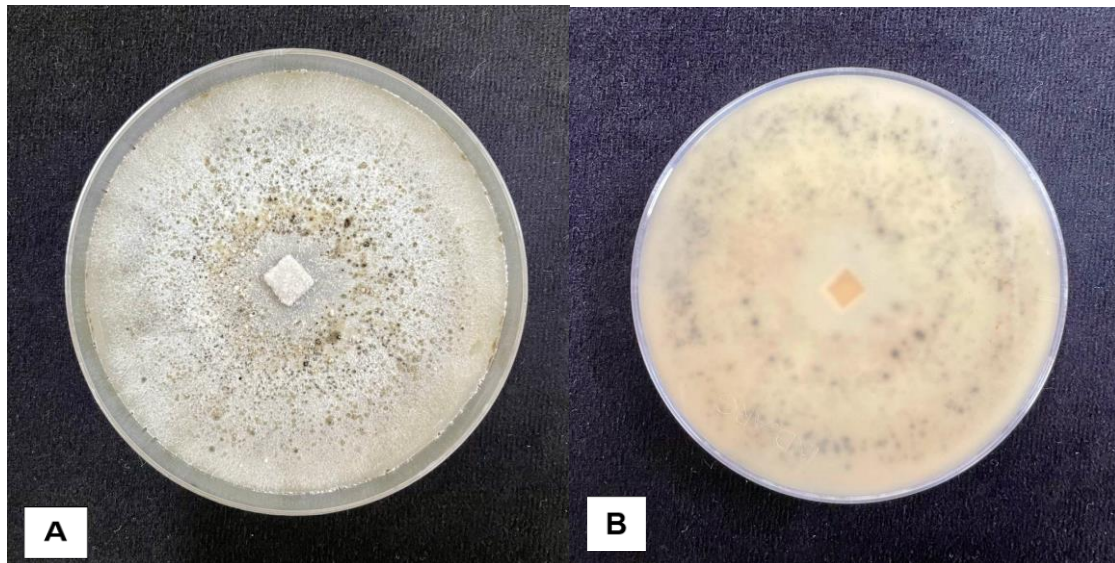


Figura N° 9. Colonia de *D. helianthi*, APG 25 °C, 20 d de incubación (notar presencia de estromas en el reverso). A. Anverso B. Reverso (fotos propias, D. N. Colombo).

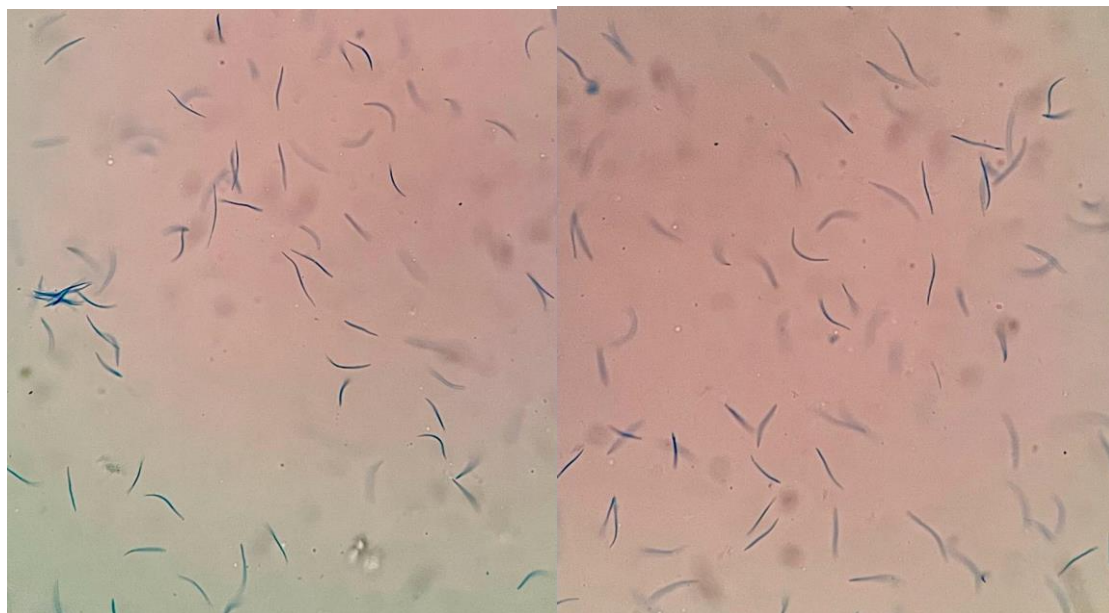


Figura N° 10. *D. helianthi*. Conidios beta 400X (fotos propias, D. N. Colombo).



Figura N° 11. *D. helianthi*. Ascomas periteciales, APG tallo de soja, 25 °C, 40 d, microscopio estereoscópico 100X (notar base y cuello) (fotos propias, D. N. Colombo).

Diaporthe ambigua Nitschke, Pyrenomyc. Germ. 2: 311 (1870).

Colonias en APG, flocosas, con penachos de micelio pardo grisáceos, blanquecinos con centro grisáceo; reverso pálido amarillento, con parches estromáticos oscuros. Micelio que consiste en una densa capa de color blanco sucio a crema que sostiene mechones de hifas flocosas. Estructuras reproductivas principalmente sobre el fragmento de tallo de soja, teleomorfo exclusivamente sobre éste luego de 40 días de incubación (Figura N° 13). Picnidios, globosos, solitarios o en grupos. Conidióforos simples, compuestos por una célula basal globosa y una célula conidiógena integrada. Fiálides aciculares 10-15 x 1,0-1,5 µm, hialinas. Conidios alfa, unicelulares, cilíndricos, con tenue constricción central y dos gútulas notorias, ápice obtuso y base papilada, con paredes lisas, 6-7 x 2-3 µm, hialinos (Figura N° 12A). Conidios beta no observados. Ascomas periteciales globosos, solitarios, de cuello largo. Ascus unitunicados, cilíndricos a clavados con anillo apical refractivo, 8 esporas, 42-46 x 6-7 µm (Figura N° 12B). Paráfisis no ramificadas, tabicadas, presentando constricciones en los tabiques, estrechándose hacia el ápice con una punta redondeada, extendiéndose por encima de los ascos. Ascosporas bicelulares, hialinas, lisas, de 11-13 x 2-3 µm con cuatro gútulas.

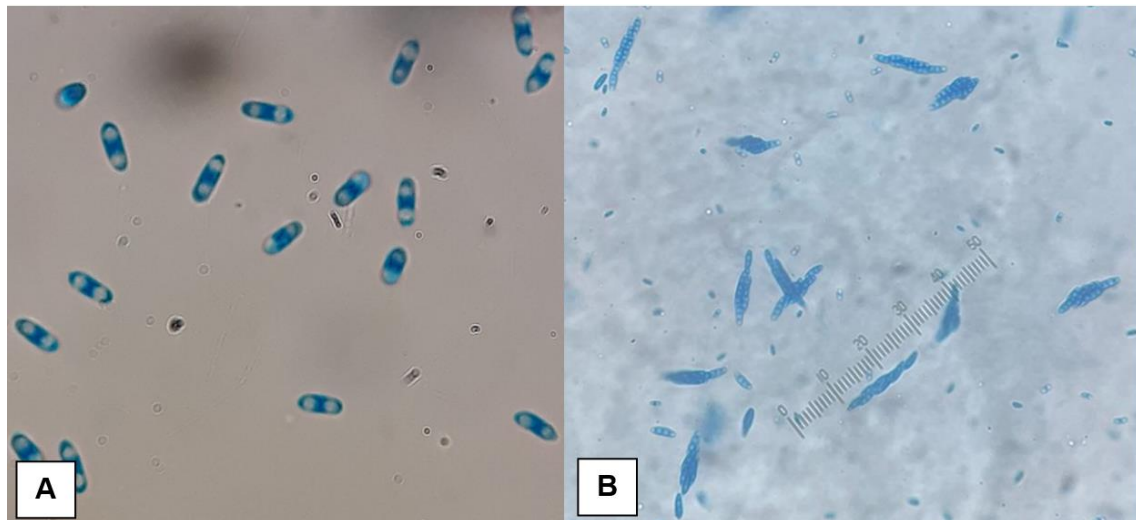


Figura N° 12. A. *D. ambigua*. Conidios alfa, 1000X B. Conidios alfa junto a ascos conteniendo ocho ascosporas, 400X (fotos propias, D. N. Colombo).



Figura N° 13. *D. ambigua*. Detalle de los cuellos de ascomas periteciales sobre tallo de soja, microscopio estereoscópico 100X (foto propia, D. N. Colombo).

Caracterización molecular

Se extrajo ADN de todos los aislamientos obtenidos. La longitud de los fragmentos amplificados fue de aproximadamente 600 pb en el caso de ITS, 400 pb en EF1- α y 500 pb para TUB.

Los productos de PCR se secuenciaron usando tecnología Sanger (*Applied Biosciences*) y se obtuvieron 65 secuencias de ITS, 70 secuencias de EF1- α y 61 secuencias de TUB.

El largo de las secuencias procesadas fue de 524 pb para el marcador ITS, 488 pb para el marcador TUB y 324 pb para el marcador EF1- α . Estos fragmentos resultaron de un riguroso procesamiento de las secuencias, durante el cual se removieron los extremos que no cumplían con los estándares mínimos de calidad *Phred* establecidos en 30 para la secuenciación Sanger (Ramsden et al., 2016).

En la Tabla N° 7 se detallan los números de acceso de las secuencias relacionadas con el presente trabajo, depositadas en la base de datos GenBank en el repositorio del NCBI.

Tabla N° 7. Detalle del número de acceso de las secuencias resultantes en este estudio depositadas en Genbank.

Especie de <i>Diaporthe</i>	Hospedante	Nombre	Acceso de <i>GenBank</i>		
			ITS	TUB	EF1- α
<i>D. helianthi</i>	<i>H. annuus</i>	Iso1	ON093173 a ON093180; ON099458 a ON099486; ON099488 a ON099514	OP093798 a OP093857	ON146019, ON1460440, ON146053, ON146054, ON146055, ON146056
		Iso2			ON145995 a ON146018; ON146020 a ON146033; ON146035 a ON1460439; ON1460441 a ON146052; ON146057 a ON146064
<i>D. ambigua</i>		Iso209	ON099487	OP093858	ON146034

Dichas secuencias (Iso1, Iso2 y Iso209) se utilizaron para el análisis de similitud usando BLASTN contra la base de datos NR de *GenBank*. Aquellas que alcanzaron un porcentaje de identidad superior al 95 % con respecto a *D. helianthi* se descargaron para estudios filogenéticos. Este conjunto de datos se amplió mediante la inclusión de secuencias correspondientes a otros agentes causales previamente reportados para el complejo de enfermedades CT y PSC, tal como se detalla en la Tabla N° 8.

Tabla N° 8. Detalle de accesiones descargadas desde la base de datos *Genbank* y utilizadas en el análisis filogenético.

Especie de <i>Diaporthe</i>	Hospedante	Colección	Nombre	Acceso de <i>GenBank</i>		
				ITS	TUB	EF1- α
<i>D. ambigua</i>		CBS 114015	Diaporthe_ambigua1	NR_119434	KC343978	GQ250299
		CBS 187.87	Diaporthe_ambigua2	KC343015	KC343983	KC343741
<i>D. caulivora</i>	<i>G. max</i>	17-DIA-016	Diaporthe_caulivora1	MK942652	MK941318	MK941273
		17-DIA-085	Diaporthe_caulivora2	MK942655	MK941316	MK941274
		16-DIA-068	Diaporthe_caulivora3	MK942656	MK941317	MK941275
		17-DIA-033	Diaporthe_caulivora4	MK942654	MK941314	MK941277
		17-DIA-066	Diaporthe_caulivora5	MK942657	MK941315	MK941278
	<i>H. annuus</i>	Isolate 3	Diaporthe_caulivora6	MT636145	MT636156	MT636151
<i>D. endophytica</i>	<i>G. max</i>	CBS 133811	Diaporthe_endophytic a1	KC343065	KC344033	KC343791
		LGMF948	Diaporthe_endophytic a2	KC343072	KC344040	KC343798
<i>D. gulyae</i>	<i>H. annuus</i>	Isolate 5a	Diaporthe_gulyae1	MK105835	MT636158	MK110012
		Isolate 5b	Diaporthe_gulyae2	MK105836	MT636159	MK110013
		MFLUCC 17-1026	Diaporthe_gulyae3	KY964223	KY964107	KY964179
		MF-Ha17-042	Diaporthe_gulyae4	MK024252	MK033488	MK039420
		MF-Ha17-043	Diaporthe_gulyae5	MK024253	MK033489	MK039421

Especie de <i>Diaporthe</i>	Hospedante	Colección	Nombre	Acceso de <i>GenBank</i>		
				ITS	TUB	EF1- α
<i>D. helianthi</i>	<i>H. annuus</i>	Isolate 4	Diaporthe_helianthi1	MK105837	MT636157	MK110014
		CBS 344.94	Diaporthe_helianthi2	KC343114	KC344082	KC343840
		CBS 592.81	Diaporthe_helianthi3	AY705842	KC344083	KC343841
		Strain 76782-5	Diaporthe_helianthi4	KU315382	KU315383	–
		R_P131	Diaporthe_helianthi5	KM230832	–	KM230858
		MF-DS1	Diaporthe_helianthi6	MW008485	MW008496	MW008507
<i>D. kongii</i>	<i>H. annuus</i>	17-DIA-077	Diaporthe_kongii1	MK942659	MK941320	MK941280
		Isolate 1	Diaporthe_kongii2	MT636148	MT636154	MT636149
<i>D. longicolla</i>	<i>G. max</i>	LDSG3-2	Diaporthe_longicolla1	MN960195	MN974482	MN974483
		17-DIA-128	Diaporthe_longicolla2	MK942662	MK941335	MK941283
		17-DIA-018	Diaporthe_longicolla3	MK942663	MK941323	MK941284
		17-DIA-040	Diaporthe_longicolla4	MK942667	MK941326	MK941288
		FAU657	Diaporthe_longicolla5	KJ590727	KJ610882	KJ590766
	<i>H. annuus</i>	Isolate 6	Diaporthe_longicolla6	MT636144	MT636160	MT636152
<i>D. masirevicii</i>	<i>G. max</i> / <i>H. annuus</i>	DM-GS	Diaporthe_masirevicci1	MF682435	MF668289	MF668290
		BRIP 54256	Diaporthe_masirevicci2	KJ197277	KJ197256	KJ197238
		BRIP 54118b	Diaporthe_masirevicci3	KJ197280	KJ197260	KJ197242
<i>D. novem</i>	<i>G. max</i>	CPC 28169	Diaporthe_novem1	MF418429	MF418589	MF418508
		EFA 461	Diaporthe_novem2	MH050430	MH051285	MH051279
		KARE1378	Diaporthe_novem3	MN168883	MN318151	MN318144
<i>D. sackstonii</i>	<i>H. annuus</i>	BRIP 54669b	Diaporthe_sackstonii1	KJ197287	KJ197267	KJ197249
<i>D. serafinae</i>	<i>H. annuus</i>	BRIP 54136	Diaporthe_serafinae1	KJ197273	KJ197253	KJ197235
		Phom225	Diaporthe_serafinae2	KY511313	KY511344	MH708545
<i>D. sojae</i>	<i>H. annuus</i>	Isolate 2	Diaporthe_sojae1	MT636146	MT636155	MT636150
	<i>G. max</i>	AR3602	Diaporthe_sojae2	KJ590714	KJ610870	KJ590757
		FAU635	Diaporthe_sojae3	KJ590719	KJ610875	KJ590762

Tabla N° 8. Continuación.

		PSCG 530	Diaporthe_ sojae4	MK62694 3	MK691310	MK654892
<i>Valsa ambiens</i> (outgroup)	–	CFCC 89622	Vamb	KR04561 6	KR045657	KU710911

En el análisis del marcador ITS se consideraron 656 sitios, de los cuales 56 fueron sitios segregantes, lo que representa solo el 8,53 % del total de posiciones. Se obtuvieron 22 haplotipos, con 16,22 diferencias entre pares de haplotipos (kh), una diversidad haplotípica (Hd) de 0,946 y una diversidad nucleotídica (Pi) de 0,037. Para el caso de EF1- α el número de sitios considerados fue de 475, de los cuales 107 resultaron ser sitios segregantes, representando el 22,5 % del total de sitios analizados. Se obtuvieron 23 haplotipos, con 37,96 diferencias entre pares de haplotipos (kh), una diversidad haplotípica (Hd) de 0,954 y una diversidad nucleotídica (Pi) de 0,19. Mientras que para TUB el número de sitios considerados fue de 647, con 88 sitios segregantes que representaron el 13,6 % del total de sitios. Se obtuvieron 18 haplotipos, con 24,56 diferencias entre pares de haplotipos (kh), una diversidad haplotípica (Hd) de 0,94 y una diversidad nucleotídica (Pi) de 0,09. Para el análisis de los genes concatenados se consideraron 1757 sitios, de los cuales 163 fueron sitios segregantes, representando el 9,3 % del total de sitios analizados. Se obtuvieron 27 haplotipos, con 54,21 diferencias entre pares de haplotipos (kh), una diversidad haplotípica (Hd) de 0,964 y una diversidad nucleotídica (Pi) de 0,084. (Tabla N° 9)

Tabla N° 9. Características de los alineamientos.

Locus/ Marcador	Sitios analizados	Sitios segregantes	Cantidad de haplotipos	N° de diferencias entre pares de haplotipos (kh)	Diversidad haplotípica (Hd)	Diversidad nucleotídica (Pi)
ITS	656	56	22	16,22	0,946	0,037
EF1- α	475	107	23	37,96	0,954	0,19
TUB	647	88	18	24,56	0,94	0,09
ITS - EF1- α - TUB	1757	163	27	54,21	0.964	0,084

El análisis filogenético constituyó una fase fundamental de la investigación, dirigida a elucidar las relaciones evolutivas entre las secuencias genéticas estudiadas. Se obtuvieron 4 árboles filogenéticos los cuales se presentan en las Figuras N° 14, 15, 16 y 17.

El árbol filogenético correspondiente al marcador ITS mostró que Iso1 e Iso2 pertenecen al clado de *D. helianthi* (*bootstrap* 100 %), mientras que Iso209 pertenece al clado de *D. ambigua* (*bootstrap* 100 %). El árbol EF1- α mostró una topología similar a la anterior, donde Iso1 e Iso2 se ubicaron en el clado de *D. helianthi* (*bootstrap* 97 %) y Iso209 a *D. ambigua* (*bootstrap* 85 %). El árbol de TUB agrupó a Iso1 e Iso2 en el clado de *D. helianthi* (100 % *bootstrap*) al igual que en los árboles anteriores e Iso209 en el clado de *D. ambigua* (100 % *bootstrap*). Se desarrolló un árbol de máxima probabilidad concatenando las secuencias de los tres genes, que relacionó las secuencias de la siguiente manera: Iso1 e Iso2 (*D. helianthi*, *bootstrap* 100 %) y Iso209 (*D. ambigua*, *bootstrap* 100 %).

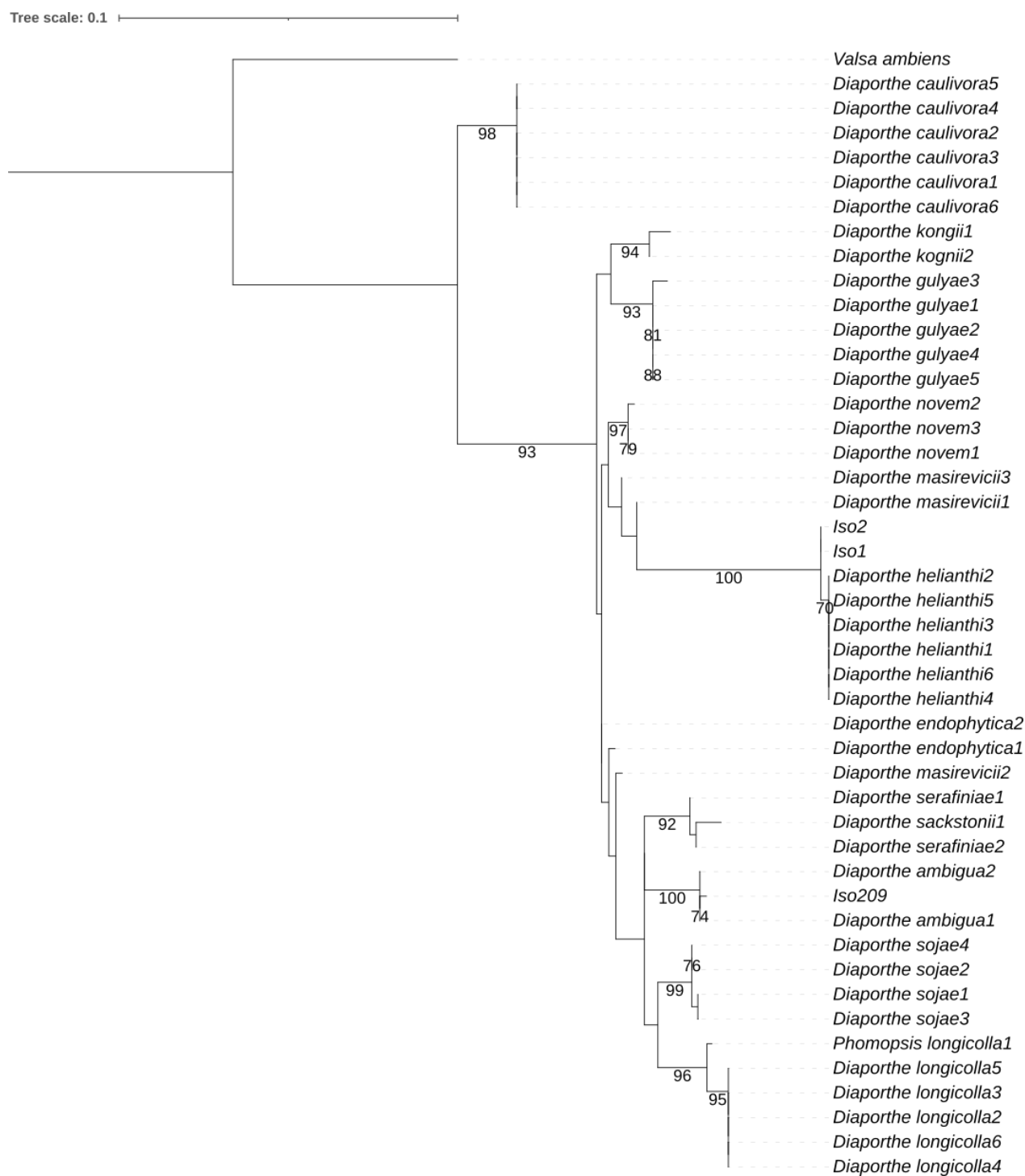


Figura N° 14. Árbol de máxima verosimilitud basado en la región del gen ITS. Se muestran los valores de *bootstrap* por encima del 70 %. Las secuencias ITS de diferentes especies de *Diaporthe* se indican en la Tabla N° 7 y 8. Se utilizó *Valsa ambiens* como grupo externo.

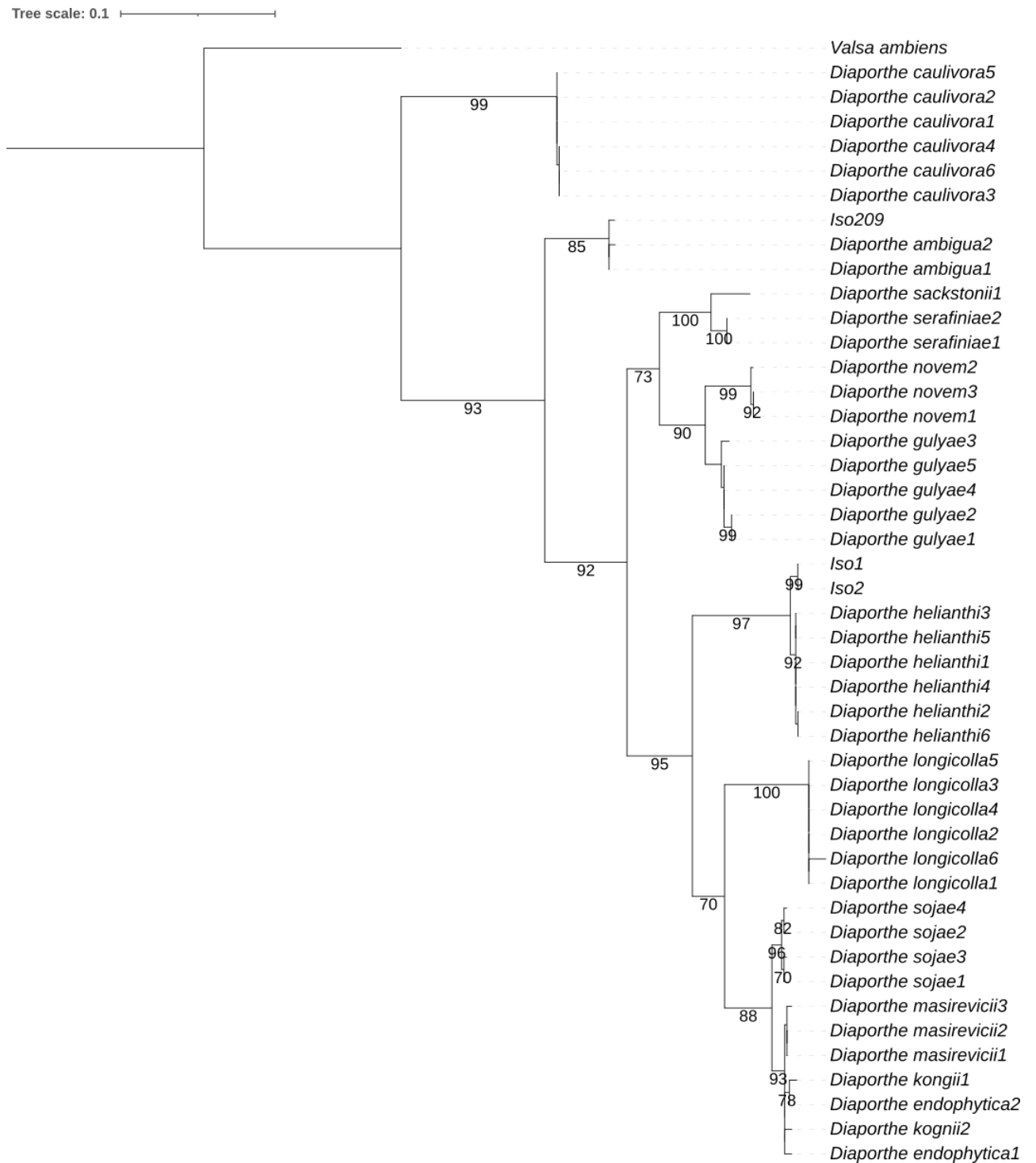


Figura N° 15. Árbol de máxima verosimilitud basado en la región del gen EF1- α . Se muestran los valores de *bootstrap* por encima del 70 %. Las secuencias EF1- α de diferentes especies de *Diaporthe* se indican en la Tabla N° 7 y 8. Se utilizó *Valsa ambiens* como grupo externo.

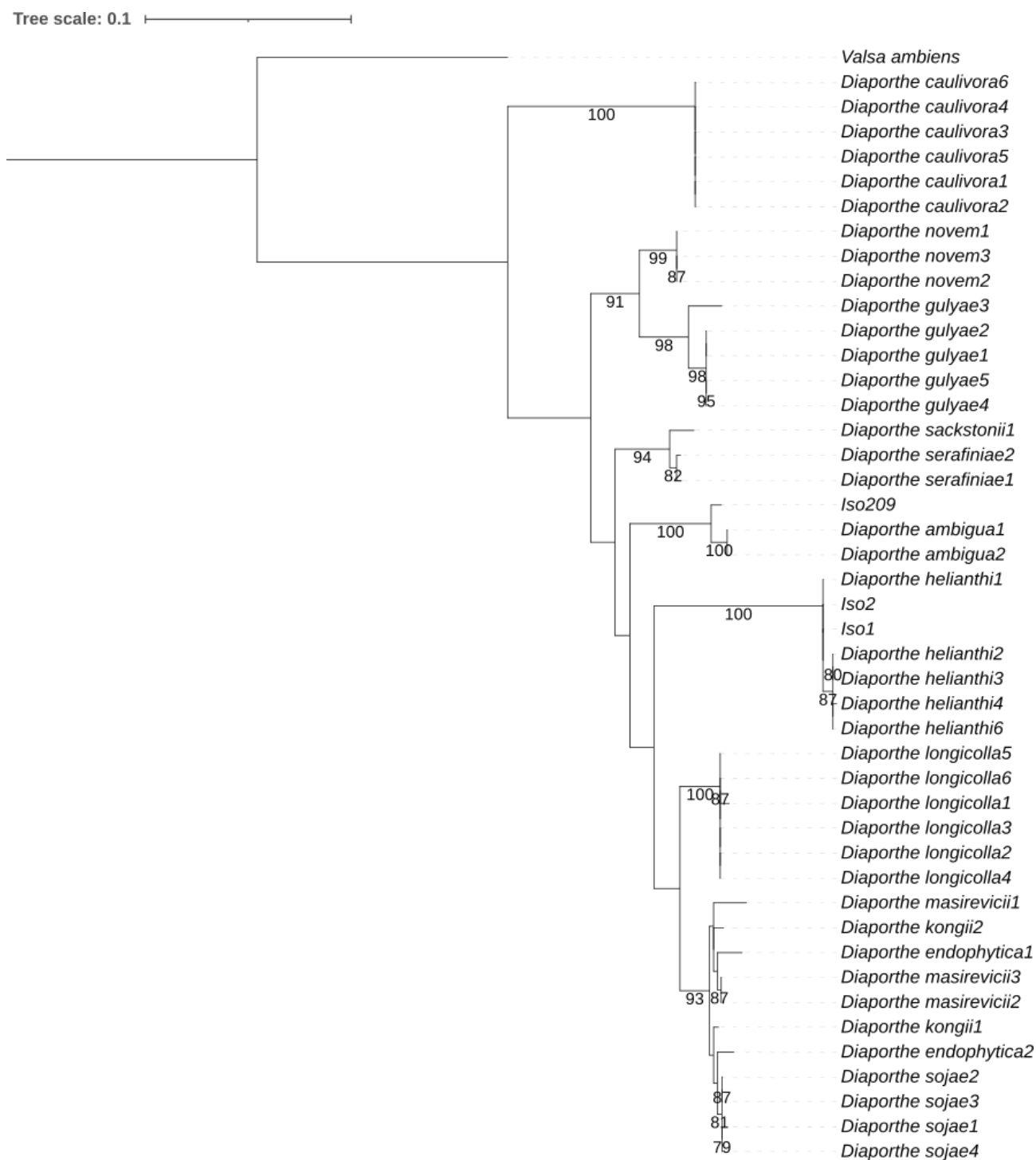


Figura N° 16. Árbol de máxima verosimilitud basado en la región del gen β -tubulina. Se muestran los valores de *bootstrap* por encima del 70 %. Las secuencias β -tubulina de diferentes especies de *Diaporthe* se indican en la Tabla N° 7 y 8. Se utilizó *Valsa ambiens* como grupo externo.

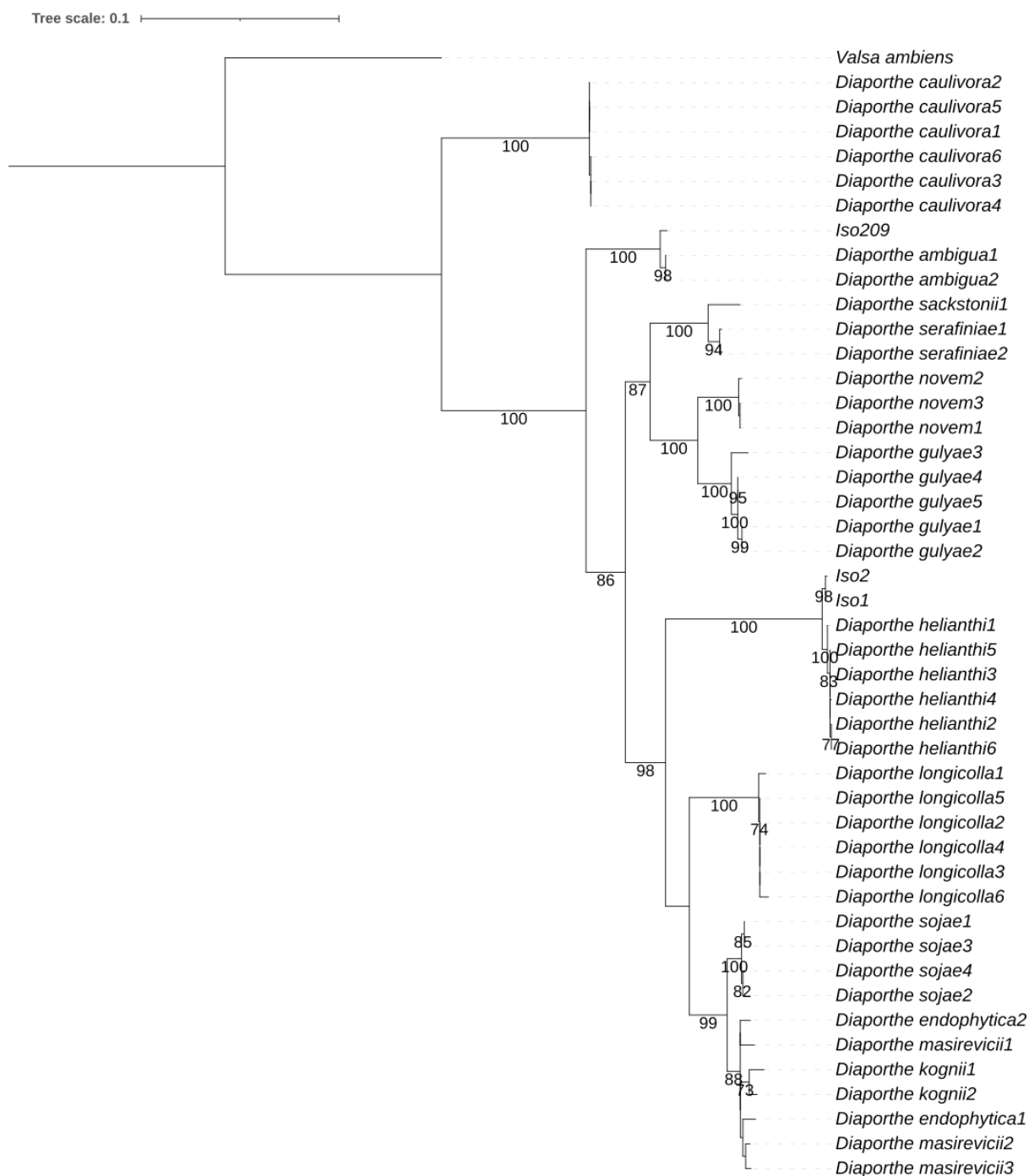


Figura N° 17. Árbol de máxima verosimilitud basado en la alineación concatenada de las regiones de los genes ITS, EF1- α y TUB. Se muestran los valores de *bootstrap* por encima del 70 %. La secuencia de referencia de diferentes especies de *Diaporthe* se indica en la Tabla N° 7 y 8. Se usó *Valsa ambiens* como grupo externo.

En la Tabla N° 10, se presentan los resultados del análisis de diversidad genética empleando todos los marcadores examinados. La diversidad interespecífica, expresada como porcentaje de divergencia, revela que el marcador EF1- α exhibió la mayor distancia genética entre las especies de *Diaporthe* objeto de estudio. Por su parte, el locus ITS mostró un 4,2 % de divergencia entre especies, presentando los valores más bajos en este aspecto. Además, el locus MAT 1-1-1 también ofreció valores de diversidad interespecíficas en torno al resto de los marcadores. Cabe destacar que en este último caso solo se utilizaron las 13 secuencias del género *Diaporthe* disponibles en *GenBank* correspondientes a 7 especies.

La diversidad intraespecífica promedio varió en función del marcador estudiado, siendo el ITS el que registró la menor divergencia dentro del nivel de especie, mientras que el EF1- α presentó el valor más elevado. Es relevante destacar que la diversidad interespecífica se diferenció claramente de la intraespecífica en todos los marcadores evaluados. Al observar la diversidad intraespecífica de *D. helianthi*, se evidenciaron variaciones entre los marcadores; EF1- α presentó la mayor diversidad intraespecífica (0,84 %). De todos modos, los resultados siempre se mantuvieron en torno a la diversidad intraespecífica promedio de todas las especies.

Tabla N° 10. Análisis de diversidad genética para los marcadores empleados en el estudio filogenético.

Locus/ Marcador	Diversidad interespecífica	Diversidad intraespecífica promedio	Diversidad intraespecífica de <i>D. helianthi</i> analizados
ITS	4,2 %	0,12 %	0,085 %
EF1-α	8 %	0,69 %	0,84 %
TUB	6,2 %	0,4 %	0,6 %
ITS - EF1-α - TUB	9,7 %	0,31 %	0,35 %
MAT 1-1-1	5,7 %	-	-

Mating type

Los fragmentos de PCR de los genes MAT1-1-1 y MAT1-2-1 de distintos aislamientos que pudieron secuenciarse exitosamente se depositaron en la base de datos GenBank en el repositorio del NCBI. En la Tabla N° 11 se detallan los números de acceso asignados por Genbank a las secuencias obtenidas de *D. helianthi*.

Tabla N° 11. Número de acceso en *Genbank* de las secuencias resultantes en este estudio.

Especie de <i>Diaporthe</i>	Hospedante	Acceso de <i>GenBank</i>	
		MAT 1-1-1	MAT 1-2-1
<i>D. helianthi</i>	<i>H. annuus</i>	PP318440 a PP318446	PP318447 a PP318454

El 60 % corresponde a aislamientos analizados que se obtuvieron de tallo y el 40 % de capítulo. Respecto del origen geográfico, el 69 % de los aislamientos tuvo origen en la provincia de La Pampa, los restantes en Buenos Aires (Tabla N° 12).

A fin de estudiar los genes MAT en *D. helianthi* se utilizaron los cebadores *mating type* diseñados por Santos et al. (2010). Los 139 aislamientos analizados exhibieron la presencia de MAT1-1-1. Mientras que el 55 % de los aislamientos de *D. helianthi* presentaron los genes MAT1-1-1 y MAT1-2-1. A su vez, el 59 % de los aislamientos que amplificaron ambos marcadores se obtuvieron de tallo, mientras que el 41 % restante se obtuvo de capítulo (Tabla N° 12).

Las secuencias del locus MAT 1-1-1 obtenidas (Tabla N° 11) se agruparon bajo el nombre “Iso” por ser idénticas y se utilizaron para un análisis filogenético junto a todas las secuencias disponibles hasta la actualidad en *GenBank* para el género *Diaporthe* (Tabla N° 13).

Tabla N° 12. Aislamientos de *D. helianthi* y su reacción de PCR de *mating type*.

Aislamiento	Año de aislamiento	Órgano de procedencia	Provincia	Detección de genes <i>mating type</i>	
				MAT 1-1-1	MAT 1-2-1
1	2020	Tallo	Buenos Aires	+	
3	2020	Tallo	Buenos Aires	+	+
4	2020	Tallo	Buenos Aires	+	+
5	2020	Tallo	Buenos Aires	+	
6	2020	Tallo	Buenos Aires	+	
8	2020	Tallo	Buenos Aires	+	+
9	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+
10	2020	Tallo	Buenos Aires	+	+
11	2020	Tallo	Buenos Aires	+	+
12	2020	Tallo	Buenos Aires	+	
13	2020	Tallo	La Pampa	+	+
14	2020	Tallo	La Pampa	+	+
15	2020	Capítulo	La Pampa	+	
16	2020	Tallo	La Pampa	+	+
17	2020	Tallo	La Pampa	+	
18	2020	Tallo	La Pampa	+	
19	2020	Tallo	La Pampa	+	
20	2020	Tallo	La Pampa	+	
21	2020	Tallo	La Pampa	+	
22	2020	Tallo	La Pampa	+	+
23	2020	Tallo	La Pampa	+	
24	2020	Tallo	La Pampa	+	+
25	2020	Tallo	La Pampa	+	+
26	2020	Tallo	La Pampa	+	
27	2020	Tallo	La Pampa	+	
28	2020	Tallo	La Pampa	+	+
29	2020	Tallo	La Pampa	+	+
30	2020	Tallo	La Pampa	+	
31	2020	Tallo	La Pampa	+	+
32	2020	Tallo	La Pampa	+	+
33	2020	Tallo	La Pampa	+	+
34	2020	Tallo	La Pampa	+	+
35	2020	Tallo	La Pampa	+	+
36	2020	Tallo	La Pampa	+	+
37	2020	Tallo	La Pampa	+	+
38	2020	Tallo	La Pampa	+	+
39	2020	Tallo	La Pampa	+	+
40	2020	Tallo	La Pampa	+	
41	2020	Capítulo	La Pampa	+	+
42	2020	Tallo	La Pampa	+	+

Aislamiento	Año de aislamiento	Órgano de procedencia	Provincia	Detección de genes <i>mating type</i>	
				MAT 1-1-1	MAT 1-2-1
43	2020	Tallo	La Pampa	+	
44	2020	Tallo	La Pampa	+	
45	2020	Tallo	La Pampa	+	
46	2020	Tallo	La Pampa	+	
47	2020	Tallo	La Pampa	+	
48	2020	Tallo	La Pampa	+	
49	2020	Tallo	La Pampa	+	
50	2020	Tallo	La Pampa	+	+
51	2020	Tallo	La Pampa	+	
52	2020	Tallo	La Pampa	+	
53	2020	Tallo	La Pampa	+	+
54	2020	Tallo	La Pampa	+	
55	2020	Capítulo	La Pampa	+	
56	2020	Capítulo	La Pampa	+	
57	2020	Tallo	La Pampa	+	
58	2020	Tallo	La Pampa	+	+
59	2020	Capítulo	La Pampa	+	+
60	2020	Capítulo	La Pampa	+	+
61	2020	Capítulo	La Pampa	+	
62	2020	Capítulo	La Pampa	+	+
63	2020	Tallo	La Pampa	+	
65	2020	Tallo	La Pampa	+	+
66	2020	Tallo	La Pampa	+	
67	2020	Capítulo	La Pampa	+	+
68	2020	Capítulo	La Pampa	+	+
69	2020	Tallo	La Pampa	+	+
71	2020	Capítulo	La Pampa	+	
72	2020	Capítulo	La Pampa	+	
73	2020	Tallo	La Pampa	+	+
74	2020	Tallo	La Pampa	+	+
75	2020	Tallo	La Pampa	+	
76	2020	Capítulo	La Pampa	+	+
77	2020	Capítulo	La Pampa	+	
78	2020	Capítulo	La Pampa	+	
79	2020	Capítulo	La Pampa	+	+
80	2020	Tallo	La Pampa	+	
81	2020	Tallo	La Pampa	+	+
82	2020	Tallo	La Pampa	+	+
83	2020	Capítulo	La Pampa	+	+
84	2020	Capítulo	La Pampa	+	
85	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	
86	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+

Aislamiento	Año de aislamiento	Órgano de procedencia	Provincia	Detección de genes <i>mating type</i>	
				MAT 1-1-1	MAT 1-2-1
87	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+
88	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+
89	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+
90	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+
91	2020	Tallo	Buenos Aires	+	
92	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	
93	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+
94	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	
110	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+
117	2020	Tallo	Buenos Aires	+	+
127	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+
135	2020	Tallo	Buenos Aires	+	
143	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+
150	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	+
153	2020	Tallo	Buenos Aires	+	
160	2020	Capítulo	Buenos Aires	+	
164	2020	Tallo	Buenos Aires	+	+
167	2021	Capítulo	La Pampa	+	
169	2021	Tallo	La Pampa	+	
170	2021	Tallo	La Pampa	+	+
172	2021	Capítulo	La Pampa	+	+
182	2021	Capítulo	La Pampa	+	+
186	2021	Tallo	La Pampa	+	
188	2021	Tallo	La Pampa	+	+
191	2021	Tallo	La Pampa	+	+
194	2021	Tallo	La Pampa	+	
204	2021	Tallo	La Pampa	+	
212	2021	Tallo	La Pampa	+	+
217	2021	Capítulo	La Pampa	+	+
227	2021	Tallo	La Pampa	+	
230	2021	Capítulo	La Pampa	+	+
236	2021	Tallo	La Pampa	+	+
244	2021	Capítulo	La Pampa	+	
251	2021	Capítulo	La Pampa	+	
259	2021	Capítulo	La Pampa	+	+
265	2021	Capítulo	La Pampa	+	
272	2021	Tallo	La Pampa	+	+
280	2021	Capítulo	La Pampa	+	
282	2021	Tallo	La Pampa	+	+
288	2021	Capítulo	La Pampa	+	
292	2021	Capítulo	La Pampa	+	+
295	2021	Tallo	La Pampa	+	+

Aislamiento	Año de aislamiento	Órgano de procedencia	Provincia	Detección de genes <i>mating type</i>	
				MAT 1-1-1	MAT 1-2-1
299	2021	Capítulo	La Pampa	+	+
313	2021	Capítulo	Buenos Aires	+	+
319	2021	Capítulo	Buenos Aires	+	+
324	2021	Tallo	Buenos Aires	+	
328	2021	Capítulo	Buenos Aires	+	
339	2021	Capítulo	Buenos Aires	+	+
343	2021	Tallo	Buenos Aires	+	+
354	2021	Tallo	Buenos Aires	+	+
360	2021	Capítulo	Buenos Aires	+	+
371	2021	Capítulo	Buenos Aires	+	
375	2021	Tallo	Buenos Aires	+	+
380	2021	Capítulo	Buenos Aires	+	
385	2021	Capítulo	Buenos Aires	+	
388	2021	Tallo	Buenos Aires	+	
390	2021	Capítulo	Buenos Aires	+	

Tabla N° 13. Detalle de accesiones descargadas desde la base de datos *Genbank* y utilizadas en el análisis filogenético del locus MAT 1-1-1.

Especie de <i>Diaporthe</i>	Hospedante	Colección	Nombre	Acceso de <i>GenBank</i>
				MAT 1-1-1
<i>D. helianthi</i>	<i>H. annuus</i>	CBS 592.81	Diaporthe_helianthi1	GQ250234.1
<i>D. novem</i>		DPC_HOH16	Diaporthe_novem1	PP003226.1
<i>D. longicolla</i>		DPC_HOH26	Diaporthe_longicolla1	PP003224.1
		DPC_HOH19	Diaporthe_longicolla2	PP003223.1
		DPC_HOH18	Diaporthe_longicolla3	PP003222.1
		DPC_HOH9	Diaporthe_longicolla4	PP003221.1
		DPC_HOH6	Diaporthe_longicolla5	PP003220.1
		DPC_HOH5	Diaporthe_longicolla6	PP003219.1
		DPC_HOH29	Diaporthe_longicolla7	PP003218.1
<i>D. batatas</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	CRI 302-4	Diaporthe_batatas1	XM_044783124.1
<i>D. melonis</i>	<i>Cucumis melo</i>	CBS 507.78	Diaporthe_melonis1	GQ250237.1
<i>D. lusitanicae</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>	CBS 123213	Diaporthe_lusitanicae1	GQ250235.1
<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Hydrangea macrophylla</i>	Ph-C188/1	Diaporthe_sp1	GQ250258.1

El árbol filogenético de máxima verosimilitud presentado para el marcador MAT 1-1-1 (Figura N° 18) mostró que las secuencias de este estudio (Iso) comparten clado (*bootstrap* 100 %) junto a la única secuencia MAT 1-1-1 de *D. helianthi* disponible en *GenBank*.

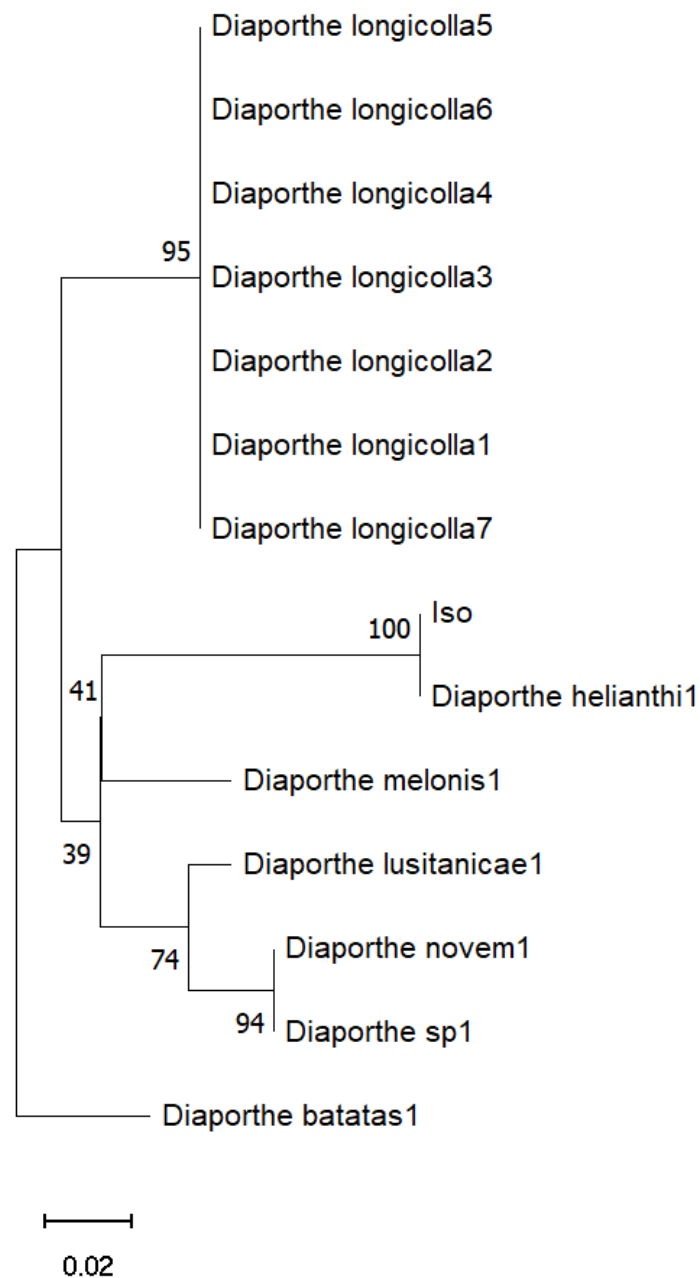


Figura N° 18. Árbol de máxima verosimilitud basado en el gen MAT 1-1-1. Se muestran los valores de *bootstrap* por encima del 35 %. Las secuencias MAT 1-1-1 de las especies de *Diaporthe* se indican en la Tabla N° 13.

Discusión

Relevamiento de cancro del tallo y podredumbre seca del capítulo

La Figura N° 5 evidencia el incremento progresivo de la prevalencia de ambas enfermedades con el transcurso del tiempo (prevalencia total). El inóculo se distribuyó de manera generalizada en toda la región semiárida dedicada al cultivo de girasol. Probablemente, el tiempo requerido para la comprensión de la dinámica del CT y la PSC como enfermedades independientes exceda al empleado en este trabajo de Tesis; no obstante, la observación de ambas enfermedades en conjunto condujo a una interpretación epidemiológica general que subrayó la importancia de seleccionar híbridos de buen comportamiento.

En la Figura N° 6 se observan variaciones de la incidencia promedio en tallo y capítulo. Una posible explicación de este fenómeno tendría como eje al momento del ciclo del cultivo en el cual las condiciones climáticas son más propicias para el desarrollo de una u otra enfermedad. Si dichas condiciones ocurriesen entre las etapas V6 y V8, se observaría una mayor frecuencia de CT, mientras que si las condiciones se retrasaran hasta las etapas R2-R3 o posteriores, sería probable que aumentara la incidencia en los capítulos. La posibilidad de infectar al girasol en distintos estados fenológicos subrayaría la amplia ventana de infección que posee *D. helianthi* para ingresar al cultivo. Conocer en qué momento del ciclo se presentan las condiciones climáticas precisas que permiten la infección, aportaría conocimientos fundamentales para establecer medidas de control eficientes del patógeno. Cabe destacar que, hasta la fecha, las infecciones de PSC causadas por *D. helianthi*, se registraron con pérdidas significativas solo en Argentina y Uruguay (Stewart et al., 2004; Fassio et al., 2007; Mancebo, 2021). La limitación geográfica de estas infecciones en capítulo a esta extensa región, a pesar de la presencia del agente causal en otras zonas productoras de girasol a nivel mundial, plantea interrogantes que aún requieren esclarecimiento.

A partir de los datos relevados en campañas sucesivas y tomando la experiencia de la epifitía de cancro en Uruguay durante la campaña 2002/2003, se exploró por fuera de esta Tesis Doctoral, el uso de modelos matemáticos que ayuden a anticiparse a la enfermedad, con el objetivo de sumar una nueva herramienta que aporte al manejo del cultivo (Delos et al., 1996; Debaeke y Estragnat, 2003; Moschini et al., 2019). Se seleccionó y ejecutó con datos meteorológicos locales el modelo publicado por Moschini et al. (2019) que reporta el riesgo de liberación de ascosporas de *D. helianthi* en función de las condiciones climáticas de los últimos siete días. Esta actividad se realizó junto a un grupo de profesionales de instituciones agropecuarias como INTA, ASAGIR, CREA y AAPRESID (Corró Molas et al., 2021). Aunque la liberación de ascosporas no es una condición suficiente para que se produzca la infección y comience a desarrollarse la enfermedad, resulta sin duda una condición necesaria para que el proceso ocurra. El modelo permitió predecir dónde se ubican las regiones más afectadas por CT y PSC. Esta predicción posibilitó ubicar dentro de estas zonas la evaluación de líneas de mejoramiento e híbridos comerciales de girasol y los ensayos de fungicidas para ambas enfermedades. Además, la incorporación de esta herramienta, en el marco del manejo integrado de la enfermedad, representa un avance significativo al complementar eficazmente el uso de fungicidas. Su valor radica en mejorar la gestión de los fitosanitarios, al permitir una elección más precisa del momento de aplicación, ya que dicho momento es previo a la observación de los síntomas en el cultivo de girasol. Este enfoque estratégico optimiza la eficacia de los fungicidas y contribuye a una gestión más eficiente y sostenible de la enfermedad.

Conservación de aislamientos

La conservación de fragmentos de cultivos en microtubos de 2 mL a 4°C (APG), permitió obtener cultivos viables incluso después de 3 años de conservación. Este resultado coincide con lo reportado por Grijalba (2011) para *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*

Athow & Caldwell 1954, patógeno causante de cancro del tallo en soja. Otros métodos evaluados fueron menos eficientes. La conservación en picos de flauta a 4°C exhibió viabilidad solo durante 6 meses, resultados análogos expusieron French y Hebert (1980). Los especímenes fúngicos liofilizados no se pudieron recuperar viables. Cabe agregar que varios autores coinciden en que el liofilizado de las muestras fúngicas tiene utilidad para la extracción de ADN de alto rendimiento y calidad (Mathew et al., 2011; Harveson et al., 2018).

Estudio morfológico

Diaporthe helianthi Munt.-Cvetk., Mihaljč. & M. Petrov, Nova Hedwigia 34(3 & 4): 433 (1981).

La morfología macroscópica y microscópica de nuestros aislamientos evidenció buena relación con el protologo de *D. helianthi* (Muntañola et al., 1981). No obstante, se reconocieron picnidios de tamaño mayor. Cabe destacar que las características culturales observadas por Harveson et al. (2018) como color y abundancia de micelio, color de reverso y estromas, tamaño y distribución de los picnidios coincidieron con las halladas en el presente trabajo.

En la primera descripción del patógeno realizada por Muntañola et al. (1981) solo se reportan beta conidios y con tamaño prácticamente igual al encontrado en los aislamientos de este estudio. Nuestros resultados también coinciden con Muntañola et al. (1985), quienes realizaron una comparación entre aislamientos obtenidos de girasol y de restos de plantas. De acuerdo con dicho trabajo, *D. helianthi* produjo escaso micelio aéreo en la mayoría de los medios empleados, además los conidiomas se produjeron fácilmente, mayormente solitarios y expresando casi exclusivamente, beta conidios (como en este estudio). Sin embargo, también observaron alfa conidios ocasionalmente. Una situación similar se describe por Harveson et al. (2018) y Mathew et al. (2015a)

quienes describieron dos tipos de conidios: alfa conidios, unicelulares, elípticos, 8-21 x 1,7-5,5 μm y beta conidios, unicelulares, filiformes, 16-42 x 0,5-6,9 μm . Sin embargo, aclaran que la proporción de alfa y beta conidios puede variar entre aislamientos de *D. helianthi* y ejemplifican con los aislamientos provenientes de Minnesota, Dakota del Norte y Dakota del Sur (EE. UU.) que solo presentan beta conidios en cultivo. Las medidas de los conidios beta mencionadas en estos trabajos son muy amplias; las observadas en este trabajo de Tesis se enmarcan en el rango descripto en ambos trabajos, aunque se ajustan mejor con los resultados de Harveson et al. (2018).

A pesar de los esfuerzos por caracterizar exhaustivamente los conidios de *D. helianthi*, este estudio no logró observar la presencia de alfa conidios, a diferencia de las ocasionales menciones en investigaciones anteriores (Muntañola et al., 1985; Harveson et al., 2018). Resulta oportuno destacar la consistencia en la predominancia de beta conidios en aquellos estudios que informaron variaciones en la proporción de ambos tipos de conidios. La ausencia de alfa conidios en nuestro trabajo subrayaría la importancia de realizar estudios comparativos entre aislamientos de diversas partes del mundo.

Aunque el tamaño de los ascomas periteciales y las ascosporas coincide con la descripción original (Muntañola et al., 1981) en este trabajo se observaron ascos ligeramente más pequeños. Una diferencia metodológica significativa radicó en que los ascomas periteciales descritos por dichos autores se desarrollaron inmersos en el medio de cultivo (APG) y en rastrojo de girasol. En el presente estudio se localizaron exclusivamente sobre aquellos fragmentos de soja, girasol o trigo depositados sobre medios agarizados, y en ningún caso en ausencia del material vegetal.

En otro trabajo de Muntañola et al. (1988), donde se correlacionan las condiciones ambientales con la producción de estructuras sexuales de *D. helianthi*, la longitud de los cuellos de los ascomas periteciales reportados varió desde 100 a 675 μm (obtenidos sobre restos de girasol), medidas coincidentes con las observadas en esta Tesis. Los

hallazgos de este trabajo en relación con la dimensión de los ascomas periteciales también se enmarcan dentro de lo encontrado por Harveson et al. (2018). Estos autores observaron ascomas periteciales de *D. helianthi* sobre residuos de cultivos invernales, que oscilaron entre 350 a 450 mm de diámetro con un cuello prominente de 350 a 600 μm de largo. No obstante, Harveson et al. (2018) observaron ascos incoloros, con 8 esporas, 44-67 x 7,5-12,5 μm y ascosporas elípticas de 9,2-19 x 2,2-7,5 μm . La producción de estructuras sexuales mayores a campo podría explicarse por las condiciones ambientales no controladas, como la humedad relativa, que podrían influir en los resultados obtenidos.

Es importante resaltar que solo se logró la obtención de ascomas periteciales en una única oportunidad. Muntañola et al. (1985) señalan también que los ascomas periteciales solo se obtuvieron una única vez en medio de cultivo pese a los esfuerzos realizados por volver a lograrlos. Esto último coincide con lo observado por Comerio (comunicación personal) en el estudio de los aislamientos de las primeras infecciones de cancro observadas en la región semiárida en la campaña 2015/2016. Estos antecedentes sugieren que la esporulación sexual podría depender de condiciones ambientales o factores particularmente no controlados durante el transcurso de esta Tesis.

Diaporthe ambigua Nitschke, Pyrenomyc. Germ. 2: 311 (1870).

En el presente estudio la determinación de *D. ambigua* se realizó considerando las descripciones de Crous et al. (2019) y van Rensburg et al. (2006). Este último trabajo refiere la inspección del tipo de la especie; no obstante, expresa que solo observó unas pocas ascosporas (12-15 μm x 3,5-4 μm).

Díaz et al. (2017) observaron ascomas periteciales sobre tallos de alfalfa, estos presentaron cuello largo, 800-1200 μm , de color pardo oscuro a negro estrechados

hacia el ápice. Mientras que, van Rensburg et al. (2006) observaron, sobre *Aspalathus linearis*, ascomas periteciales globosos y solitarios o agrupados, que exhibieron un cuello de tonalidad pardo oscuro a negro y alcanzaron una longitud de hasta 1000 μm . Las dimensiones de los ascomas periteciales coinciden en ambos casos con lo observado en esta Tesis. En cuanto a los ascos, Díaz et al. (2017) los informaron clavados y sésiles con ocho ascosporas hialinas y gúttulas distintivas, 11,5-14,8 x 2,9-4,2 μm . Smit et al. (1996) observaron ascomas periteciales de *D. ambigua* sobre tallos de manzana inmersos en agar agua; reportaron producción de ascos, 35-44 x 5-7,5 μm y ascosporas 12 x 3,5 μm . La descripción de ascos y ascosporas reportada en esta Tesis coincide con lo hallado por Smit et al. (1996) para *D. ambigua* aislado desde canchros en manzana, pera y ciruela; como así también por lo reportado por Díaz et al. (2017) sobre tallos de alfalfa. Además, en el presente trabajo se observó la presencia de paráfisis en concordancia con van Rensburg et al. (2006). La morfología y dimensión de las ascosporas de nuestros aislamientos concordaron con lo descrito por van Rensburg et al. (2006) sobre *A. linearis* en Sudáfrica, quienes informaron ascosporas de aspecto hialino y superficie lisa, (12-)13-15 x (3-)3,5-4 μm . No obstante, presentaron ascos cuya dimensión (50-60(-65) x 7-8(-9) μm), supera a la observada en este trabajo. Una de las posibles explicaciones para las diferencias observadas en los ascos, podría residir en el sustrato sobre el cual se observaron las estructuras sexuales. Mientras que van Rensburg et al. (2006) emplearon tallos de *Aspalathus*, en esta investigación se utilizaron fragmentos de soja. Este cambio, contribuiría a encontrar diferencias morfológicas, ya que los distintos sustratos vegetales podrían influir en las dimensiones de las estructuras reproductivas.

En el trabajo de Díaz et al. (2017), donde se analizaron especies de *Diaporthe* sobre kiwi (*Actinidia deliciosa*), *D. ambigua* produjo conidios alfa, hialinos, unicelulares, bigutulados y elipsoidales, 6,6-7,4 x 2,7-3,0 μm . Además, van Rensburg et al. (2006) informaron alfa conidios, elipsoidales y bigutulados, 6-7(-8) x 2(-3) μm . Ninguno de

estos autores observó conidios beta. El aislamiento estudiado en esta Tesis tampoco presentó conidios beta.

Gomes et al. (2013) reportaron *D. ambigua* previamente en girasoles de Italia. Es relevante señalar que esta especie se reportó sobre un amplio rango de hospedantes, entre ellos *Aspalathus linearis* (van Rensburg et al., 2006), *Foeniculum vulgare*, *Malus domestica*, *Prunus salicina* (Smit et al., 1996), *Malus sylvestris* (Crous et al., 2000), *Prunus* sp. (Mostert et al., 2001), *Pyrus communis* (Nitschke, 1867) y *Vitis vinifera* (van Niekerk et al., 2005).

Este es el primer reporte de *D. ambigua* aislado de girasol en Argentina.

Caracterización molecular

La longitud de los fragmentos amplificados de ITS, EF1- α y TUB coincidió con lo reportado por Mancebo (2021) y Mathew (2014) para los mismos iniciadores.

La selección de los marcadores amplificados en el marco de esta Tesis se fundamentó en la utilización del espaciador interno transcrito (ITS), reconocido como la región oficial de *barcoding* de ADN en hongos (Schoch et al., 2012). A dicho marcador se agregaron EF1- α y TUB, dado que investigaciones anteriores sugirieron su preferencia por ser más informativos que ITS en el contexto del género *Diaporthe* (Santos et al., 2010; Gomes et al., 2013; Udayanga et al., 2014; Santos et al., 2017).

En el transcurso del procesamiento de datos, se procedió al control de calidad de las secuencias mediante la eliminación de aquellos extremos que caían por debajo del umbral de 30 de calidad *Phred*. Este umbral aseguró una precisión de secuenciación de al menos el 99,9 % para cada base analizada, lo que equivale a una probabilidad de factor de error de base de 1 en 1000. Esta cuidadosa selección de datos aseguró la

fiabilidad y consistencia esenciales para llevar a cabo un análisis filogenético robusto y confiable.

Los resultados presentados en el análisis de las características de los alineamientos individuales y su correspondiente concatenación, coincidieron con lo presentado por Santos et al. (2017) donde el marcador EF1- α aportó el mayor número de sitios segregantes cuando se compararon los marcadores ITS, EF1- α , TUB, HIS y CAL.

Los estudios filogenéticos presentados son consistentes con los estudios morfológicos descriptos previamente y permitieron agrupar a los aislamientos de *D. helianthi* de la región semiárida pampeana Argentina con aislamientos de la misma especie de otras partes del mundo.

En las Figuras N° 14 y 15 se detectan diferencias dentro del clado de especie de *D. helianthi* (los aislamientos de este estudio se apartan del resto con los marcadores ITS y EF1- α). En el caso de la filogenia obtenida a partir del marcador TUB (Figura N° 16), se observó que los aislamientos de *D. helianthi* de este estudio compartieron la divergencia dentro de la especie con un aislamiento argentino de la región sudeste bonaerense (Zambelli et al., 2020). Asimismo, se apreciaron divergencias dentro del resto de los *D. helianthi* en la filogenia generada a partir del alineamiento concatenado (Figura N° 17). Este fenómeno podría interpretarse como un indicio preliminar de diversidad intraespecífica. Se analizó la diversidad intraespecífica e interespecífica de cada una de las especies representadas en los árboles filogenéticos. Los resultados obtenidos mostraron que las divergencias dentro de *D. helianthi* son bajas y los valores promedio estuvieron en torno a los valores de diversidad promedio de las especies de *Diaporthe* estudiadas para los marcadores empleados. Además, el rango de valores de diversidad observados para *D. helianthi* se diferenció claramente del rango de diversidades interespecíficas de *Diaporthe* spp.; esto reforzó la identificación de los aislamientos de este trabajo como *D. helianthi*.

La filogenia obtenida en este trabajo a partir del análisis de máxima verosimilitud coincide con lo previamente reportado por Zambelli et al. (2020) quienes al utilizar el mismo tipo de análisis pudieron justificar claramente el límite entre diferentes especies de *Diaporthe*. Nuestros resultados también coincidieron con lo reportado por Mathew et al. (2011) quienes aplicando el método de máxima verosimilitud para el marcador ITS, obtuvieron árboles filogenéticos para un conjunto de aislamientos estadounidenses de *D. helianthi* y *D. gulyae* y observaron divergencias dentro del nivel de especie, sumando otro indicio de diversidad dentro de *D. helianthi*.

En este estudio, se evidenció una marcada disparidad en la distribución de especies entre la región semiárida pampeana y la región del sudeste bonaerense, en comparación con los resultados de Mancebo (2021). Este último informó al menos seis especies como agentes causales del CT y la PSC, identificando a *D. helianthi* como el agente causal en el 94 % de los casos examinados. En contraste, nuestros resultados indicaron que *D. helianthi* fue responsable de más del 99,7 % de los casos estudiados, con *D. ambigua* añadida como otra especie causante de la enfermedad. La detección de diversos agentes causales del CT y PSC destacó la importancia crítica de contar con herramientas de diagnóstico rápido y preciso. A partir de este trabajo se logró obtener un método de diagnóstico molecular para las enfermedades en la EEA INTA Anguil “Guillermo Covas”. Asimismo, subrayó la necesidad de investigar la composición de las poblaciones en las diferentes zonas girasoleras afectadas por las enfermedades ya sea tanto para entender su expresión como para tomar decisiones o definir estrategias de manejo, o incluso como información para el mejoramiento genético.

Mating type

Aproximadamente la mitad (55 %) de los aislamientos de *D. helianthi* analizados presentaron la combinación de genes MAT1-1-1 y MAT1-2-1. Estos resultados pueden ser explicados de modo genético, teniendo en cuenta que cuando se autofecunda un

aislamiento homotático, la mitad de la progenie es homotática (y contiene los genes MAT1-1 y MAT1-2) y la otra mitad es heterotática, conteniendo solo MAT1-1. Esto fue previamente planteado en un trabajo de Turgeon y Yoder, (2000) quienes además agregan que el mecanismo por el cual un aislamiento homotático produce ambos tipos de descendencia no se comprende actualmente.

Además, Mathew (2014) sostiene que las pruebas de apareamiento que utilizan el método de Brayford (1990) sugieren que *D. helianthi* es homotático. Santos et al. (2010) y Udayanga et al. (2012) reportaron la presencia del gen MAT 1-1-1 en *D. helianthi* pero no del gen MAT 1-2-1.

Situaciones similares se reportaron en trabajos previos sobre otras especies del género *Diaporthe*, por ejemplo, Santos et al. (2011) y Hosseini (2022) demostraron que *D. caulivora* es homotático, sin embargo, sólo se pudo detectar el locus MAT1-2-1 en todos los aislamientos. Hosseini (2022) estudió 21 aislamientos de *D. longicolla* y observó que los genes (MAT1-1-1 y MAT1-2-1) se encontraron por separado en diferentes aislamientos de *D. longicolla*, pero nunca los dos juntos en el mismo aislamiento. Este patrón indicaría que *D. longicolla* es heterotático. Sin embargo, dichos resultados contrastan con los de Santos et al. (2011), que indicaron que los genes MAT1-1-1 y MAT1-2-1 estaban presentes juntos en cada uno de los aislamientos de *D. longicolla* estudiados.

Santos et al. (2010) describen que la incapacidad de detectar MAT1-1-1/MAT1-2-1 en aislamientos de *Diaporthe* podría deberse a mutaciones puntuales en las regiones de hibridación de los cebadores.

En el análisis de máxima verosimilitud, el clado de *D. helianthi* se separa de las secuencias del resto de las especies con buenos niveles de soporte. Además, el locus MAT1-1-1 evidenció valores de diversidad interespecífica similares al resto de los marcadores utilizados. Este análisis sumaría evidencia a lo expresado por Turgeon

(1998), Pöggeler (2001) y Du et al. (2005) respecto de la utilidad de los genes MAT1-1-1 y MAT1-2-1 para la resolución filogenética de especies fúngicas sobre otras regiones genómicas.

Este estudio representó el primer aporte de secuencias MAT 1-2-1 de *D. helianthi* a una base de datos pública (*Genbank*). Además, constituyó una contribución adicional de secuencias MAT 1-1-1 para esta especie, dado que hasta el momento solo existía una secuencia disponible para *D. helianthi* (Santos et al., 2010).

Conclusiones

Se confirmó la presencia de *D. helianthi* como la principal especie asociada a las enfermedades de cancro del tallo y la podredumbre seca del capítulo de girasol en la región estudiada.

La presencia de *D. ambigua* en la región de estudio, aun en baja frecuencia, podría indicar un cambio incipiente en el patosistema.

La composición de las especies asociadas a las enfermedades de CT y PSC en la región semiárida pampeana se diferenció de la correspondiente en el sur bonaerense.

El inóculo de *D. helianthi* se encuentra distribuido en toda la región girasolera bajo estudio.

El cepario establecido constituye la colección de *Diaporthe* spp. aisladas de girasol más extensa y caracterizada del país.

Los análisis morfológicos y moleculares permitieron determinar adecuadamente los aislamientos de *D. helianthi* y *D. ambigua* obtenidos; el marcador EF1- α resultó el más informativo para este análisis.

Los análisis moleculares no solo expandieron las posibilidades del diagnóstico clásico, sino que además permitieron describir por primera vez al gen MAT 1-2-1 para *D. helianthi*.

Sería importante profundizar el estudio de los genes MAT1-1-1 y MAT1-2-1 para sustentar el carácter homotálico de *D. helianthi*.

La obtención esporádica del estado sexual *in vitro* no permitió establecer un método sistemático de producción de inóculo a partir de ascosporas.

Se fortaleció el diagnóstico molecular de *Diaporthe* spp. y otros patógenos en Argentina, a través de la consolidación de un laboratorio de fitopatología molecular en la EEA Anguil “Guillermo Covas”, La Pampa.

CAPÍTULO II

Análisis de la diversidad genética de *D. helianthi* mediante genotipado por secuenciación de ADN

Introducción

Las enfermedades del girasol causadas por especies de *Diaporthe*, que incluyen el cancro del tallo y la podredumbre seca del capítulo, en conjunto causan pérdidas de rendimiento en Argentina y otros países del mundo (Pereyra & Escande, 1994; Mathew et al., 2015a; Ghironi et al., 2018; Allen et al., 2019). Una de las especies de *Diaporthe* más comúnmente asociadas con el girasol es *D. helianthi*, que además de ser la primera en ser descripta como responsable de dichas enfermedades (Muntañola et al., 1981) es la prevalente en el patosistema argentino (Mancebo, 2021; Colombo et al., 2021; Colombo et al., 2022).

Hasta la fecha, se dispone de poca información acerca de la base genética de la patogenicidad de *D. helianthi*. Sin embargo, los análisis genéticos de población de patógenos fúngicos ofrecen herramientas sólidas para investigar cómo estos emergen y se adaptan (Grunwald et al., 2017). Por lo tanto, estimar la diversidad genética, que constituye un componente clave para definir la estructura de la población de patógenos en las plantas (Grunwald et al., 2003), podría ser útil para entender la dinámica de patógenos como *D. helianthi* y especies relacionadas.

Para investigar la diversidad genética dentro de poblaciones de *D. helianthi* en girasol, se requieren marcadores moleculares sólidos, como así también técnicas de genotipado versátiles y accesibles. En este sentido, las plataformas de secuenciación de ADN de próxima generación (NGS), en inglés Next Generation Sequencing, revolucionaron los análisis de la variación genética y la genética de poblaciones al proporcionar una

secuenciación rápida y económica de marcadores genéticos en grandes poblaciones. Las aplicaciones de NGS para análisis de diversidad incluyen el genotipado por secuenciación (GBS) y el genotipado por secuenciación con doble digestión con enzimas de restricción (ddRADseq). Estas aproximaciones se han utilizado en varios estudios que involucran el estudio de diversidad genética en varios organismos, el análisis de la base genética para la búsqueda de resistencia a enfermedades (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012; Adhikari y Missaoui, 2019; Aguirre et al., 2019) y la caracterización de patógenos como *Puccinia triticina* (Aoun et al., 2020) y *V. dahliae* (Rafiei et al., 2018; Dung et al., 2019).

GBS implica la secuenciación de fragmentos de ADN generados por la digestión parcial del genoma, produciendo fragmentos más cortos, menos específicos y distribuidos a lo largo del genoma. Por otro lado, ddRADseq permite seleccionar fragmentos específicos utilizando dos enzimas de restricción, generando fragmentos de tamaño más uniforme y específico a lo largo de todo el genoma. Esta última técnica se destaca por su selectividad en regiones particulares del genoma y mayor reproducibilidad de fragmentos.

La metodología de ddRADseq implica la selección cuidadosa de dos enzimas de restricción diferentes y la selección de un tamaño de fragmento específico, en combinación con el uso de adaptadores identificados por “*barcodes*” (códigos de barras) para componer bibliotecas multiplexadas de muestras listas para ser secuenciadas con tecnologías NGS (Suyama & Matsuki, 2015). Este proceso permite identificar y genotipar simultáneamente miles de loci distribuidos por todo el genoma, proporcionando una perspectiva genómica a los genotipos analizados. Elshire et al. (2011) sostienen que reducir la complejidad del genoma con enzimas de restricción es fácil, rápido, extremadamente específico, altamente reproducible y facilita abordar regiones importantes del genoma inaccesibles para los enfoques de captura de secuencias. Además, Poland et al. (2012) afirman que la técnica se centra en las secuencias

genómicas que son flanqueadas por los sitios de restricción enzimática con el objetivo de lograr una representación reducida del genoma.

DdRADseq es una técnica de bajo costo utilizados para lograr una secuencia de baja complejidad de todo el genoma al dirigirse a subconjuntos de regiones genómicas (Elshire et al., 2011; Poland & Rife, 2012; Aguirre et al., 2019). La disminución del costo por muestra en la secuenciación se atribuye a las capacidades de multiplexado posibilitadas por las combinaciones de adaptadores con códigos de barras (*barcodes*) e iniciadores indexados de PCR para secuenciación. Estas ventajas de las técnicas de secuenciación masiva, junto con la simplificación del genoma mediante la selección de fragmentos de restricción, facilitan la orientación de la secuenciación hacia regiones aleatorias distribuidas de manera uniforme en todo el genoma y a lo largo de diferentes genotipos (Peterson et al., 2012). Además, estas herramientas permiten llevar a cabo diversos estudios a nivel poblacional sin necesidad de poseer información genómica previa de la especie; son aplicables incluso en organismos no modelo. Todo esto se logra a un costo menor en comparación con el uso de microarreglos, ya que no requiere el desarrollo de un chip (Davey et al., 2011; Andrews et al., 2016).

Los estudios de genética poblacional requieren un alto número de marcadores para realizar inferencias confiables sobre la relación genética de diferentes grupos poblacionales (Aoun et al., 2020). DdRADseq se utiliza para la identificar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *single nucleotide polymorphisms*) en todo el genoma (Leboldus et al., 2014), repeticiones de secuencia simple o microsatélites (SSR) (Vartia et al., 2016), e inter-repeticiones de secuencia simple (ISSR) (Suyama & Matsuki, 2015). Tanto SNP, SRR como ISSR son marcadores que ofrecen capacidades de automatización mejoradas y una cobertura genómica integral. Un SNP se define como una variación de una base nucleotídica entre dos secuencias de ADN. Aunque teóricamente las variantes de tipo SNP podrían involucrar a cualquiera de las cuatro bases nitrogenadas (A, T, G o C), en la práctica se consideran principalmente dos alelos

para un locus específico. Esto se debe a que la probabilidad de encontrar dos mutaciones puntuales en la misma posición del genoma es extremadamente baja. Por consiguiente, la información proporcionada por estos marcadores se clasifica como bialélica. Esto, que en principio es una desventaja, se ve contrarrestado por la gran abundancia y estabilidad de los SNPs respecto de los SSRs (Oraguzie & Wilcox, 2007). Los SNPs, se distinguen por su naturaleza codominante y su amplia distribución en todo el genoma, presentando una ventaja notable sobre el resto de los marcadores (Garcia et al., 2013).

Debido a que la estructura de la población de *D. helianthi* no se ha investigado en Argentina, quedan sin abordar cuestiones importantes con respecto a la diversidad genética. En este trabajo, se utilizó la técnica de ddRADseq para identificar SNP en bibliotecas de diferentes aislamientos de *D. helianthi*, y de este modo evaluar la diversidad genética dentro de la población de *D. helianthi* de la región girasolera semiárida pampeana de Argentina.

Materiales y Métodos

Para la selección de aislamientos de *D. helianthi* se consideró el tejido de origen y la localización geográfica de cada aislamiento (Tabla N° 14).

Tabla N° 14. Aislamientos de *D. helianthi* a ser genotipificados mediante ddRADseq.

Aislamiento	Año de Aislamiento	Órgano de procedencia	Localidad
1	2020	Tallo	Trenque Lauquen, Buenos Aires
3	2020	Tallo	Trenque Lauquen, Buenos Aires
10	2020	Tallo	Mari Lauquen, Buenos Aires
15	2020	Capítulo	Maisonave, La Pampa
20	2020	Tallo	Realicó, La Pampa
29	2020	Tallo	Adolfo Van Praet, La Pampa
34	2020	Tallo	Ojeda, La Pampa
35	2020	Tallo	Ojeda, La Pampa
36	2020	Tallo	Adolfo Van Praet, La Pampa

Aislamiento	Año de Aislamiento	Órgano de procedencia	Localidad
41	2020	Capítulo	Vértiz, La Pampa
48	2020	Tallo	Villa Mirasol, La Pampa
53	2020	Tallo	Catriló, La Pampa
60	2020	Capítulo	Catriló, La Pampa
66	2020	Tallo	Miguel Cané, La Pampa
71	2020	Capítulo	Quemú Quemú, La Pampa
135	2020	Tallo	Garré, Buenos Aires
143	2020	Capítulo	Garré, Buenos Aires
153	2020	Tallo	Trenque Lauquen, Buenos Aires
164	2020	Tallo	Pellegrini, Buenos Aires
167	2021	Capítulo	Gral. Pico, La Pampa
169	2021	Tallo	Gral. Pico, La Pampa
170	2021	Tallo	Agustoni, La Pampa
172	2021	Capítulo	Anguil, La Pampa
182	2021	Capítulo	Vértiz, La Pampa
182b	2021	Capítulo	Vértiz, La Pampa
186	2021	Tallo	Ojeda, La Pampa
191	2021	Tallo	Ojeda, La Pampa
194	2021	Tallo	Adolfo Van Praet, La Pampa
212	2021	Tallo	Ingeniero Luiggi, La Pampa
227	2021	Tallo	Alta Italia, La Pampa
230	2021	Capítulo	Alta Italia, La Pampa
251	2021	Capítulo	Metileo, La Pampa
259	2021	Capítulo	Anguil, La Pampa
265	2021	Capítulo	Uriburu, La Pampa
272	2021	Tallo	Uriburu, La Pampa
277	2021	Tallo	Trenque Lauquen, Buenos Aires
280	2021	Capítulo	Catriló, La Pampa
282	2021	Tallo	Relmo, La Pampa
292	2021	Capítulo	Quemú Quemú, La Pampa
299	2021	Capítulo	Trili, La Pampa
324	2021	Tallo	Quenumá, Buenos Aires
343	2021	Tallo	Salliqueló, Buenos Aires
354	2021	Tallo	Casbas, Buenos Aires
380	2021	Capítulo	Trenque Lauquen, Buenos Aires
385	2021	Capítulo	Mari Lauquen, Buenos Aires
388	2021	Tallo	Bocayuva, Buenos Aires
390	2021	Capítulo	Bocayuva, Buenos Aires
390b	2021	Capítulo	Bocayuva, Buenos Aires
401	2022	Tallo	Anguil, La Pampa

Extracción de ADN

Se extrajo ADN a partir de 300/400 mg de micelio raspado con un bisturí desde placas de cultivo en APG (cultivos incubados 10 d, 25 °C) siguiendo el protocolo de Dellaporta et al. (1983) como se indicó en el Capítulo I.

La calidad del ADN extraído se evaluó mediante corridas electroforéticas en gel de agarosa 0,8 % p/v (TAE 1X: Tris-Acetato pH 8,5 20 mM, EDTA 1 mM), de acuerdo con lo descrito por Sambrook et al. (1989). La concentración de bromuro de etidio (BrEt) utilizada fue de 0,3 µg/ml y el volumen de muestra se mezcló con solución de siembra (1/6) bromophenolblue 0,25 % p/v. Para la corrida electroforética se aplicó voltaje constante entre 1 y 5 V/cm. Para la visualización del ADN se empleó un sistema de adquisición de imágenes provisto de un transiluminador de luz UV (320 nm) con cámara incorporada (GEL DOC XR System, BioRad). La cuantificación de ADN se realizó por medio de 3 metodologías:

-Espectrofotometría de luz UV (NanoDrop ND-100 spectrophotometer, NanoDrop Technologies). Este equipo estima la concentración a partir de la absorbancia (A) a 260 nm, asumiendo que $A(260\text{ nm}) = 1$ equivale a 40 µg/ml de ADN; además, calcula la relación $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, al tener en cuenta que el pico máximo de absorción de las proteínas y otros contaminantes es 280 nm y la relación $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$, (distintos polifenoles absorben a 230 nm); de este modo una relación cercana a 2 indica una buena calidad y pureza de la muestra de ADN.

-Fluorometría, Fluorómetro Qubit® 2.0 con el protocolo Qubit™ dsDNA BR Assay Kit. El kit provee los reactivos fluorescentes, los estándares de peso molecular a ser empleados para la calibración y el *buffer* de dilución. Una alícuota de 2 µL de la solución de ADN se diluye a un volumen final de 200 µL con el *buffer* de dilución y el fluoróforo Qubit™ dsDNA BR. El ensayo es específico para medir ADN de doble cadena en un rango de concentraciones entre 100 pg/µL y 1000 ng/µL.

-La cuantificación de ácidos nucleicos en los pasos intermedios de la construcción de las bibliotecas ddRADSeq se realizó con un fluorómetro FluorStar Optima (BMG-LABTECH) que permite el uso de placas en el formato de 96 y 384 pocillos.

Implementación del método de ddRADseq

Evaluación de enzimas y rango de selección de tamaño: Se realizaron digestiones *in silico* del genoma de referencia de *D. helianthi*, Baroncelli et al. (2016) (disponible en NCBI) para evaluar el conjunto óptimo de enzimas de restricción y el número de fragmentos de ADN que las combinaciones producen. Se examinaron todas las combinaciones posibles con las enzimas SphI, MboI, PstI y EcoRI, debido a su disponibilidad en la Unidad de Genómica de Instituto de Biotecnología de INTA Castelar. Las simulaciones se realizaron con el paquete SimRAD (Lepais et al., 2014). Previo a la restricción, la concentración de los ADN debió ser ajustada a 10 ng/μL para todas las muestras realizando cuantificaciones de las diluciones preparadas con el Fluorómetro Qubit.

Digestión: Se digirieron los ADNg utilizando PstI y MboI (2,4 U por enzima, New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA, EE. UU.) y se incubaron a 37 °C durante 90 mín. La reacción se inactivó a 65 °C durante 20 min y se purificó con 1,5 volúmenes de perlas Ampure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.). En este punto, se evaluó la digestión completa de ADNg mediante electroforesis en un equipo Fragment Analyzer System (Advanced Analytical Technologies, Inc.). Se esperaba una población de fragmentos distribuidos homogéneamente de menos de aproximadamente 3 kb.

Ligación: se utilizaron los adaptadores comunes (oligonucleótidos de doble cadena) publicados por Peterson et al. (2014) y modificados por Aguirre et al. (2019). La unión final se realizó utilizando 2 pmol y 5 pmol de A1 y A2, respectivamente, y 2,4 unidades Weiss de T4 ADN ligasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). La reacción se incubó

durante un período de 1 hora a 23 °C, seguido de una incubación adicional durante 1 hora a 20 °C; la reacción se inactivó durante 20 min a 65 °C.

PCR: se usaron para las reacciones los adaptadores de doble índice diseñados por Lange et al. (2014). Estos tienen una porción para secuenciar en las plataformas Illumina más un índice (8 pb), que permite la identificación de cada biblioteca. Se utilizó ADN polimerasa de alta fidelidad NEB Phusion con los siguientes parámetros de ciclo: 3 min de desnaturalización inicial (95 °C), 10 ciclos de amplificación (30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 45 s a 72 °C), y 2 min de una extensión final (72 °C).

Pooling: después de agregar los cebadores indexados por PCR, las bibliotecas obtenidas se agruparon en función de la concentración (según el análisis del fluorómetro Qubit 2.0) y se concentraron en un SpeedVac (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Selección de tamaño: El "tamaño promedio de inserción" se refiere al tamaño medio de los fragmentos de ADN que se seleccionaron para la construcción de la biblioteca de secuenciación de nueva generación (NGS). Se aplicó una selección de tamaño manual (un rango entre 450 y 550 pb, que corresponde al tamaño del fragmento de ADN de interés entre 310 y 410 pb) en electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de bajo punto de fusión (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Los fragmentos seleccionados se purificaron del gel con el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen N.V., Hilden, Alemania). Este rango de tamaño es adecuado para la amplificación de puente en plataformas Illumina y permite una superposición mínima de lecturas pareadas (PE) de 150 pb o más.

Secuenciación: La secuenciación de la biblioteca se realizó en un secuenciador Novaseq 6000 (Illumina). Se utilizó un kit de secuenciación de mediana productividad, NovaSeq 6000 SP Reagent Kit v1.5 (300 cycles).

Análisis de Datos: Se inspeccionó la calidad y el tamaño de las secuencias usando FastQC v0.12.0 (Babraham Bioinformatics) y MultiQC (Ewels et al., 2016). Se

removieron los adaptadores y se realizó el *trimming* usando Cutadapt v1.14 (Martin, 2011). Se mapearon las secuencias usando BWA (Li, 2013) contra el genoma de referencia (Baroncelli et al., 2016), siguiendo los parámetros por default del programa. Los archivos de mapeo se convirtieron a formato binario usando el programa SamTools (Li et al., 2009; Danecek et al., 2021; SamTools). Para el llamado de variantes se utilizó software Stacks (v1.48, University of Oregon, Eugene, OR, EE. UU.).

Finalmente, se ejecutó el *pipeline* Populations obteniéndose el archivo VCF (variant call format) para los SNPs. Las posiciones se filtraron utilizando bcftools view (Li et al., 2009; Danecek et al., 2021; SamTools) utilizando los parámetros: QUAL (calidad de los datos), F_MISSING (datos faltantes) y FORMAT/DP (profundidad de secuenciación). Se ejecutaron diferentes líneas de comandos que respondieron a diferentes combinaciones de profundidad de secuenciación y datos faltantes.

Análisis filogenético y estructura poblacional

La reconstrucción filogenética a partir de los datos obtenidos de ddRADseq se estimó usando el software RAxML (Kozlov et al., 2019) agregando el único genoma de *D. helianthi* disponible en GenBank. Para corregir los desvíos conocidos como “*ascertainment bias*” introducidos en las matrices de SNP durante su construcción (Lachance & Tishkoff, 2013) se utilizó el modelo GTR opción Lewis (Tamuri & Goldman, 2017). La historia evolutiva de los taxones se representó por los árboles que alcanzaron la máxima probabilidad. El soporte estadístico de las ramas internas de los árboles generados se calculó como porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba *bootstrap* (1000 réplicas). Las ramas correspondientes a las particiones reproducidas en menos del 50 % de las réplicas se colapsaron (Felsenstein 1985), usando el software online iTOL v.5 (Letunic & Bork, 2021).

Para calcular los coeficientes de mezcla (“*admixture*”) individual se utilizó el algoritmo de Factorización de Matrices No negativas dispersas (sNMF) implementado en el paquete LEA (Frichot y François, 2015) diseñado para trabajar con grandes conjuntos de datos genómicos. Para ello los archivos VCF se importaron a R usando el paquete vcfR v.1.13.0 (Knaus y Grünwald 2017). El método sNMF se desarrolló para estimar la ascendencia de forma independiente para cada individuo y no requiere supuestos previos sobre la pertenencia a la población. Se utilizó el criterio de entropía cruzada de la función sNMF para probar varias poblaciones putativas (K) que van desde K=1 hasta K=15. Para cada K se fijó el número de ejecuciones en 10, alfa en 10, tolerancia en 10⁻⁵ y el número de interacciones en 200 (Alexander y Lange, 2011; Frichot et al., 2014). Es importante mencionar que los tres aislamientos (180b, 343 y 390b) utilizados en la primera prueba de ddRADseq no se incluyeron en el análisis de estructura poblacional debido a que en la primera aproximación se obtuvo una menor profundidad de secuenciación respecto al resto de los aislamientos (Tabla N° 19).

Resultados

Extracción de ADN

Se llevó a cabo la extracción de ADN de 49 aislamientos fúngicos. En comparación con el Capítulo I, se duplicó la cantidad de micelio utilizado como insumo, con el objetivo de obtener concentraciones de ADN superiores a 600 ng/μL, con parámetros de calidad A260 nm/A280 nm y A260 nm/A230 nm en un rango de 1,75 a 2. La Figura N° 19 muestra la cantidad y calidad del ADN obtenido antes y después del tratamiento con RNAsa.

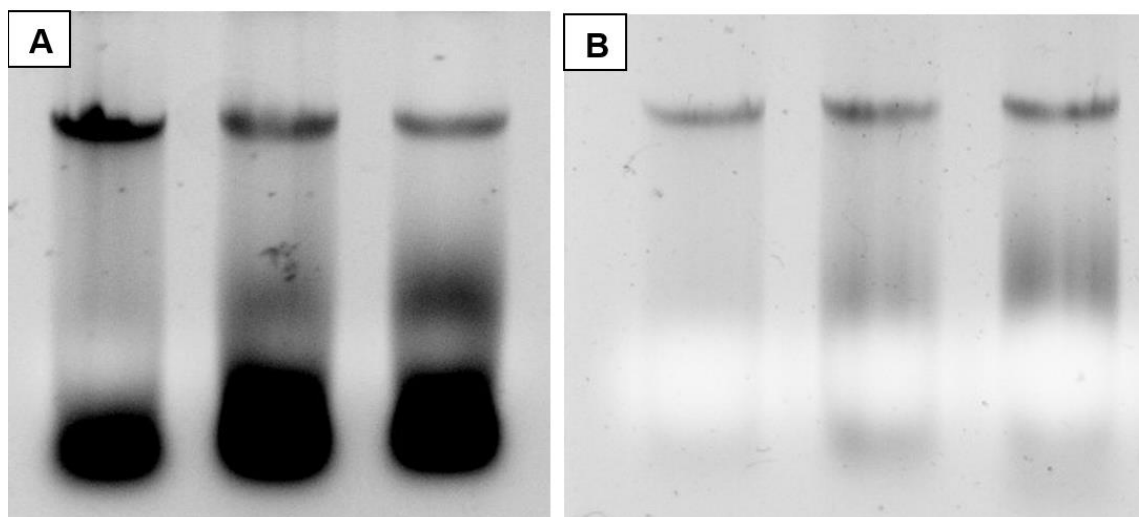


Figura N° 19. ADN genómicos en gel de agarosa observados con transiluminador de luz UV con cámara incorporada (GEL DOC XR System, BioRad). A. Extracciones de ADN previas al tratamiento con ARNasa. B. Extracciones de ADN luego del tratamiento con ARNasa.

Implementación del método de ddRADseq

La elección de la combinación de enzimas de restricción PstI-MboI (Peterson et al., 2014 y Scaglione et al., 2015) se fundamentó en la capacidad para generar la mayor cantidad de fragmentos del genoma de referencia en el rango de 300 a 400 pares de bases (pb). La simulación de la digestión en el genoma de referencia resultó en la obtención de un total de 18578 fragmentos en los tamaños mencionados para la combinación de enzimas PstI-MboI (Figura N° 20).

Resultados obtenidos para las demás combinaciones: Sph-MboI 2392 fragmentos, PstI-EcoRI 1878 fragmentos, PstI-MspI 3092 fragmentos, PstI-Sph 874 fragmentos, MboI-EcoRI 10972 fragmentos, MboI-MspI 13058 fragmentos, Sph-EcoRI 1603 fragmentos, Sph-MspI 15138 fragmentos y EcoRI-MspI 5372 fragmentos (Apéndice II).

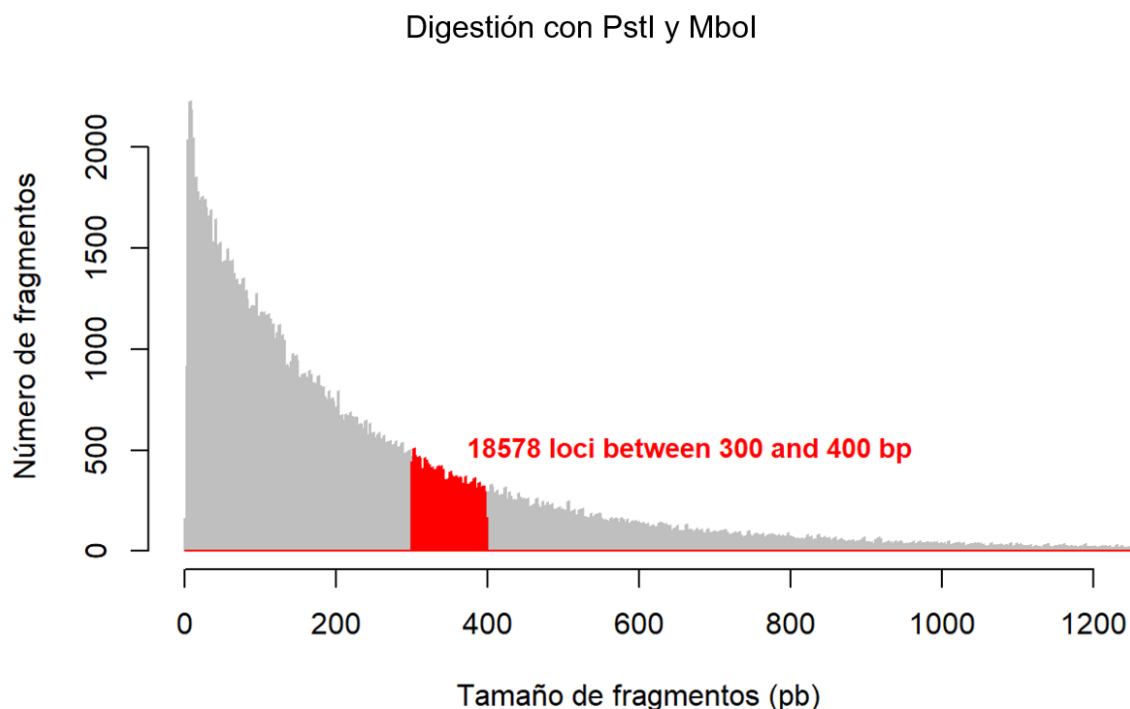


Figura N° 20. Gráfico de digestión *in silico* sobre el genoma disponible de *D. helianthi* para las enzimas de restricción PstI-MboI. Se observa el número de loci en función del tamaño de los locus generados con este par de enzimas.

La estrategia de ddRADseq se implementó sobre un total de 49 aislamientos de *D. helianthi* (Tabla N° 14). En el Apéndice III, se muestran las extracciones de ADN y las digestiones correspondientes a cada aislamiento. Si bien la pureza del ADN fue alta, la integridad del mismo se vio comprometida en algunos casos.

En la Figura N° 21 se presenta el tamaño final de las bibliotecas agrupadas en una única muestra. Se observa que el valor medio de las bibliotecas secuenciadas fue de 457 pares de bases.

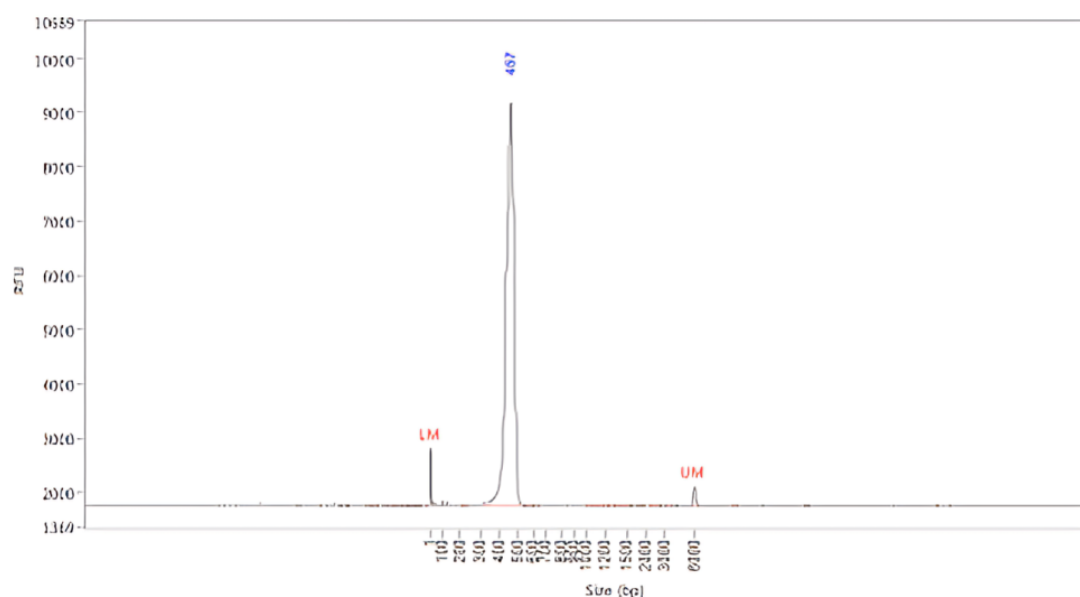


Figura N° 21. Calidad de las bibliotecas empleadas para ddRADseq.

La Figura N° 22 muestra la cantidad de secuencias obtenidas para cada uno de los 49 aislamientos estudiados. Además, se observa qué lecturas fueron únicas y qué lecturas estuvieron duplicadas. El promedio de secuencias obtenidas para cada aislamiento fue de 4,2 millones, con máximos de 10 millones de secuencias a mínimos de aproximadamente un millón de secuencias obtenidas para una muestra.

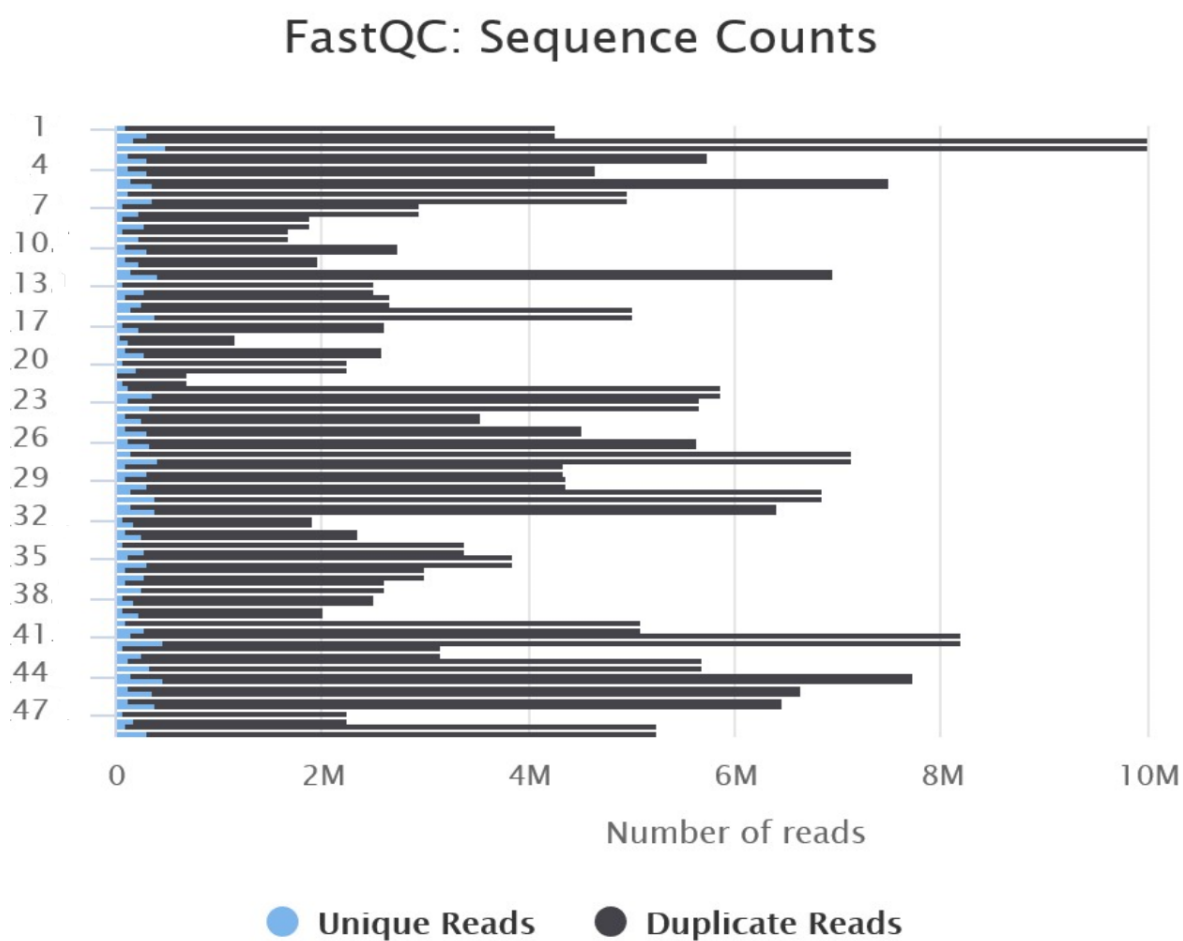


Figura N° 22. Cantidad de secuencias obtenidas al final de la corrida para cada aislamiento usando FASTQC.

En la Figura N° 23, se muestra la calidad de las secuencias obtenidas para cada aislamiento expresado en valor *Phred* promedio para cada una de las posiciones. Se destaca que el valor *Phred* promedio para cada posición de las secuencias estudiadas estuvo por encima del valor umbral de 30.



Figura N° 23. Calidad promedio de cada base de las secuencias obtenidas usando FASTQC.

En la Figura N° 24, se muestra la distribución del contenido de guanina y citocina, expresado en porcentaje, de las secuencias obtenidas para cada aislamiento. Se usó el software FASTQC. El pico máximo de la distribución se encontró alrededor del 56% de GC.

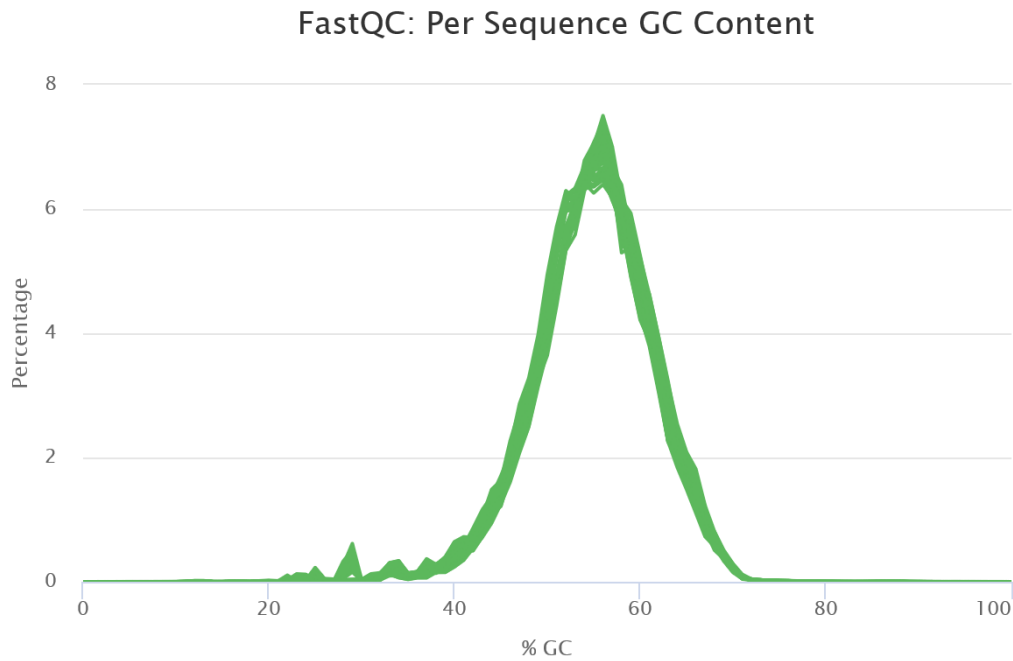


Figura N° 24. Distribución del contenido de GC en las lecturas de secuenciación de la biblioteca.

El llamado de variantes a partir del software Stacks, usando genoma de referencia, se implementó aplicando filtros para controlar la profundidad de secuenciación en cada posición combinado con un porcentaje bajo o nulo de datos faltantes, y por lo tanto se obtuvieron matrices de datos de diferente dimensión. Brevemente, cuando la profundidad de secuenciación se estableció en valores de 2, 3, 5 y 8 se obtuvieron matrices de 1066, 764 y 449, 224 SNPs sin datos faltantes. Cuando se permitió hasta un dos por ciento de datos faltantes para los valores de profundidad de 3 y 5, se obtuvieron matrices de 1212 y 581 SNPs.

Análisis filogenético y estructura poblacional

Se obtuvieron árboles filogenéticos a partir de los SNPs resultantes de cada una de las matrices de datos obtenidas en el punto anterior. Los árboles obtenidos para cada caso brindaron la misma información independientemente de la dimensión de la matriz de datos. En la Figura N° 25, se presenta el árbol de máxima verosimilitud basado en los 1066 SNPs obtenidos con una profundidad de secuenciación de 2.

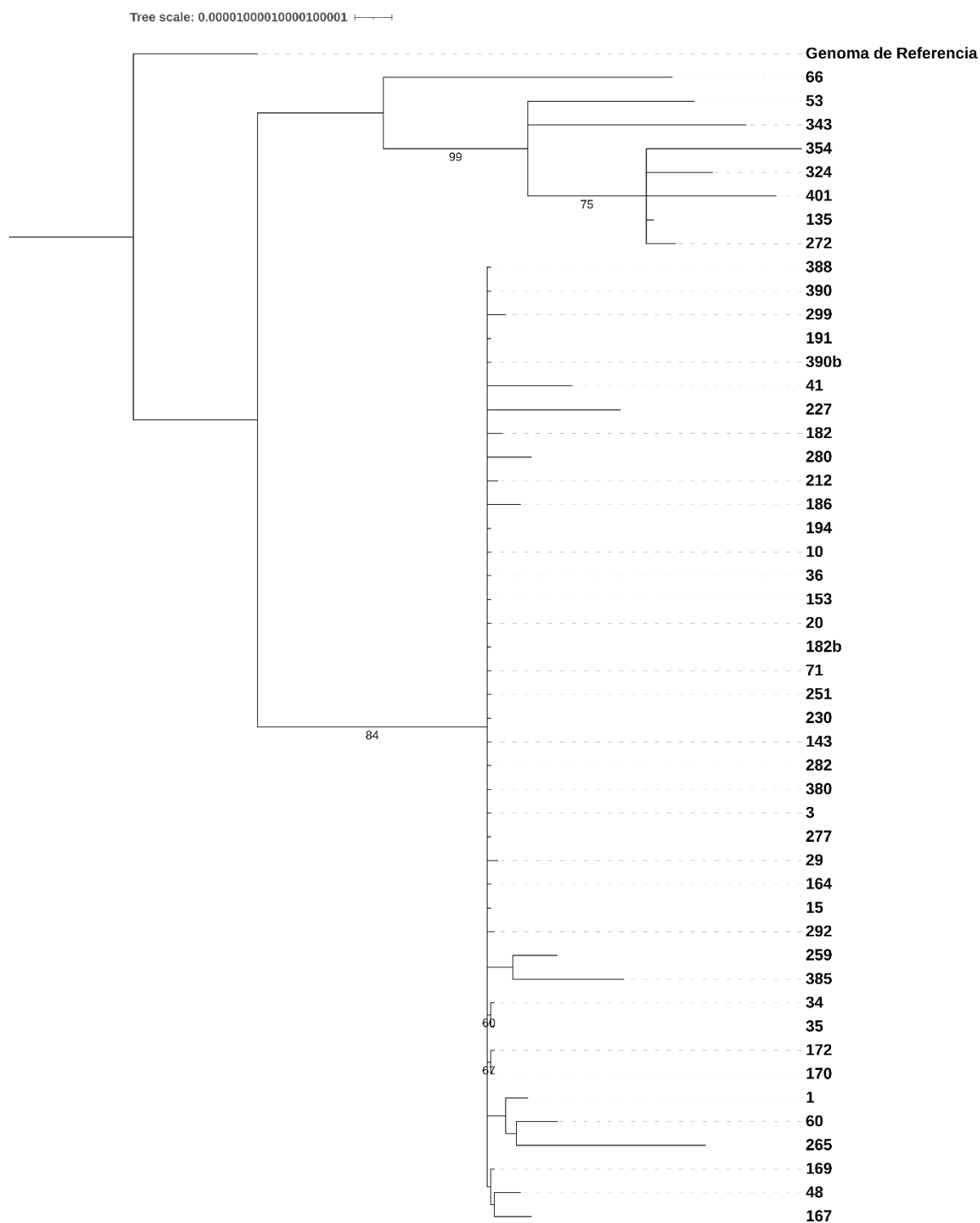


Figura N° 25. Árbol de máxima verosimilitud basado en los 1066 SNPs obtenidos con una profundidad de secuenciación de 2. Se muestran los valores de *bootstrap* por encima del 60 %. Ramas menores a 50 % de soporte de *bootstrap* colapsadas.

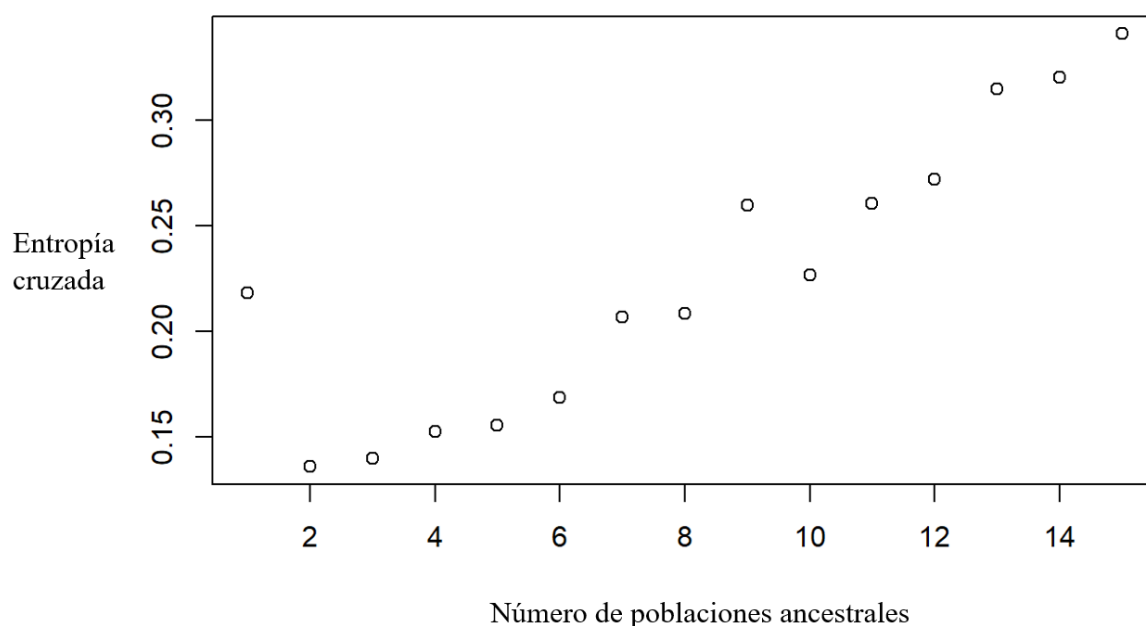


Figura N° 26. Número de poblaciones ancestrales hipotéticas para el conjunto de aislamientos utilizados en el análisis filogenético (incluido el genoma de referencia), según la inferencia del criterio de entropía cruzada de la función de Factorización de Matrices No negativas dispersas (sNMF) para $k=1$ a $k=15$ (k : número de poblaciones ancestrales).

Se realizó la estimación de los coeficientes de ascendencia utilizando sNMF y se determinó la menor entropía para k igual a 2 (Figura N° 26). También se observó bajo nivel de entropía para k igual a 3 y k igual a 4.

En el marco de la factorización de matrices no negativas dispersas, se buscó minimizar tanto la función de pérdida (ajuste del modelo) como la entropía de la solución. La regla de la rodilla sugiere que el punto óptimo se encuentra en la región donde un pequeño avance en un objetivo conlleva a un significativo deterioro en el otro. En consecuencia, se optó por seleccionar el nivel de entropía más bajo, ya que aumentos adicionales no generan mejoras sustanciales en el ajuste del modelo. Este enfoque permitió identificar una solución de factorización razonable que logra un equilibrio entre la simplicidad del

modelo y su precisión (Branke et al., 2004). A través de la aplicación de esta regla, se justificó la elección de dos poblaciones ancestrales hipotéticas debido a su menor entropía (Figura N° 27). Sin embargo, también se investigaron tres y cuatro poblaciones ancestrales hipotéticas debido a sus bajos niveles de entropía, con el objetivo de determinar su capacidad informativa (Figuras N° 28 y 29).

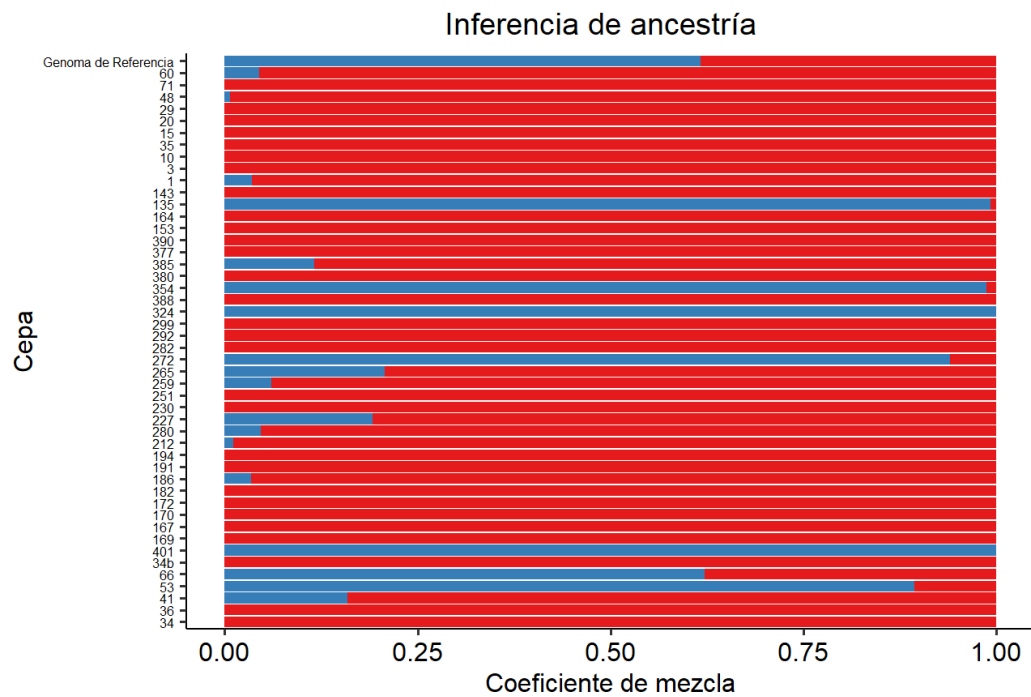


Figura N° 27. Proporciones de ascendencia ($k=2$) de 1066 SNPs de aislamientos de *D. helianthi* según el análisis de sNMF. Los colores indican distintas poblaciones ancestrales hipotéticas.

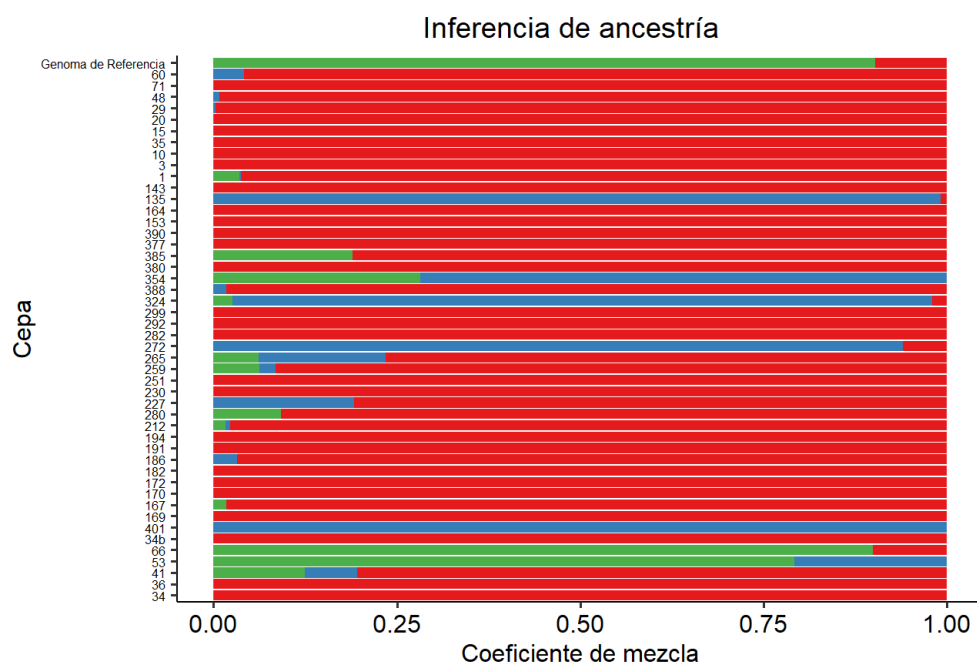


Figura N° 28. Proporciones de ascendencia (k=3) de 1066 SNPs de aislamientos de *D. helianthi* según el análisis de sNMF. Los colores indican distintas poblaciones ancestrales hipotéticas.

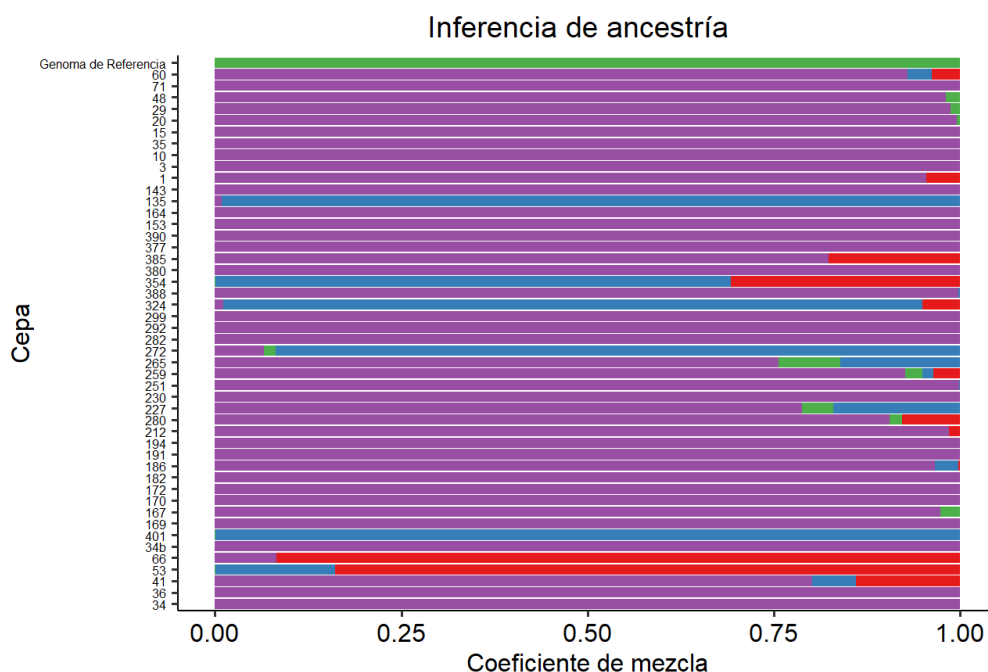


Figura N° 29. Proporciones de ascendencia (k=4) de 1066 SNPs de aislamientos de *D. helianthi* según el análisis de sNMF. Los colores indican distintas poblaciones ancestrales hipotéticas.

Los resultados de las inferencias de ascendencia revelan que, en el contexto de diversas poblaciones ancestrales hipotéticas, el subconjunto de aislamientos que se distingue en el análisis filogenético (aislamientos: 53; 66; 135; 272; 324; 354 y 401) siempre coincide con aquellos que derivan de una población ancestral distinta. El subconjunto mayor de aislamientos permanece consistentemente dentro de la misma población ancestral, incluso al aumentar el valor de k . Es crucial destacar que, al analizar cuatro poblaciones ancestrales hipotéticas, el genoma de referencia emergió como el único representante de una de esas poblaciones, señalando una diferencia significativa respecto al resto de los aislamientos estudiados.

Discusión

Los métodos de reducción de complejidad del genoma, basados en el secuenciamiento de ADN de fragmentos seleccionados por sitios de restricción, son cada vez más frecuentes para generar datos de diversidad genética a nivel poblacional en distintas especies, fundamentalmente en aquellas que carecen de información genómica de dominio público (Parchman et al., 2018). Dentro de las técnicas NGS, el ddRADseq utiliza un par de enzimas de restricción, una de corte raro (es decir, una enzima con un sitio de reconocimiento de más de 4 pares de bases) y una de corte frecuente, disminuyendo así el subconjunto de fragmentos muestreados respecto a otros métodos que usan una única enzima de restricción. La selección de fragmentos a partir de dos sitios de corte y la secuenciación de los fragmentos que contienen únicamente ambos sitios de restricción contribuye a una mayor reproducibilidad de la técnica, un aumento en la cobertura de loci a nivel del genoma, tamaños de fragmentos más grandes y mayor eficiencia en la captura de SNPs (Peterson et al., 2012; Scheben et al., 2017; Aguirre et al., 2019).

En el estudio de *D. helianthi* optamos por aplicar un protocolo optimizado y económico de ddRADseq desarrollado por Aguirre et al. (2023) para generar datos de variabilidad genética a nivel poblacional que permitan analizar el nivel de diversidad de *D. helianthi* en la región semiárida. La disponibilidad de este tipo de datos es bastante limitada en el contexto del género *Diaporthe*. No obstante, se conoce que el complejo *Diaporthe/Phomopsis* se distingue por una considerable variabilidad genotípica y fenotípica (Rehner et al., 1994). En particular, *D. helianthi*, que es un patógeno relativamente reciente, muestra signos de variación y adaptación (Rekab et al., 2004). Estas características fueron observadas tanto en los resultados de variabilidad interespecífica del género *Diaporthe* como en la variabilidad intraespecífica de *D. helianthi* presentados en el Capítulo I. Habiendo identificado a *D. helianthi* como la especie asociada a CT y PSC en la región semiárida, se avanzó en el estudio de la diversidad intraespecífica.

Para seleccionar las enzimas de restricción a aplicar sobre el genoma de *D. helianthi* se utilizó el único genoma disponible públicamente para la especie (Baroncelli et al., 2016) para realizar simulaciones de digestiones *in silico* con diferentes combinaciones de enzimas. Los resultados obtenidos (Apéndice II) indicaron la eficacia de cada combinación de enzimas en la generación de fragmentos dentro del rango deseado (300 a 400 pb). La importancia de este rango de tamaño reside en su capacidad para garantizar una cobertura significativa del genoma y asegurar una eficiente y precisa secuenciación en plataformas de secuenciación de tecnología Illumina. Esta estrategia optimizada contribuye a la calidad y confiabilidad de los resultados en el estudio genómico. Las simulaciones realizadas permitieron preseleccionar las enzimas a emplear en la técnica de ddRADseq.

La implementación de la técnica de ddRAD requiere de ADN de buena calidad. La metodología establecida para *Diaporthe* spp. en el Capítulo I demostró ser eficiente para la amplificación por PCR y secuenciación Sanger. Por lo que el mismo protocolo de

extracción de ADN se aplicó sobre muestras de micelio de 49 aislamientos de *D. helianthi* para ddRADseq. El aumento de la masa de micelio buscó obtener la cantidad de ADN de alta calidad requerida para ddRADseq, y así superar los procesos de digestión y purificación (Aguirre et al., 2023). Con este incremento, la cantidad de ADN obtenida resultó adecuada para llevar adelante el protocolo de ddRAD. No obstante, se observaron diferentes niveles de degradación en las muestras de ADN. Es conocido que un ADN muy degradado limita el rendimiento de la técnica de genotipificación por reducción del número de fragmentos con los dos sitios de restricción por individuo, del número de sitios variables y del porcentaje de fragmentos idénticos retenidos durante el proceso de llamado de alelos (Graham et al., 2015). En el caso particular del ADN de los aislamientos de *Diaporthe*, los resultados obtenidos fueron variables entre los diferentes aislamientos en relación con la pureza e integridad de los mismos (Apéndice III). Esto posiblemente se debió al origen de la muestra, que proviene del micelio recuperado de cultivos en medio agarizado. Se resolvió, a expensas de la potencial pérdida de eficiencia, continuar con la implementación de ddRADseq para obtener un número de SNP que permitiese estudiar la diversidad de la especie *D. helianthi*. El procesamiento de las muestras según el diseño establecido permitió obtener bibliotecas (ddRAD) de alta calidad, como puede observarse en los controles (Figura N° 35, Apéndice III). Los resultados de la secuenciación presentaron una amplia variabilidad en el número de secuencias obtenidas para cada aislamiento cubriendo un rango de 1,2 a 10 millones de lecturas (Apéndice IV). Esta variabilidad podría deberse a la calidad y cantidad de ADN obtenidas para cada aislamiento. Sin embargo, el aspecto más destacado fue que las secuencias obtenidas presentaron una calidad de secuenciación que superó el umbral *Phred* establecido en 30. Por otro lado, para hongos de tamaño de genoma similar, Leboldus et al. (2014) reportaron que una cobertura de 80 mil secuencias por aislamiento era necesaria para lograr menos de un 15% de datos perdidos. En el caso de esta Tesis, el menor número de lecturas por aislamiento fue de 1,2 millones, esto posibilitó lograr distintos tamaños de matrices de SNP sin datos

perdidos. Como parte del control de calidad de las lecturas, se chequeó la presencia de ambos sitios de restricción, se filtró por calidad y se analizó la distribución del contenido de GC en las lecturas de secuenciación para descartar contaminaciones de ADN foráneo en el proceso. El contenido de GC estimado para las muestras analizadas en este trabajo coincidió con lo reportado por Baroncelli et al. (2016) para la cepa: *D. helianthi* 7/96. Todo esto garantizó que el proceso de secuenciación se desarrollara de manera exitosa para asegurar la identificación de loci de alta calidad en el llamado de variantes.

Para el llamado de variantes SNP, atendiendo la limitante de la integridad del ADN de partida, se optó por la estrategia más conservadora que ofrece el programa Stacks, que fue la de trabajar con un genoma de referencia. Stacks (Catchen et al., 2011; Catchen et al., 2013) es uno de los paquetes de software que funciona igual de bien cuando se trabaja con o sin un genoma de referencia. Este software fue desarrollado principalmente para organismos sin genomas de referencia y secuenciación RAD de alta profundidad. Además, Stacks está entre los *pipelines* con alta precisión para el llamado de los SNPs *de novo* (Torkamaneh et al., 2016; Wickland et al., 2017). Como referencia para el llamado de SNP en este trabajo se utilizó el genoma obtenido a partir de la secuenciación NGS de la cepa *D. helianthi* 7/96 (Baroncelli et al., 2016). No obstante, es importante destacar que este genoma no constituye una entidad completa, ya que se compone de 7,376 *scaffolds*. Al utilizarse este genoma de referencia, se garantizó la comparabilidad de los SNPs obtenidos con las posiciones generadas en trabajos previos. La adopción de este criterio conservador resultó fundamental para alcanzar los objetivos propuestos en el contexto de esta investigación.

El desafío asociado a la presencia de datos faltantes puede ser abordado mediante la ampliación de la profundidad de secuenciación, la reducción del nivel de multiplexado y/o la aplicación de estrategias de imputación de datos. No obstante, las dos primeras opciones aumentarían el costo por muestra. Por otro lado, la opción de imputación se

presenta como una alternativa confiable, respaldada por la eficacia demostrada por diversas metodologías en estudios previos (Poland & Rife, 2012; Merino, 2018; Torkamaneh et al., 2018). Si bien la presencia de datos faltantes es una limitante de la técnica, en el presente estudio se usaron filtros muy rigurosos que permitieron identificar SNPs sin datos faltantes o solo con el 2 % de datos perdidos a diferentes niveles de profundidad de lectura por loci. Esto proporcionó información valiosa para el análisis, a pesar de que los ADNs genómicos de partida mostraron niveles moderados a altos de degradación.

El genoma de referencia empleado proviene de una sola cepa que no representaría la extensa diversidad intraespecífica existente dentro de la especie. Asimismo, la baja resolución del genoma reconstruido a nivel de *scaffolds*, impide analizar la distribución a escala de genoma completo de los paneles de marcadores identificados. En este sentido, contar con una referencia genómica reconstruida a nivel de cromosomas, así como de la disponibilidad de múltiples genomas de referencia, de aislamientos y ubicaciones geográficas variadas, serían óptimos para una captura completa de la diversidad genómica de *D. helianthi* en futuros análisis de *pipelines* de ddRADseq. No obstante, el uso del único genoma disponible permitió esta primera aproximación. Sin embargo, sigue siendo relevante la necesidad de generar matrices de datos genotípicos *de novo*, como también desarrollar genomas de referencia adicionales de *D. helianthi*. Esto permitiría investigaciones más sólidas y representativas de la diversidad genómica intraespecífica en el futuro.

Los resultados del análisis filogenético evidenciaron la separación genética entre los aislamientos examinados y el genoma de referencia utilizado, tanto en el árbol de máxima verosimilitud resultante como en las inferencias de ancestría expuestas en este estudio. Esta divergencia indicó la presencia potencial de algún nivel de variabilidad genética entre el genoma de la cepa de referencia y los aislamientos analizados. La inferencia de ancestría respaldó la investigación filogenética realizada mediante los

marcadores obtenidos a través de la técnica de ddRADseq. Aunque ambos estudios partieron de la misma matriz de datos, constituyeron dos análisis completamente independientes y, a su vez, se complementaron mutuamente. Los resultados presentados en el árbol filogenético obtenido a partir de los SNPs, concordaron con los hallazgos de Pecchia et al. (2004), quienes analizaron la diversidad intraespecífica de aislamientos de *D. helianthi* de diferentes orígenes geográficos utilizando secuencias de IGS. Al igual que sus observaciones, nuestros análisis revelaron grupos genéticos distintos dentro de *D. helianthi*. Pecchia et al. (2004) encontraron tres grupos principales que contuvieron aislamientos de Francia/Yugoslavia, Italia, Argentina y Rumania. Las distancias genéticas entre esos grupos sugieren la posible presencia de especies crípticas o taxones subespecíficos dentro de *D. helianthi*. Además, nuestros hallazgos fueron consistentes con las observaciones de SAYS-LESAGE et al. (2002) sobre la diversidad genética de aislamientos de *D. helianthi* de diversas regiones de Francia, donde se identificó variabilidad molecular significativa entre aislamientos mediante el empleo de marcadores AFLP. Por otra parte, nuestros resultados coincidieron con lo reportado por REKAB et al. (2004), quienes identificaron grupos filogenéticamente distintos entre las cepas de *D. helianthi* utilizando secuencias de ITS y RFLPs de mtDNA. Por otro lado, VERGARA et al. (2005), quienes estudiaron elementos extracromosómicos en aislamientos de *D. helianthi* de diferentes orígenes geográficos, describieron diferencias en cuanto a la presencia de elementos extracromosómicos de tamaño similar en todos los aislamientos franceses y yugoslavos, en contraste con los aislamientos italianos donde los plásmidos estaban ausentes o divergentes en tamaño. Nuestros resultados respaldaron la existencia de variabilidad intraespecífica dentro de este patógeno (Figura N° 25); no obstante, estas diferencias no presentaron correlaciones claras con la distribución geográfica. Un análisis genómico adicional con la inclusión de aislamientos de otras áreas geográficas ayudaría a esclarecer la variabilidad encontrada y la estructura de la población dentro de *D. helianthi*.

Conclusiones

La técnica ddRADseq implementada por primera vez en el género *Diaporthe* demostró ser efectiva para detectar polimorfismos y variabilidad genética en la especie *D. helianthi*. La misma constituiría una metodología prometedora para futuros estudios poblacionales y filogenéticos en el género *Diaporthe*.

El alto número de secuencias obtenidas por aislamiento y los criterios aplicados al desarrollo de la estrategia de ddRADseq a partir de ADNs con distintos niveles de degradación condujeron la identificación de SNPs con buen desempeño.

La evidencia reunida en el presente capítulo no permitió discriminar la presencia de taxones subespecíficos dentro de *D. helianthi*.

El origen de los aislamientos de la región semiárida pampeana proviene al menos de dos poblaciones ancestrales diferentes.

Investigaciones futuras deberían ampliar el número de aislamientos estudiados y su distribución geográfica para profundizar en el examen de esta especie tanto a través de estudios *de novo*, como guiados con genomas de referencia. Para representar más ampliamente esta diversidad se requerirían genomas de referencia adicionales de aislamientos contrastantes.

CAPÍTULO III

Análisis de la patogenicidad e interacción hospedante-patógeno de *D. helianthi* en girasol por inoculación artificial

Introducción

El cancro del tallo de girasol es causado por un complejo de especies incluidas en el género *Diaporthe* cuya constitución varía en distintas regiones del mundo. En Argentina, tanto en este trabajo como en el publicado por Mancebo et al. (2019) el CT y la PSC son causados principalmente por la especie *D. helianthi* (Muntañola-Cvetković et al., 1985). Sin embargo, en la región sudeste Zambelli et al. (2020) reportaron la presencia de otras especies que pueden causar CT, entre ellas, *D. gulyae*, *D. kongii*, *D. sojiae*, *D. caulivora* y *D. longicolla*. Además, en el presente trabajo se reportó por primera vez *D. ambigua* como una nueva especie asociada a CT en la región semiárida de Argentina con total ausencia de las especies reportadas por Zambelli et al (2020). La variación cuantitativa de la patogenicidad en hospedantes susceptibles se denomina agresividad (Pariaud et al., 2009). Comprender la agresividad de *D. helianthi* es importante para desarrollar estrategias de manejo, particularmente en lo que se refiere a la incorporación de resistencia mediante mejoramiento genético.

Históricamente, el CT y la PSC no estuvieron dentro de los principales factores limitantes para la producción de girasol en Argentina. Sin embargo, la prevalencia de ambas enfermedades fue en aumento en las últimas campañas. Al mismo tiempo, se informaron reducciones del 50 % en el rendimiento debido al CT en lotes comerciales. En respuesta, empresas e instituciones dentro de las cuales se encuentra el INTA, trabajan en el desarrollo de herramientas de manejo para el cultivo, como el modelo de liberación de ascosporas de *D. helianthi* (Corró Molas et al., 2021), o la búsqueda activa

de genes de resistencia dentro del germoplasma de girasol (Filippi et al., 2022). Cabe destacar que la mejor manera de controlar este patógeno es a través del uso de híbridos de buen comportamiento frente para el CT y PSC (Mihaljcevic et al., 1982).

Dado que el desarrollo fúngico en el tallo del girasol es el resultado de un proceso de infección complejo, la resistencia a este patógeno no es fácil de medir. Si bien las ascosporas son consideradas como la principal fuente de inóculo, la dificultad de producirlas *in vitro* hace que todos los métodos de inoculación desarrollados hasta la actualidad usen micelio como fuente de inóculo. Esto limita la capacidad de los fitopatólogos y mejoradores de plantas para evaluar el germoplasma de girasol en condiciones que imiten de manera óptima el ciclo de la enfermedad (Viguié et al., 1999).

En Argentina, la gran mayoría de los esfuerzos de mejoramiento para CT y PSC se llevaron a cabo en el campo, sometidos a condiciones de infección naturales, donde las ascosporas ingresan directamente por las hojas (Filippi et al., 2022). La infección natural proporcionó una buena discriminación entre genotipos, pero solo en años y en ambientes con alta presión de inóculo (Degener et al., 1999, Filippi et al., 2022). Además, Degener et al. (1999), Langar et al. (2000) y Filippi et al. (2022), describen una respuesta de tipo cuantitativa por parte del germoplasma de girasol, que recorre un rango amplio desde muy susceptible a muy resistente bajo condiciones de infección natural. La gran limitante de la evaluación de híbridos o líneas de mejoramiento en condiciones naturales es su alta dependencia de las condiciones ambientales, además del tiempo de evaluación. Este proceso resulta laborioso y costoso. Por otra parte, esta metodología no discrimina posibles diferencias de agresividad entre cepas de la misma especie y tampoco entre especies diferentes de *Diaporthe* (Mathew et al., 2018). Las técnicas de inoculación artificial en un entorno controlado suelen ser menos costosas, demandar menos tiempo y esfuerzo, y son más fácilmente repetibles.

Por estas razones, varios métodos de inoculación artificial se perfeccionaron para inocular *Diaporthe* spp. en girasoles bajo condiciones controladas y evaluar la

agresividad del patógeno (Bertrand y Tourvieille, 1987; Tourvieille et al., 1988; Encheva y Kiryakov, 2002; Thompson et al., 2011). Si bien se publicaron una gran variedad de métodos que van desde inoculaciones directamente sobre tallo y pecíolo hasta inoculaciones en hoja, los mismos son escasamente reproducibles. Por ejemplo, Encheva y Kiryakov (2002) utilizaron un pequeño tubo plástico que contenía material fúngico tomado de una colonia desarrollada en medio agarizado (*straw test*) para inocular peciolo y posteriormente evaluar la respuesta del girasol a *D. helianthi*. Thompson et al. (2011) utilizaron dos métodos de evaluación (inoculación con heridas y sin heridas) para cuantificar la severidad del CT. El método sin heridas utilizado por Thompson et al. (2011) fue menos invasivo que el de inoculación con heridas. Además, Thompson et al. (2011) desarrollaron una escala de calificación visual de 0 a 5, la cual consideró la decoloración en el sitio de la inoculación, la longitud de la lesión en el tallo, el marchitamiento y el acame o la muerte de la planta. Por otra parte, Herr et al. (1983) examinaron la reacción de 15 aislamientos de *D. helianthi* inoculados en híbridos comerciales de girasol y observaron variaciones en el tamaño de la lesión y la velocidad de la infección. Además, dichos autores observaron que la severidad de los síntomas expresados en híbridos comerciales de girasol inoculados con el mismo aislamiento varió de planta a planta. Este hecho complicó la caracterización fenotípica de los materiales estudiados.

Las pruebas que utilizan la infección artificial de hojas con micelio permiten la detección de diferentes tipos de resistencia a CT (Tourvieille et al., 1988). Durante el mejoramiento relacionado con las enfermedades producidas por *Sclerotinia*, se observaron resistencias independientes en la hoja y el tallo (Castaño et al., 1993). Análogamente para el caso de CT, Tourvieille et al. (1988) y Degener et al. (1999) reportaron que la resistencia genética a la infección en la hoja y en el tallo son caracteres independientes. La longitud de la hoja por sí misma no constituye un factor determinante de la resistencia; no obstante, influye en el avance de la infección, dado que estas suelen

iniciarse en los márgenes foliares (Masirevic y Gulya, 1992). De esta manera, cuanto más larga es la hoja, más demora la enfermedad en avanzar a través de la misma (Degener et al., 1999). La resistencia del tallo a la infección se manifiesta especialmente en el punto de inserción del pecíolo, donde la progresión del patógeno puede ser obstaculizada por las capas externas de la corteza (Bertrand y Trouvieille, 1987; Degener et al., 1999). Por otro lado, Gulya, (1997) y Degener et al. (1999) afirmaron que las lesiones halladas en tallo en genotipos resistentes son más pequeñas y superficiales que las de materiales susceptibles.

A pesar de la disponibilidad de varios métodos de inoculación para estudiar al CT bajo condiciones controladas, se han realizado escasas comparaciones entre los métodos actualmente utilizados. En este contexto, Mathew et al. (2018) llevaron a cabo la comparación de cuatro métodos de inoculación en invernadero a fin de analizar la agresividad de aislamientos de *D. helianthi*. Los métodos sometidos a evaluación comprendieron diversos enfoques de inoculación que implicaron: una incisión sutil en el tallo, un corte con bisturí sobre el tallo, el corte total del pecíolo, y una pequeña incisión sobre el pecíolo. Los resultados indicaron que los cuatro métodos condujeron a una infección exitosa y al desarrollo de lesiones en las plantas. Sin embargo, se observó que el éxito de las infecciones y la recuperación del patógeno a partir de las plantas inoculadas fue significativamente más elevado al emplear una herida sutil en el tallo o un corte en el tallo. A su vez, la provocación de una herida sutil en el tallo generó lesiones de mayor tamaño.

Los objetivos de la investigación presentada en este capítulo consistieron en evaluar y comparar la agresividad de distintos aislamientos de *D. helianthi* mediante inoculaciones en hoja y tallo y analizar su interacción con germoplasma de girasol resistente y susceptible.

Materiales y Métodos

Estudio de la patogenicidad de aislamientos de *Diaporthe*

Con el propósito de explorar la agresividad de *D. helianthi* para producir CT, y de evaluar su interacción con el hospedante se seleccionaron dos híbridos de girasol (ACA 869 DM, susceptible; SYN 3970, resistente) y se realizaron ensayos en dos etapas (Tabla N° 15). La primera etapa consistió en un ensayo bajo condiciones controladas en la que se evaluaron diez aislamientos de *D. helianthi* seleccionados al azar entre los obtenidos en el presente estudio y se inocularon en tallo. En una segunda etapa, se evaluó la capacidad infectiva de dos aislamientos correspondientes a los dos subgrupos de *D. helianthi* identificados en el capítulo II (Figura N° 25). Se realizaron inoculaciones en tallo y hoja, de forma independiente, para explorar la posible presencia de diferentes factores de resistencia en estos tejidos.

Tabla N° 15. Denominación, procedencia y órgano desde donde se obtuvieron los aislamientos de *D. helianthi*.

		Número de Aislamiento	Origen	Órgano de procedencia
Primer Ensayo	1	1	Trenque Lauquen, Bs As	Tallo
	2	20	Realicó, La Pampa	Tallo
	3	36	Vértiz, La Pampa	Tallo
	4	60	Catriló, La Pampa	Capítulo
	5	94	Quenumá, Bs As.	Capítulo
	6	135	Garré, Bs As.	Tallo
	7	212	Ing. Luiggi, La Pampa	Tallo
	8	292	Quemú Quemú, La Pampa	Capítulo
	9	339	Saliquelló, Bs As	Capítulo
	10	390	Bocayuva, Bs As	Capítulo
Segundo Ensayo	1	343	Saliquelló, Bs As	Tallo
	2	390	Bocayuva, Bs As	Capítulo

Los aislamientos de *D. helianthi* se mantuvieron en microtubos de 2 mL a 4°C, hasta su utilización.

Inoculación y Evaluación

Se sembraron tres semillas en macetas circulares de plástico de 10 litros. Cuando las plántulas alcanzaron el estado fenológico V2 se ralearon dejando solo una por maceta. Las macetas se ubicaron en invernadero a temperatura de 22 a 25 °C, humedad superior al 90 %, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 16 horas y se regaron en días alternos.

Para las inoculaciones se priorizó el trabajo con *D. helianthi* por ser la especie predominante (99,7% de los aislamientos obtenidos) y por lo tanto la que causa los daños en la región semiárida. *D. ambigua* se encontró en muy baja frecuencia y sólo en el segundo año de relevamiento.

Los aislamientos de *D. helianthi* utilizados se cultivaron en APG. Los cultivos se incubaron a 25 °C durante un período de 10 días en condiciones de oscuridad. Se extrajeron discos de micelio (7 mm diam.) desde el borde de la colonia.

Se utilizó el método de herida sutil en el tallo (Mathew et al., 2018) para el primer ensayo. En el segundo se practicaron heridas sutiles en el tallo de un grupo de plantas, mientras que en otro grupo se aplicó el método de inoculación en el borde de la hoja (Bertrand y Tourvieille, 1987). Las inoculaciones se realizaron en el estado fenológico V8.

Para el método de inoculación en tallo, se realizó una herida sutil con un microtip (100 µl) entre el tercer y cuarto entrenudo de las plantas de girasol (Mathew et al., 2018). Los discos de micelio se colocaron sobre la herida previamente generada, utilizando una pequeña cantidad de vaselina sólida. Este procedimiento se llevó a cabo mediante el uso de una jeringa especialmente adaptada para tal propósito. Todos los discos de micelio se cubrieron con Parafilm por 7 días para fijar el mismo y evitar su deshidratación.

Al practicar el método de inoculación en el borde de la hoja, los discos se colocaron en el ápice del lado adaxial del limbo. El extremo de la lámina se plegó sobre sí mismo y se aseguró con un clip metálico (Figura N° 32A).

En las plantas control se realizaron heridas en los tallos y se colocó un disco de APG estéril sobre cada herida. El mismo criterio se utilizó en los controles relacionados con el método del borde de la hoja.

Los ensayos se realizaron con un diseño completamente al azar con 30 plantas evaluadas por tratamiento (aislamiento) y el experimento se repitió dos veces. La unidad experimental fue la planta única en cada maceta y cada tratamiento se replicó 30 veces (30 plantas).

En el método de herida en tallo se evaluó el desarrollo de lesiones utilizando una escala de 0 a 5, que resultó de modificar la presentada por Thompson et al. (2011). Los síntomas se evaluaron los días 7°, 14° y 21° posteriores a la inoculación (dpi) sobre la misma unidad experimental (planta de girasol).

Escala: 0 = sin cambio de color en el sitio de inoculación; 1 = aclaramiento tenue en el sitio de inoculación; 2 = coloración parda de hasta 2 cm de longitud; 3 = lesiones necróticas de 2 a 5 cm de longitud, sin necrosis en hojas; 4 = lesiones mayores a 5 cm de longitud, necrosis evidente, marchitamiento y torsión de las hojas; 5 = lesiones de más de 10 cm de longitud, necrosis foliar severa, acame o muerte de la planta.

En el método del borde de la hoja se evaluó la lesión los días 14° y 21° posteriores a la inoculación considerando la longitud del avance de la infección sobre la lámina foliar respecto de la longitud total de dicha lámina (Figura N° 30), cociente que se denominó índice de agresividad (IA).

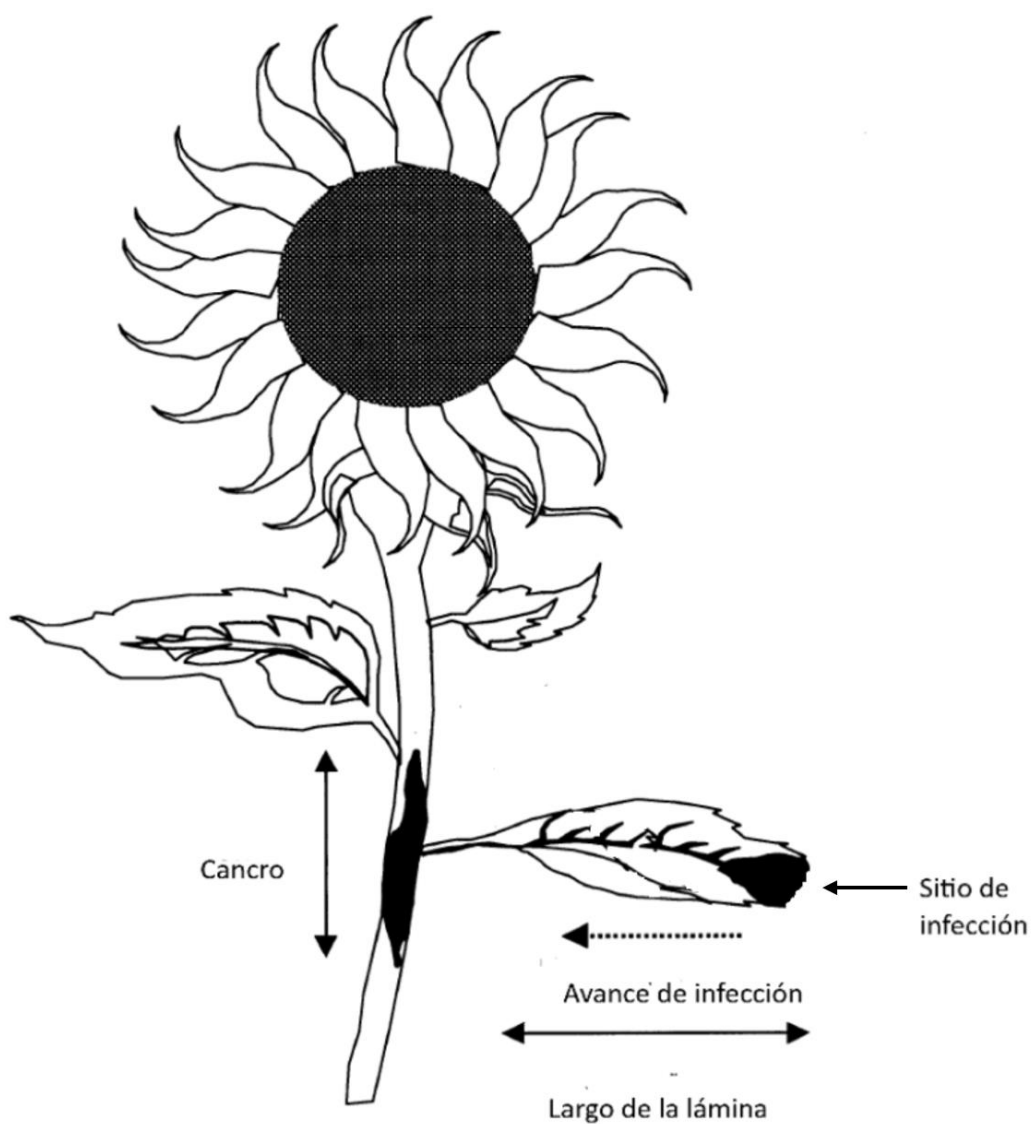


Figura N° 30. Ilustración del avance de la enfermedad. (Imagen modificada de Degener et al., 1999).

Se analizó la varianza de los datos mediante el procedimiento ANOVA y test de comparación de medias LSD Fisher ($\alpha = 0,05$), utilizando el programa estadístico Infostat (versión 2020) (Di Rienzo, 2020).

Postulados de Koch

Los diez aislamientos de *D. helianthi* mencionados para tallo y capítulo, como así también ambos aislamientos seleccionados en función de su filogenia (Tabla N° 15) y el aislamiento de *D. ambigua* se utilizaron en los experimentos conducidos para analizar los postulados de Koch.

Se recolectaron muestras de tejido sintomático 21 días después de la inoculación en tallo, tras realizar la última evaluación. En el caso de las inoculaciones en el borde de la hoja, los tallos se recolectaron 65 días después de la inoculación (Figura N° 31D).

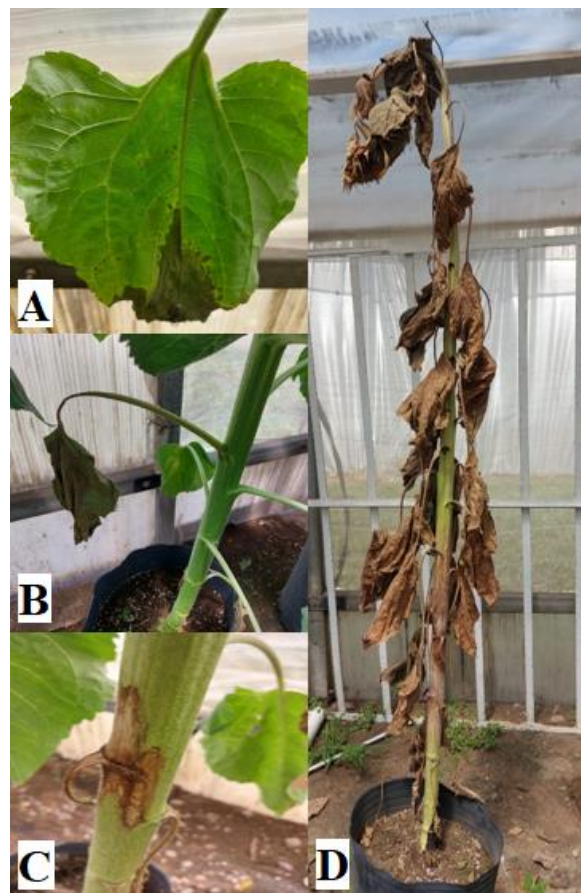


Figura N° 31. Progreso de la inoculación con *D. helianthi* en el borde de la hoja. A. 14° dpi. B. 28° dpi. C. 40° dpi. D. 65° dpi.

Fragmentos de tallos se lavaron con agua y detergente, y se esterilizaron superficialmente sumergiéndolos en alcohol 70 % v/v durante 30 segundos, seguidos de un minuto de inmersión en solución de NaOCl 10 % v/v (0.6 % v/v cloro activo). El material desinfectado se secó bajo campana de flujo laminar y se cortó longitudinalmente con un machete previamente flameado. Bajo lupa, cinco pequeños fragmentos del borde sano-enfermo de la médula y de la corteza de los tallos se colocaron asépticamente en medio de cultivo fresco (Agar-agua). Los cultivos primarios se incubaron a 25 °C, bajo ciclos alternos de luz UV (345-400nm) /oscuridad durante tres días, se repicaron a medio de cultivo fresco APG, y se incubaron bajo las condiciones descritas anteriormente durante 15 días a fin de obtener cultivos puros. Se examinaron las características culturales de los aislamientos. Se observaron los cultivos bajo lupa y microscopio. La evaluación de los cultivos se realizó considerando la presencia o ausencia de *D. helianthi*, basándose en la morfología observada. Este mismo procedimiento se aplicó para el aislamiento de *D. ambigua*.

Resultados

Estudio de la patogenicidad de aislamientos de *Diaporthe*

Todos los aislamientos empleados en las inoculaciones de girasol se manifestaron virulentos y condujeron a la expresión de los síntomas que caracterizan al CT. De este modo permitieron evaluar diferentes respuestas sobre los materiales de girasol examinados.

Inoculación y Evaluación

Tanto la inoculación con herida en tallo, como la realizada en el borde de la hoja resultaron adecuadas para conducir los ensayos de patogenicidad en el presente estudio.

La Tabla N° 16 muestra la severidad de CT observada con inoculaciones en tallo utilizando distintos aislamientos.

Tabla N° 16. Aislamientos de *D. helianthi*. Severidad del CT evaluada en un híbrido susceptible (ACA 869 DM) y un híbrido de buen comportamiento (SYN 3970). Método de inoculación de tallo con herida.

Aislamiento	Híbrido	Severidad de enfermedad		
		Media 7 dpi	Media 14 dpi	Media 21 dpi
Control sin inocular	ACA 869 DM	0,00a	0,00a	0,00a
Control sin inocular	SYN 3970	0,00a	0,00a	0,00a
1	ACA 869 DM	1,41bc	2,80bc	3,81bc
1	SYN 3970	1,40bc	2,81bc	3,79b
20	ACA 869 DM	1,31b	2,73b	3,59b
20	SYN 3970	1,30b	2,74b	3,56b
36	ACA 869 DM	1,52c	2,98c	3,87c
36	SYN 3970	1,37b	2,56b	3,44b
60	ACA 869 DM	1,31b	2,75b	3,51b
60	SYN 3970	1,30b	2,75b	3,54b
94	ACA 869 DM	1,19b	2,65b	3,58b
94	SYN 3970	1,19b	2,60b	3,58b
135	ACA 869 DM	1,31b	2,68b	3,62b
135	SYN 3970	1,29b	2,60b	3,50b
212	ACA 869 DM	1,31b	2,95c	4,00c
212	SYN 3970	1,20b	2,60b	3,49b
292	ACA 869 DM	1,37b	2,96c	3,99c
292	SYN 3970	1,22b	2,59b	3,43b
339	ACA 869 DM	1,32b	2,71b	3,51b
339	SYN 3970	1,30b	2,69b	3,53b
390	ACA 869 DM	1,29b	2,89c	3,84c
390	SYN 3970	1,23b	2,59b	3,42b

NOTA: Letras iguales indican diferencias no significativas según prueba de LSD Fisher ($\alpha = 0,05$).

En este primer estudio, se observaron diferencias significativas entre los distintos aislamientos como así también entre los híbridos ($p < 0,0001$). Además, se identificó una interacción significativa entre los aislamientos y los híbridos ($p < 0,0001$). Es importante señalar que todos los tratamientos mostraron diferencias respecto al control en los diferentes momentos de evaluación. El comportamiento dispar entre aislamientos en relación con la severidad de la enfermedad resultó evidente transcurridos 14 y 21 dpi. Ciertos aislamientos permitieron diferenciar entre un híbrido susceptible a la enfermedad y otro de buen comportamiento, mientras que otros exhibieron comportamientos muy similares independientemente del híbrido.

Los aislamientos 343 y 390, relacionados con distintos clados filogenéticos, fueron objeto de estudio del segundo ensayo. En la Tabla N° 17, se observan los resultados de severidad de CT observada con inoculaciones en tallo utilizando dichos aislamientos.

Tabla N° 17. *D. helianthi* 343 y 390. Severidad del CT evaluada en un híbrido susceptible (ACA 869 DM) y un híbrido de buen comportamiento (SYN 3970). Método de inoculación de tallo con herida.

Aislamiento	Híbrido	Severidad de enfermedad		
		Media 7dpi	Media 14 dpi	Media 21 dpi
Control sin inocular	ACA 869 DM	0,00a	0,00a	0,00a
Control sin inocular	SYN 3970	0,00a	0,00a	0,00a
343	ACA 869 DM	1,31b	3,00c	4,00c
343	SYN 3970	1,30b	2,51b	3,49b
390	ACA 869 DM	1,28b	2,86bc	3,84c
390	SYN 3970	1,21b	2,53b	3,42b

NOTA: Letras iguales indican diferencias no significativas según prueba de LSD Fisher ($\alpha = 0,05$).

En este segundo ensayo, no se observaron diferencias significativas entre los aislamientos, pero si entre híbridos ($p < 0,0001$). Los tratamientos mostraron diferencias respecto al control en los diferentes momentos de evaluación. La evaluación a 14 y 21 dpi reveló diferencias en la severidad de la enfermedad entre los aislamientos, que no habían sido observadas a 7 dpi. No se observaron diferencias significativas en la severidad de la enfermedad sobre los distintos híbridos para los dos aislamientos evaluados. El ensayo fue repetido dos veces y se obtuvieron resultados similares.

En la Tabla N° 18 se observan los resultados de las inoculaciones en el borde de la hoja utilizando los aislamientos 343 y 390. Este ensayo se desarrolló en paralelo con el método de inoculación en tallo con herida.

Tabla N° 18. *D. helianthi* 343 y 390. Índice de agresividad evaluado en un híbrido susceptible (ACA 869 DM) y un híbrido de buen comportamiento (SYN 3970). Método de inoculación en el borde de la hoja.

Aislamiento	Híbrido	Índice de agresividad	
		Media 14 dpi	Media 21 dpi
Control sin inocular	ACA 869 DM	0,00a	0,00a
Control sin inocular	SYN 3970	0,00a	0,00a
343	ACA 869 DM	0,37b	0,89b
343	SYN 3970	0,32b	0,72c
390	ACA 869 DM	0,35b	0,84b
390	SYN 3970	0,31b	0,73c

NOTA: Letras iguales indican diferencias no significativas según prueba de LSD Fisher ($\alpha = 0,05$).

Este método en particular se evaluó únicamente a 14 y 21 dpi, ya que el progreso observado a los 7 días no pudo ser medido debido a que no sobrepasó el doblez de la hoja realizado durante la inoculación.

Los tratamientos mostraron diferencias respecto al control en ambos momentos de evaluación. El 14° dpi, el IA de la enfermedad no reveló diferencias significativas en el comportamiento de los híbridos frente a la enfermedad. No obstante, a los 21 dpi, si se observaron diferencias significativas en el IA entre cada híbrido ($p < 0,0001$), que permitieron discernir entre un híbrido susceptible y uno de buen comportamiento con ambos aislamientos. No se observaron diferencias significativas entre el IA causado por los aislamientos utilizados.

Es importante destacar que el ensayo se repitió en dos ocasiones, y los resultados obtenidos fueron consistentes.

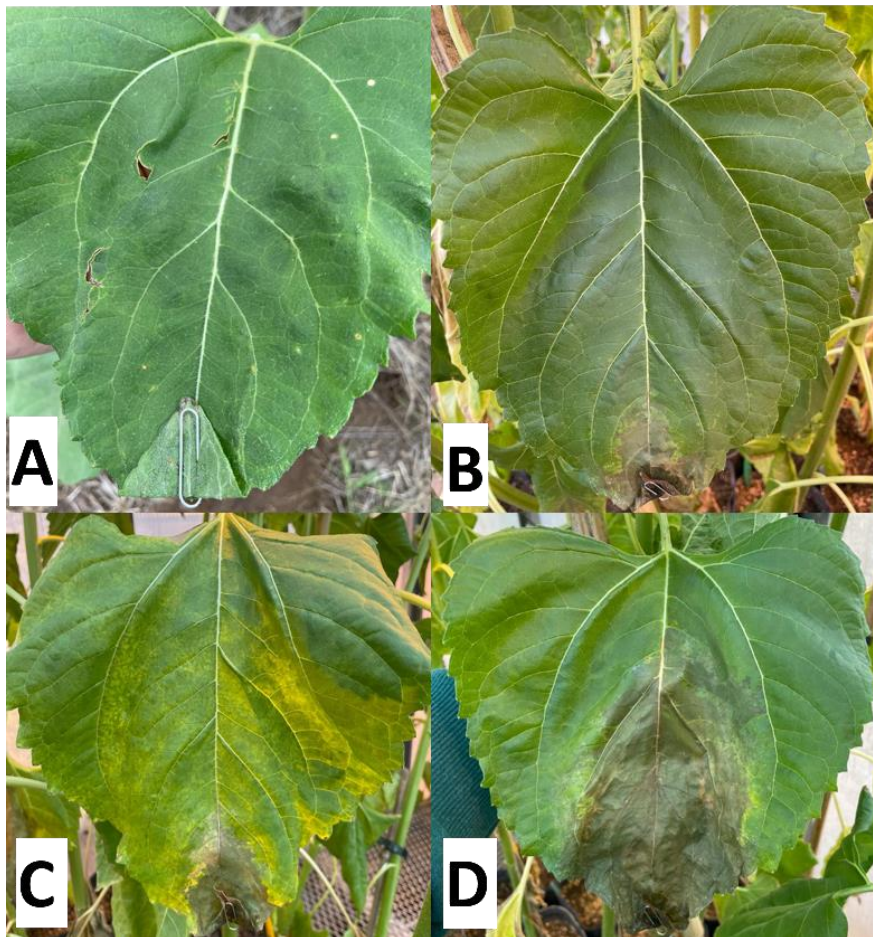


Figura N° 32. Avance de la enfermedad a través de la hoja. A. Día de inoculación. B. 7° dpi. C 14° dpi. D 21° dpi.

No se encontró relación entre las diferencias moleculares detectadas con la técnica de ddRADseq y la agresividad de los aislamientos 343 y 390 frente a dos híbridos de girasol de comportamiento contrastante, con ninguno de los dos métodos de inoculación.

Postulados de Koch

Como se detalló en el Capítulo I, se observó en cada planta enferma (cultivos primarios) la presencia consistente del patógeno fúngico estudiado.

Durante el presente trabajo de Tesis se aisló, a partir de cada planta enferma, en cultivo puro al presunto agente etiológico de la enfermedad (392 aislamientos identificados como *D. helianthi* y un aislamiento como *D. ambigua*).

Todos los aislamientos inoculados en plantas sanas produjeron los síntomas característicos del CT.

Todos los aislamientos fueron reaislados desde los tallos sintomáticos de las plantas inoculadas (Figura N° 31“C”) y sus características culturales y morfológicas resultaron idénticos a las del inóculo.

Estos resultados indicaron fehacientemente que los aislamientos obtenidos e identificados como *D. helianthi* fueron los causantes del CT en la región semiárida.

Además, se confirmó que *D. ambigua* también tiene la capacidad de producir la enfermedad de CT.

Por otra parte, cabe destacar que los aislamientos de *D. helianthi* previamente obtenidos de capítulo, y utilizados en estas inoculaciones, fueron infectivos sobre tallos.

Discusión

La elección de los híbridos comerciales de girasol utilizados en el presente trabajo se fundamentó en la información sobre comportamiento sanitario publicada por la red de ensayos comparativos de rendimiento de ASAGIR (2020-2023), complementada con los datos obtenidos por el CIALP en colaboración con INTA (Perlo Gallio et al., 2021, Troglia et al., 2022, Corró Molas et al., 2022).

Tras realizar un exhaustivo análisis acerca de los métodos de inoculación disponibles, se ensayó la aplicación en el pecíolo (Tourvieille et al., 1988; Mathew et al., 2018) y el método del escarbadiantes aplicado en soja (Grijalba et al., 2014) sin obtener resultados reproducibles. Por lo cual, se avanzó con los métodos de inoculación con antecedentes exitosos en girasol como son el método de herida sutil en el tallo (Mathew et al., 2018) y el método de inoculación en el borde de la hoja (Bertrand y Tourvieille, 1987).

Las condiciones de invernáculo utilizadas para las inoculaciones se seleccionaron en función de la información en trabajos de otros autores (Mathew et al., 2015; Mathew et al., 2018). Cabe destacar que las inoculaciones realizadas bajo condiciones naturales a campo e invernáculos donde solo se controló la temperatura tuvieron un bajo nivel de logro de infecciones, razón por la cual no fueron incluidos en este trabajo de Tesis.

Los resultados del primer ensayo coincidieron con la investigación realizada por Herr et al. (1983), quienes examinaron la virulencia de 15 aislamientos de *D. helianthi* provenientes de Estados Unidos en tres híbridos comerciales de girasol bajo condiciones controladas. Dichos autores observaron variación en el tamaño de los canchales, el número de hojas afectadas y la velocidad de desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, Viguié et al. (1999) llevaron a cabo inoculaciones con siete aislamientos de *D. helianthi* provenientes de Francia en hojas, tallos y capítulos de seis híbridos comerciales. Dichos autores sugieren la elección de un aislamiento con agresividad conocida o pocos aislamientos con variabilidad en agresividad conocida para realizar

ensayos de resistencia a *Diaporthe* en genotipos de girasol. Su estudio reveló una interacción significativa entre los aislamientos y los genotipos de girasol utilizados; resultado que también se encontró en el presente trabajo de Tesis. Esto podría explicar, al menos en parte, que ciertos aislamientos permitieron diferenciar entre un híbrido susceptible a la enfermedad y otro de buen comportamiento. Además, se destaca que esta diferencia de comportamiento frente a la enfermedad estuvo acorde a las observaciones de comportamiento sanitario realizadas en condiciones naturales por Perlo Gallio et al. (2021), Troglia et al. (2022) y Corró Molas et al. (2022). Cabe resaltar que, Encheva et al. (2002) reportó variaciones en la respuesta de cuatro híbridos de girasol frente a un aislamiento de *D. helianthi* utilizando un método de inoculación en pecíolo. Además, establecieron una correlación positiva entre los resultados hallados con este método y las evaluaciones de las infecciones naturales a campo. Mathew et al. (2018) observaron diferencias significativas en el índice de severidad causado por *D. helianthi* y *D. gulyae* en accesiones de girasol, e indicaron diferencias de susceptibilidad de las accesiones analizadas según la especie enfrentada. Mientras que en el mismo trabajo todos los aislamientos de *D. helianthi* utilizados fueron patogénicos, no encontraron diferencias significativas entre ellos para el índice de severidad. Anteriormente, Mathew et al. (2015) estudiaron aislamientos de *D. helianthi* y de *D. gulyae* y encontraron diferencias significativas en agresividad dentro de las dos especies.

En el presente trabajo se logró identificar aislamientos con agresividad capaz de discriminar híbridos de diferente comportamiento para CT. Estos aislamientos se encuentran disponibles en el cepario de la EEA INTA Anguil, La Pampa.

En lo que respecta al segundo ensayo, en un trabajo de Jovic et al. (2004) los resultados reportados utilizando el método de inoculación en hoja sobre el mismo material genético bajo invernáculo, indicaron que dos aislamientos de *D. helianthi* no difirieron significativamente en agresividad. Esto coincidió con lo hallado en el presente trabajo,

donde no se encontraron diferencias cuando se analizó cada material genético como un caso único frente a cada aislamiento. Degener et al. (1999) utilizando el método de inoculación en el borde de la hoja, encontraron diferencias entre genotipos, pero no observaron diferencias entre aislamientos ni interacción entre aislamiento y genotipo. Estos autores reportan una media de 26,2 días para el tiempo que demora la infección desde el extremo de la hoja hasta el pecíolo. El tiempo de avance reportado en el presente estudio coincide con lo encontrado por Degener et al. (1999). En un estudio de Cáceres et al. (2007) se inocularon hojas y tallos de *Helianthus petiolaris* con *D. helianthi* y se reportaron diferencias significativas en las respuestas para ambos tipos de inoculaciones. Por otro lado, en este trabajo la coincidencia en el comportamiento de los híbridos evaluados en ambos métodos de inoculación empleados sugeriría la existencia de factores de resistencia similares en hoja y tallo.

La determinación de diferencias sutiles en el comportamiento a través de la inoculación planteó un desafío significativo en la investigación. A menudo, nos encontramos con la dificultad de identificar estas diferencias en un contexto donde la variabilidad puede estar enraizada en matices casi imperceptibles. Al examinar dos híbridos que presentan diferencias mínimas, surge la interrogante sobre la capacidad de los métodos de inoculación para revelar distinciones mencionadas. Nos enfrentamos así a la necesidad de desarrollar métodos complementarios más sensibles y precisos que permitan discernir con claridad entre distintos comportamientos, incluso en casos donde las discrepancias son apenas perceptibles. Esta reflexión plantea importantes implicancias para la investigación en el ámbito de la inoculación, instándonos a explorar métodos más refinados que nos permitan captar la complejidad de las diferencias sutiles en el comportamiento con mayor precisión y fiabilidad.

Es esencial subrayar la importancia de contar con un método de inoculación preciso que discrimine el comportamiento sanitario de líneas de mejoramiento e híbridos comerciales de girasol frente a CT, independientemente de las condiciones naturales.

Además, sería necesario desarrollar un método de inoculación para el capítulo que pueda sumarse a los métodos en tallo utilizados en la actualidad y de esta manera contribuir al mejoramiento genético del girasol frente a la PSC.

Conclusiones

En el presente trabajo se evidenció asociado al CT, además de *D. helianthi*, la presencia de un agente etiológico novedoso: *D. ambigua*.

El germoplasma analizado ofreció una respuesta diferencial a la infección.

Los aislamientos de *D. helianthi* mostraron distintos niveles de patogenicidad; sería oportuno profundizar estudios moleculares que discriminen este comportamiento.

Los dos métodos de inoculación utilizados, en tallo con herida y en hoja sin herida, resultaron efectivos para evaluar la progresión de la enfermedad.

Este estudio aportó conocimiento sobre métodos efectivos para evaluar el comportamiento del germoplasma de girasol en condiciones controladas frente a aislamientos de *D. helianthi* y destacó la importancia de considerar la variabilidad en agresividad entre aislamientos en futuros estudios de resistencia al CT.

CONCLUSIÓN GENERAL

Se confirmó que *D. helianthi* es el agente causal predominante del cancro del tallo y de la podredumbre seca del capítulo de girasol en la región semiárida pampeana. Eventualmente, con muy baja frecuencia se detectó a *D. ambigua* en material sintomático de tallo. Cabe destacar la importancia del monitoreo de ambas enfermedades, ya que la región semiárida se diferenció de otras regiones productoras de girasol donde el CT es causado por varias especies de *Diaporthe*. La capacidad informativa de los marcadores utilizados indicó que el análisis de un único marcador, EF1- α , es suficiente para caracterizar la población de *Diaporthe* asociada al CT. La diversidad intraespecífica de los aislamientos de *D. helianthi* observada en estudios moleculares presentó valores de distancias genéticas similares a las de otras especies de *Diaporthe*. Sumado a esto, no se encontró correlación entre los diferentes grupos filogenéticos identificados mediante el análisis de SNPs y el tejido sintomático de origen, la ubicación geográfica de los aislamientos, los loci *mating type* que éstos portan y los diferentes niveles de patogenicidad. Estas evidencias no avalaron la existencia de taxones intraespecíficos dentro de *D. helianthi*. No obstante, las inferencias de ancestría sugirieron al menos dos orígenes diferentes de la población local estudiada. Resulta importante ampliar el estudio de la diversidad de *D. helianthi* incorporando aislamientos de otras regiones geográficas. En este sentido, la versatilidad de la técnica ddRADseq, implementada por primera vez en la especie *D. helianthi*, permitiría futuros estudios poblacionales que capten mayor variabilidad genética. A pesar del amplio espectro de especies vegetales afectadas por *Diaporthe* spp., son escasos los datos moleculares de este género en repositorios públicos en la actualidad. Este trabajo representó un primer aporte al conocimiento de la variabilidad del patógeno y sentó las bases para generar nuevos datos en beneficio de la comunidad científica dedicada al estudio del género *Diaporthe*.

El conocimiento de la agresividad del patógeno es fundamental para desarrollar estrategias de control para el CT y la PSC basadas en el mejoramiento genético de híbridos de girasol. Previo a esta Tesis la evaluación fenotípica de materiales, tanto en condiciones naturales como controladas, estaba limitada por falta de herramientas y conocimiento. Los aportes de este trabajo contribuyeron a la exploración de modelos de predicción de liberación de ascosporas, que facilitaron la identificación de regiones con mayor probabilidad de ocurrencia de ambas enfermedades. Esto permitió la relocalización de infectarios naturales para la instalación de ensayos de redes de cultivares y de mejoramiento genético de girasol. De este modo, se favorecieron tanto los avances en la búsqueda de resistencia como la generación de nuevos conocimientos para el manejo del cultivo. Paralelamente, se consolidó un método de inoculación que utiliza micelio como inóculo para ensayos bajo condiciones controladas. La producción de ascosporas, que permitiría inoculaciones similares a las infecciones que ocurren naturalmente, continúa siendo un desafío. El hecho de haber logrado el estado sexual *in vitro* esporádicamente promueve futuras investigaciones para alcanzar la reproducibilidad del proceso. Se identificaron aquellos aislamientos que permitieron determinar comportamientos diferentes de dos híbridos frente a CT, resultados que fueron consistentes con el comportamiento de estos materiales a campo. Este aporte sumó una herramienta sólida a través de un método reproducible que complementa la evaluación de materiales en infectarios naturales. Esta experiencia allana el camino para desarrollar un método de inoculación en capítulo. Cabe destacar la necesidad de contar con dicho método ya que la PSC es altamente relevante en el país desde los últimos cinco años y aun no emergió como problema en otras regiones girasoleras del mundo. En un análisis prospectivo asociado al cambio climático, en el que se proyectan variaciones que impactan sobre la eficacia de las estrategias de manejo de los patosistemas, los avances logrados y las capacidades generadas son indispensables para afrontar escenarios futuros.



Ing. Agr. Denis Nahuel Colombo



Directora: Dra. Norma Beatriz Paniego



Director Adjunto: Dr. Ricardo Comerio

BIBLIOGRAFÍA

Aćimović, M., & Štraser, N. (1982). *Phomopsis* sp. - novi parazit suncokreta (*Phomopsis* sp. - new parasite in sunflower). *Zaštita bilja*, 33(2), 117-158 (English summary).

Adhikari, L., & Missaoui, A. M. (2019). Quantitative trait loci mapping of leaf rust resistance in tetraploid alfalfa. *Physiological and molecular plant pathology*, 106, 238-245.

Aguero, M. E. (2000). Etiología de manchas y canchros del nudo en tallos de girasol. Tesis de Magister Scientiae. Universidad Nacional de Mar del Plata. Facultad de Ciencias Agrarias.

Aguirre, N. C., Filippi, C. V., Zaina, G., Rivas, J. G., Acuña, C. V., Villalba, P. V., García, M. N., González, S., Rivarola, M., Martínez, M. C., Puebla, A. F., Morgante, M., Hopp, H. E., Paniego, N. B. & Marcucci Poltri, S. N. (2019). Optimizing ddRADseq in Non-Model Species: A Case Study in *Eucalyptus dunii* Maiden. *Agronomy*, 9(9), 484.
<https://doi.org/10.3390/agronomy9090484>

Aguirre, N. C., Filippi, C. V., Vera, P. A., Puebla, A. F., Zaina, G., Lia, V. V., ... & Paniego, N. B. (2023). Double Digest Restriction-Site Associated DNA Sequencing (ddRADseq) Technology. In *Plant Genotyping: Methods and Protocols* (pp. 37-57). New York, NY: Springer US.

Alexander, D. H., & Lange, K. (2011). Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC bioinformatics*, 12, 1-6.

Allen, T. W., Bissonnette, K., Bradley, C. A., Damicone, J. P., Dufault, N. S., Faske, T. R. & Young, H. (2019). Southern United States soybean disease loss estimates for 2018. Paper presented at the The 46th Annual Meeting of the Southern Soybean Disease Workers, March 6 – 7, Pensacola Beach, Florida.

Alonso, L. C. (1988). Enfermedades y daños de herbicidas en el cultivo de girasol. El cancro del tallo *Phomopsis helianthi*. 101-104.

Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81-92.
<https://doi.org/10.1038/nrg.2015.28>

Aoun, M., Kolmer, J. A., Breiland, M., Richards, J., Brueggeman, R. S., Szabo, L. J. & Acevedo, M. (2020). Genotyping-by-sequencing for the study of genetic diversity in *Puccinia triticina*. *Plant disease*, 104(3), 752-760.

Ash, G. J., Sakuanrungsirikul, S., Anschaw, E., Stodart, B. J., Crump, N., Hailstones, D., & Harper, J. D. I. (2010). Genetic diversity and phylogeny of a

Phomopsis sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. *Mycologia*, 102, 54-61. <https://doi.org/10.3852/08-198>

Asociación Argentina de Girasol. (2023). Evaluación de cultivares. Recuperado de <https://www.asagir.org.ar/acerca-de-evaluacion-de-cultivares-463>

Babraham bioinformatics. FastQC a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Berglund, D. R. (2007). Sunflower Production. North Dakota State University, Extension Service Report No.25.

Baroncelli, R., Scala, F., Vergara, M., Thon, M. R., & Ruocco, M. (2016). Draft whole-genome sequence of the *Diaporthe helianthi* 7/96 strain, causal agent of sunflower stem canker. *Genomics Data*, 10, 151-152. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.11.005>

Bert, P. F., Jouan, I., de Labrouhe, T. D., Serre, F., Nicolas, P. & Vear, F. (2002). Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 985–993.

Bertrand, F., & Tourvieille, D. (1987). *Phomopsis* du tournesol: test de sélection. *Informations Techniques du Cetiom*, 98, 12-18.

Besnard, G., Griveau, Y., Quillet, M. C., Serieys, H., Lambert, P., Var`es, D., and Bervill`e, A. (1997). Specifying of introgressed regions from *H. argophyllus* in cultivated sunflower (*Helianthus annuus*) to mark *Phomopsis* resistance genes. *Theor. Appl. Genet.* 94: 131–138.

Blackman, B. K., Scascitelli, M., Kane, N. C., Luton, H. H., Rasmussen, D. A., Bye, R. A., Lentz, D. L., & Rieseberg, L. H. (2011). Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 14360–14365.

Branke, J., Deb, K., Dierolf, H., & Osswald, M. (2004). Finding knees in multi-objective optimization. In *Parallel Problem Solving from Nature-PPSN VIII: 8th International Conference*, Birmingham, UK, September 18-22, 2004. *Proceedings 8* (pp. 722-731). Springer Berlin Heidelberg.

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*, 7(1), 1-16.

Cáceres, C., Castaño, F., Rodríguez, A., Salaberry, T., Echeverría, M., & Colabelli, M. (2007). *Phomopsis* resistance on leaves and stems of *Helianthus petiolaris*. *Helia*, 30(47), 213-218.

Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.

Carriere, J. B., & Petrov, M. (1990). *Diaporthe* (Phomopsis) sp., a new pathogen of cocklebur (*Xanthium italicum* Mooret.) and of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia* 13: 93-106.

Castañó, F. D. (2018). The sunflower crop in Argentina: past, present and potential future. *OCL*, 25(1), D105.

Castañó, F. Vear, F. & Tourvieille D. (1993). Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. *Euphytica* 68, 85-98.

Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular ecology*, 22(11), 3124-3140.

Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. H. (2011). Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes| genomes| genetics*, 1(3), 171-182.

Cayón Salinas, D. G. (2018). Período crítico de competencia y manejo de malezas en girasol.

Colombo, D. N., & Corro Molas, A. (2021). Relevamiento de cancro y pudrición de capítulo del girasol causado por el complejo *Diaporthe*. Libro de resúmenes 5º Congreso Argentino de Fitopatología: 59º Reunión APS División Caribe / Ernestina Galdeano ... [et al.]. - 1a ed revisada. - Córdoba: Asociación Civil Argentina de Fitopatólogos. Modalidad virtual.

Colombo, D. N., & Corro Molas, A. (2022). Relevamiento del cancro del tallo y la pudrición seca de capítulo del girasol causadas por el complejo *Diaporthe*. XVII Jornadas Fitosanitarias 2022. Pergamino.

Cooke, M. C., & Ellis, J. B. (1878). New Jersey fungi. *Grevillea* 6: 81-96.

Corró Molas, A., Comerio, R., Figueruelo, A., Ghironi, E., Sanchez, E., Bertero, A., & Perez Fernandez, J. (2016a). Epiphytotic disease of sunflower stem canker in Argentina. 19 th International Sunflower Conference. Turkey.

Corró Molas A., Edwards Molina J., Therisod G., Colombo D., Martínez M.I., Bilbao A., Bertero A., & Moschini R. C. (2021). Riesgo climático de la región pampeana respecto a la liberación de ascosporas de *Diaporthe helianthi*. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/12775>

Corró Molas, A., Ghironi, E., Sanchez, E., & Gareis E. (2016b). Comportamiento sanitario frente al cancro del tallo del girasol. Recuperado de:

<http://cialp.com.ar/wp-content/uploads/2016/07/Comportamiento-a-cancro-del-tallo-2016-Gral-Pico.pdf>.

Corró Molas, A., & Ghironi, E. (2022). Ensayos Comparativos de Rendimiento de Girasol 2021/22. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/11875>

Corró Molas A., Ghironi E., Gareis, Testa M., & Pirchio B. (2019). Patosistema del Cancro del girasol por *Diaporthe*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina). Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_comportamiento_a_cancro_del_girasol_2016_2017_2018_2019.pdf

Coppin, E., Debuchy, R., Arnais, S., & Picard, M. (1997). Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 411-428.

Crous, P. W., Phillips, A. J., & Baxter, A. P. (2000). *Phytopathogenic Fungi From South Africa*. Department of Plant Pathology Press, University of Stellenbosch.

Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., & Houbraken, J. (2019). *Fungal biodiversity*. Westerdijk Laboratory Manual Series No.1 (2nd ed). Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands.

Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M. & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2), p. giab008.

Dangal, N. K., Rekabdarkolaee, H. M., Markell, S. G., Harveson, R. M., & Mathew, F. M. (2022). Foliar fungicides containing FRAC 11 mitigates *Phomopsis* stem canker in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Disease* 2022 Aug 1.

Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., & Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 12, Issue 7, pp. 499–510). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3012>

Debaeke, P., & Moinard, J. (2010). Effect of crop management on epidemics of *Phomopsis* stem canker (*Diaporthe helianthi*) for susceptible and tolerant sunflower cultivars. *Field Crops Research* 115(1): 50-60.

Debaeke, P., & Estragnat, A. (2003). A simple model to interpret the effects of sunflower crop management on the occurrence and severity of a major fungal disease: *Phomopsis* stem canker. *Field Crops Research* 83: 139-155.

Debaeke, P., Estragnat, A., & Reau, R. (2003). Influence of crop management on sunflower stem canker (*Diaporthe helianthi*). *Agronomie*, 23(7), 581-592.

Debuchy, R., & Turgeon, B. G. (2006). Mating-type structure, evolution, and function in *Euscomycetes*. In *Growth, differentiation and sexuality* (pp. 293-323). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Degener, J., Melchinger, E. A., & Hahn, V. (1999). Inheritance of resistance to *Phomopsis* in sunflower: Study of leaf and stem resistance after artificial and natural infection. *Helia* 22(31): 105-115.

Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1, 19-21.

Delos, M., Moinard, J. & Debaeke, P. (1996). ASPHODEL: modèle de simulation des épidémies de *phomopsis* du tournesol (*Diaporthe helianthi*) 15. Conférence Internationale sur le tournesol, 2000/06/12-15, Toulouse (FRA). Comptes rendus. 2000. 7p.

Diamond, J. M. (1999). *Guns, germs and steel: the fates of human societies*. Norton, W.W. and Company, Inc., 500 fifth Ave. New York, NY, 10110.

Díaz, G. A., Latorre, B. A., Lolas, M., Ferrada, E., Naranjo, P., & Zoffoli, J. P. (2017). Identification and characterization of *Diaporthe ambigua*, *D. australafricana*, *D. novem*, and *D. rudis* causing a postharvest fruit rot in kiwifruit. *Plant Disease*, 101(8), 1402-1410.

Díaz Zorita, M. & G. Duarte. (2002). *Manual práctico para el cultivo de Girasol*. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 318 pp.

Dissanayake, A. J., Phillips, A. J. L., Hyde, K. D., Yan, J. Y., & Li, X. H. (2017). The current status of species in *Diaporthe*. *Mycosphere*, 8(5), 1106-1156.

Di Yenno Y Sigauco. (2020). Bolsa de Comercio Rosario. Recuperado de: <https://ruralnet.com.ar/industrializacion-y-exportaciones-de-girasol-2019-20/>

Du, M., Schardl, C. L., Nuckles, E. M., & Vaillancourt, L. J. (2005). Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Collectotrichum* species complexes. *Mycologia*, 97(3), 641-658.

Dung, J. K., Knaus, B. J., Fellows, H. L., Grünwald, N. J., & Vining, K. J. (2019). Genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from mint detected with genotyping by sequencing. *Phytopathology*, 109(11), 1966-1974. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0475-R>

Dyer, P. S., Ingram, D. S., & Johnstone, K. (1992). The control of sexual morphogenesis in the Ascomycotina. *Biological Reviews* 67: 421-458.

Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 6: e19379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>

Encheva, V., & Kiryakov, I. (2002). A method for evaluation of sunflower resistance to *Diaporthe/Phomopsis helianthi* Munt. Cvet. et al. Bulg. J. Agric. Sci. 8: 219-222

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048.

Fálico de Alcaraz, L., Visintin, G., & Alcaraz, M. E. (1994). El cancro del tallo del girasol *Diaporthe helianthi*. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, N° 8. 19-25.

Fassio, A., Rodriguez, M., Pereyra, S., & Stewart, S. (2007). Avances en *Phomopsis* en girasol. Recuperado de: <https://www.researchgate.net>

Favere, V., Reimonte, G., Castaño, F., & Rodriguez, R. (1996). *Phomopsis* en girasol: Primera evaluación del comportamiento de cultivares en el sudeste bonaerense. Su relación con los ataques de *Sclerotinia sclerotiorum* en capítulos. *Revista Visión Rural*. 64-67.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.

Ferris, P. J., Pavlovic, C., Fabry, S., & Goodenough, U. W. (1997). Rapid evolution of sex-related genes in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(16), 8634-8639.

Filippi, C. V., Corro Molas, A., Dominguez, M., Colombo, D., Heinz, N.; Troglia, C.; Maringolo, C., Quiroz, F.; Alvarez, D., Lia, V. & Paniego, N. (2022). Genome-Wide Association Studies in Sunflower: Towards *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe/Phomopsis* Resistance Breeding. *Genes* 13, 23-57. <https://doi.org/10.3390/genes13122357>

Franzen, D. W. (2010). North Dakota fertilizer recommendation tables and equations. NDSU Ext. Circ. SF-882.

French, E., R. & Hebert, T., T. (1980). *Métodos de Investigación Fitopatológica*. Editorial IICA.

Frichot, E., & François, O. (2015). LEA: An R package for landscape and ecological association studies. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(8), 925-929.

Frichot, E., Mathieu, F., Trouillon, T., Bouchard, G., & François, O. (2014). Fast and efficient estimation of individual ancestry coefficients. *Genetics*, 196(4), 973-983.

Friskop, A., Markell, S., & Khan, M. (2014). North Dakota Field Crop Fungicide Guide. North Dakota State University Extension Publication. 622.

Garcia, A. A., Mollinari, M., Marconi, T. G., Serang, O. R., Silva, R. R., Vieira, M. L., ... & Souza, A. P. (2013). SNP genotyping allows an in-depth

characterisation of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. Scientific reports, 3(1), 3399. <https://doi.org/10.1038/srep03399>

Ghironi, E., Corró Molas, A., Sanchez, E., & Gareis, E. (2018). Variaciones en las pérdidas de rendimiento y contenido de aceite por cancro del tallo del girasol en la región semi árida pampeana central. Libro de resúmenes 5° Congreso Argentino de Fitopatología. Tucumán.

Gilley, M., Harveson, R., Schaefer, J., Kirsch, M., Caroline, J., & Markell, S. (2015). Evaluation of fungicides for management of Phomopsis stem canker. In: 37th Annu. Sunflower Res. Forum. Fargo, ND. Natl. Sunflower Assoc., Mandan, ND.

Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and environmental microbiology, 61(4), 1323-1330. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>

Glass, N. L., & Kulda, G. A. (1992). Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. Annual Review of Phytopathology 30, 201-224.

Glass, N. L., Metzenberg, R. L., & Raju, N. B. (1990). Homothallic Sordariaceae from nature: The absence of strains containing only thea mating type sequence. Experimental Mycology, 14(3), 274-289.

Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 31(1), 1-41.

Gomzhina, M. M., Gannibal, F. B., & Bukreev, V. V. (2019). Abstract. Diaporthe species causing Phomopsis blight of sunflower in Russia. Zashchita i Karantin Rastenii (No.8), 36-38. Editorial Board of Plant Protection and Quarantine, Moscow, Russia.

Graham, C. F., Glenn, T. C., McArthur, A. G., Boreham, D. R., Kieran, T., Lance, S., ... & Somers, C. M. (2015). Impacts of degraded DNA on restriction enzyme associated DNA sequencing (RADSeq). Molecular ecology resources, 15(6), 1304-1315. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12404>

Grijalba, P. (2011). Variabilidad morfológica, genética y patogénica de Diaporthe phaseolorum var. caulivora causante del cancro del tallo de la soja en la provincia de Buenos Aires. Tesis Magister Scientiae en Produccion Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata.

Grijalba, P., & del C Ridao, A. (2014). Tasa de crecimiento y patogenicidad de aislamientos de Diaporthe phaseolorum var. caulivora. Phytion (Buenos Aires), 83(2), 325-332.

Griveau, Y., Serieys, H., & Belhassen, E. (1992). Resistance evaluation of interspecific and cultivated progenies of sunflower infected by *Diaporthe helianthi*. In: Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Vol II, Pisa, Italy, 7–11. September. 1054-1058.

Grunwald, N. J., Everhart, S. E., Knaus, B. J., & Kamvar, Z. N. (2017). Best Practices for Population Genetic Analyses. *Phytopathology*, 107(9), 1000-1010. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-16-0425-RVW>

Grunwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., & Fry, W. E. (2003). Analysis of genotypic diversity data for populations of microorganisms. *Phytopathology*, 93(6), 738-746. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.738>

Guidini, R., Jahani, M., Huang, K., Rieseberg, L. & Mathew, F. M. (2023). Genome-Wide Association Mapping in Sunflower (*Helianthus annuus*) Reveals Common Loci and Putative Candidate Genes for Resistance to *Diaporthe gulyae* and *D. helianthi* Causing Phomopsis Stem Canker. *Plant disease* 107, 667-674.

Gulya, T. J. (1996). Changes in sunflower disease incidence in the United States during the last decade. *Proc. 14th Int. Sunflower Conf.*, Beijing China. Vol. II, 651-657.

Gulya, T. J. (1997). Phomopsis stem canker resistance in USDA and commercial sunflower germplasm. *Proc. 19th Sunflower Res. Workshop*, Fargo, 76-78.

Gulya, T., Kandel, H., McMullen, M., Knodel, J., Berglund, D., Mathew, F., Lamey, A., Nowatzki, J., & Markell, S. (2013). Prevalence and incidence of sunflower downy mildew in North Dakota from 2001 to 2011. Online. *Plant Health Progress*. <https://doi.org/10.1094/PHP-2013-0522-01-RS>

Gulya, T. J., Mathew, F., Harveson, R., Markell, S., & Block, C. (2016). Diseases of sunflower. *Handbook of Florists' crops diseases, handbook of plant disease management*. Springer International Publishing, Cham, 1-20.

Gulya, T. J., Rashid, K. Y., & Masirevic, S. M. (1997). Sunflower diseases. *American Society of Agronomy, Madison USA*. In: Schneiter AA (ed), *Sunflower technology and production*, 313-319.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.

Hanlin, R. T. (1990). APS Press, St. Paul, MN. In: *Illustrated Genera of Ascomycetes*, Vol. 1. 3rd Ed. 136-137.

Harveson, R., Mathew, F., Gulya, T., Markell, S., Block, C., & Thompson, S. (2018). Sunflower stalk diseases initiated through leaf infections. *Plant Health Progress*, 19(1), 82-91.

Harveson, R. M., Markell, S. G., Block, C. C., & Gulya, T. J. (2016). Compendium of Sunflower Diseases, 1 st Ed. American Phytopathological Society, St. Paul, M. N.

Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. A. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. Journal of molecular evolution, 22, 160-174.

Heiser, C. B. (1998). The domesticated sunflower in old Mexico?. Genetic Resources and Crop Evolution, 45, 447-449.

Heiser, C. B., Smith, D. M., Clevenger, S., & Martin, W. C. (1969). The North American sunflowers (*Helianthus*). Mem. Torrey Bot. Club. 22, 1-218.

Hernández, F. E., Pioli, R. N., Peruzzo, A. M., Formento, A. N., Pratta, G. R. (2015). Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Diaporthe longicolla* (teleomorfo desconocido: Diaporthales) de la región templada y subtropical de Argentina. Revista de Biología tropical. Vol.63 (3), 871-884.

Herr, L. J., Lipps, P. E., & Watters, B. H. (1983). *Diaporthe* stem canker of sunflower. Plant Dis. 56, 800-802.

Hosseini, B. (2022). Species of the *Diaporthe/Phomopsis* Complex (DPC) in European soybean and establishment of quadruplex Real-Time PCR for diagnosis. Dissertation to obtain the doctoral degree of Agricultural Sciences. Faculty of Agricultural Sciences, University of Hohenheim.

Huguet, N. (2006). Occurrence of *Phomopsis helianthi* in Argentina and Uruguay. Helia, 29(44), 121-126.

Index fungorum. (2023). Index fungorum base de datos. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. (consultado abril de 2023).

Ingaramo, J., & Feoli, C. (2008). Capítulo 1. “La importancia del complejo girasol en la Argentina”. El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana. Pág. 1.

INTA. (1997). Guía práctica para el cultivo de Girasol.

Ivancovich, A., & Lavilla, M. (2016). Diagnóstico y manejo de enfermedades en girasol. El cultivo de girasol en Argentina. INTA Ediciones. Pág 7.

Jocić, S., Lačok, N., Miklić, V., Škorić, D., & Griveau, Y. (2004). Testing two isolates of *Diaporthe/Phomopsis helianthi* in a population of sunflower recombinant inbred lines. Helia, 27(41), 129-136.

Kandel, H. (2012). National Sunflower Association survey results. In: Proceedings of the 34th Sunflower Research Workshop, Fargo, ND. January 12-13, 2012. National Sunflower Association, USA.

Kashyap, R., Markell, S. G., Harveson, R. M., Rekabdarkolaee, H. M., & Mathew, F. M. (2023). Application of Pyraclostrobin Fungicide at Miniature Floral Head Development Growth Stage Is Efficacious Against Phomopsis Stem Canker Fungi in Sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Health Progress*, 24(1), 24-31.

Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35(21), 4453-4455.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>

Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D. L. (2014). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 30(1), 25-35. DOI 10.1016/j.tree.2014.10.008.

Kronstad, J. W., & Staben, C. (1997). Mating type in filamentous fungi. *Annual Review of Genetics* 31, 245-276.

Lachance, J., & Tishkoff, S. A. (2013). SNP ascertainment bias in population genetic analyses: why it is important, and how to correct it. *Bioessays*, 35(9), 780-786.

Lamarque, C., & Perny, R. A. (1985). Nouvelle maladie du tournesol: Le phomopsis. *Cultivar* 179, 57-59.

Langar, K., Griveau, Y., Serieys, H., & Berville, A. (2000). Analyse genetique de la resistance au Phomopsis (*Diaporthe helianthi* Munt. -Cvet. et al.) chez le tournesol cultive (*Helianthus annuus* L.). Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, Tome II, K-90-95.

Lange, V., Böhme, I., Hofmann, J., Lang, K., Sauter, J., Schöne, B., Paul, P., Albrecht, V., Andreas, J. M. & Baier, D. M. (2014) Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genom.* 15.

Laville, J. (1986). Cahier technique Tournesol: maladies. CETIOM, Paris (in French).

Leboldus, J. M., Kinzer, K., Richards, J., Ya, Z., Yan, C., Friesen, T. L., & Brueggeman, R. (2014). Genotype-by-sequencing of the plant-pathogenic fungi *Pyrenophora teres* and *Sphaerulina musiva* utilizing Ion Torrent sequence technology. *Molecular Plant Pathology*, 16(6), 623-632.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12214>

Lepais, O., & Weir, J. T. (2014). Sim RAD: an R package for simulation-based prediction of the number of loci expected in RAD seq and similar

genotyping by sequencing approaches. *Molecular ecology resources*, 14(6), 1314-1321.

Letunic, I. & Bork, P. (2021). Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, Volume 49, Issue W1, 2, W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>

Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *ArXiv*, 1303.3997 [q-Bio]. Obtenido de <http://arxiv.org/abs/1303.3997>

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.

Maciel, G., De La Torre, D., Bartosik, R., Izquierdo, N., & Cendoya, G. (2015). Effect of oil content of sunflower seeds on the equilibrium moisture relationship and the safe storage condition. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 17(2), 248–258.

Mancebo, M. F., Bazzalo, M. E., Reid, R. J., Kontz, B., & Mathew, F. M. (2019). First report of *Diaporthe gulyae* causing *Phomopsis* stem canker of sunflower (*Helianthus annuus*) in Argentina. *Plant Disease*, 103(7), 1769-1769.

Mancebo, M. F. (2021). Agentes causales del cancro del tallo y podredumbre del capítulo de girasol del complejo *Diaporthe/Phomopsis* y su prevalencia en el sur de la provincia de Buenos Aires. Tesis Magister en Producción Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata.

Maric, A., & Masirevic, S. (1980). suPojava sive pegavostistabla (*Phomopsis* sp.) do sadanepoznale bolesti suncokreta (Appearance of grey leaf spot caused by *Phomopsis* sp. On sunflowers). *Zastita Bilja. Plant Protection*, 12, 421-423.

Maric, A., Camprag, D., & Masirevic, S. (1988). Important diseases and insects of sunflower. *Nolit*, Belgrade, Yugoslavia.

Markell, S., Halley, S., Schatz, B., Gulya, T., Mathew, F., Friskop, A., Aberle, E., & Misk, K. (2010). Evaluation of fungicides and fungicide timing for management of *Phomopsis* in sunflowers. In: *Proceedings of the 32nd Annual Sunflower Research Workshop*, Fargo, ND. January 13-14, 2010.

Markell, S., Harveson, R., Block, C., & Gulya, T. (2015). Sunflower diseases. In *Sunflower* (pp. 93-128). AOCS Press.

Markell, S., Harveson, R., Gulya, T., Block, C., Thompson, S., Ryley, M., & Mathew F. (2023). Diseases of Field Crops. CHAPTER 20: Diseases of Sunflower. January 2023, 313-331.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMB Net. Journal*, 17(1), 10-12.

Masirevic, S., & Gulya, T. J. (1992). Sclerotinia and Phomopsis – two devastating sunflower pathogens. *Field Crop Res.* 30, 271-300.

Masirevic S., & Forgic G. (2000). Sunflower diseases – limiting factor in sunflower production, *Rev. Agron. Saznanja* 10, 46-50.

Mathew, F. (2014). Molecular characterization and pathogenicity of sunflower stem pathogens. In Partial Fulfillment for the Degree of Doctor of Philosophy. North Dakota State University.

Mathew, F., Alananbeh, K., Balbyshev, N., Heitkamp, E., Gulya, T., & Markell, S. (2011). Reevaluation of Phomopsis species affecting sunflowers in the United States. *Phytopathology* 101, S115.

Mathew, F., Alananbeh, K., Balbyshev, N., Heitkamp, E., Castlebury, L., Gulya, T., & Markell, S. (2012). Reevaluation of Phomopsis species affecting sunflowers in the United States. In: *Proceedings of the 18th International Sunflower Conference*, Mar del Plata, Argentina. 26 Feb.–1 Mar. 2012. The International Sunflower Association, Paris. 211-214.

Mathew, F. M., Castlebury, L., Jordahl, J., Gulya, T., & Markell, S. (2013). Comparison of inoculation methods for characterizing aggressiveness of Phomopsis stem canker pathogens of Sunflower. *Phytopathology*. Vol 103 (Supplement 2) Number 6. S.291.

Mathew, F. M., Alananbeh, K. M., Jordahl, J. G., Meyer, S. M., Castlebury, L. A., Gulya, T. J. & Markell, S. J. (2015a). Phomopsis stem canker: a reemerging threat to sunflower (*Helianthus annuus*) in the United States. *Phytopathology*. Vol 105, N° 7, 990-997.

Mathew, F. M., Rashid, K. Y., Gulya, T. J., & Markell, S. J. (2015b). First report of Phomopsis stem canker of sunflower (*Helianthus annuus*) Caused by *Diaporthe gulyae* in Canada. *Volume 99, Number 1*, 160.2

Mathew, F. M., Jordahl J. G., Gulya T. J., & Markell S. G. (2018). Comparison of Greenhouse-Based Inoculation Methods to Study Aggressiveness of *Diaporthe helianthi* Isolates Causing Phomopsis Stem Canker of Sunflower (*Helianthus annuus*) *Plant Health Progress* 19:1, 92-96.

Mazars, C., Rossignol, M., Auriol, P., & Klæbe, A. (1990). Phomozin, a phytotoxin from *Phomopsis helianthi*, the causal agent of stem canker of sunflower. *Phytochemistry*, Vol 29, N°11, 3441-3444.

Merino, G. (2018). Imputación de Genotipos Faltantes en Datos de Secuenciación Masiva. Master's Thesis, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Metzenberg, R. L. & Glass, N. L. (1990). Mating type and mating type strategies in *Neurospora*. *Bioessays* 12, 53-59.

Mihaljcevic, M., & Vukojevic, J. (1994). *Diaporthe* (*Phomopsis*) spp. on weeds possible causative agents of sunflower stem canker in Vojvodina province. *Helia* 17, 39-48.

Mihaljčević, M., Muntañola-Cvetković, M. & Petrov, M. (1982). Further studies on the sunflower disease caused by *Diaporthe* (*Phomopsis*) *helianthi* and possibilities of breeding for resistance, Proceedings of the 10th International Sunflower Conference, Surfers Paradise, Australia, 157-159.

Mihaljcevic, M., Muntañola-Cvetkovic, M., Vukojevic, J., & Petrov, M. (1985). Source of infection of sunflower plants by *Diaporthe helianthi* in Yugoslavia. *Phytopathol. Z.* 113, 334-342.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1985.tb04834.x>

Montoya, J. C., Porfiri, C., Romano, N., & Rodríguez, N. (2008). Capítulo 6. "Manejo de malezas en el cultivo de girasol". *El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana*. Pág. 49.

Moschini, R. C., Rodríguez, M. J., Martínez, M. I., & Stewart, S. (2019). Weather-based predictive models for *Diaporthe helianthi* ascospore release in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 48, 519-527.

Mostert, L., Crous, P. W., Kang, J. C., & Phillips, A. J. L. (2001). Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia* 93, 146-167.
<https://doi.org/10.1080/00275514.2001.12061286>

Movshev, M., & Schwarz, A. (2004). On maximally supersymmetric Yang–Mills theories. *Nuclear Physics B*, 681(3), 324-350.

Muntañola-Cvetkovic, M., Mihaljcevic, M., & Petrov, M. (1981). On the identity of the causative agent of a serious *Phomopsis* – *Diaporthe* disease in sunflower plants. *Nova Edwigia* 34, 417-435.

Muntañola-Cvetković, M., Mihaljčević, M., Vukojević, J., & Petrov, M. (1985). Comparisons of *Phomopsis* isolates obtained from sunflower plants and debris in Yugoslavia. *Transactions of the British Mycological Society*, 85(3), 477-483.

Muntañola-Cvetkovic, M., Vukojevid, J., Mihaljcevic, M., & Petrov, M. (1988). Correlation between environmental conditions and the development of the teleomorphosis in *Diaporthe helianthi*. 12th ISC, Novi Sad, Yugoslavia, Vol.2, 96. <https://www.isasunflower.org/news-events/news/article/12th-isc-novi-sad-yugoslavia-1988-vol2>

Nei, M., & Kumar, S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, USA.

Nelson, M. A. (1996). Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends in Genetics*, 12(2), 69-74.

Nitschke, T. (1867). *Pyrenomycetes Germanici. Die Kernpilze Deutschlands*, Breslau 1.

Nitschke, T. (1870). *Pyrenomycetes Germanici* 2, 161–320 Breslau. Eduard Trewendt, Germany.

Nylander, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
<http://www.abc.se/~nylander/mrmodeltest2/mrmodeltest2.html>

Olson, T. R. (2017). Managing Phomopsis stem canker of sunflower using improved. Diagnosis and quantification of the causal pathogens. Master of Science, Major in Plant Science, South Dakota State University.

Olson, T. R., Kontz, B., Markell, S. G., Gulya, T. J., & Mathew, F. M. (2017). First Report of *Diaporthe stewartii* causing Phomopsis stem canker of sunflower (*Helianthus annuus*) in Minnesota. *Disease Notes. Plant Disease*, 101(2), 382-382.

Oraguzie, N. C., & Wilcox, P. L. (2007). An Overview of Association Mapping. *Association Mapping in Plants*, 1-9. Springer New York.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-36011-9_1

Palomar, L. T., Pelaez, E. V., Díaz, L. C., Moreno, M. G. A., Velázquez, Á. G., Beleño-Cabarcas, M. T., & Castro-Toscano, M. J. (2015). Comparación de tres tecnologías en la preservación de conidias de hongos filamentosos y pruebas de viabilidad. *Ciencia y tecnología*.

Parchman, T. L., Jahner, J. P., Uckele, K. A., Galland, L. M., & Eckert, A. J. (2018). RADseq approaches and applications for forest tree genetics. *Tree Genet. Genomes* 14. <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1251-3>

Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., & Lannou, C. (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*, 58, 409-424.

Pecchia S., Mercatelli, E., & Vannacci, G. (2004). Intraspecific Diversity within *Diaporthe helianthi*: Evidence from Rdna Intergenic Spacer (IGS) Sequence Analysis. *Mycopathologia* 157, 317-326.
<https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000024185.66158.7e>

Pereyra, V., Feoli, C., & Sarlangue, H. (2001). Cuadernillo Técnico N° 1: Girasol en Siembra Directa. Asociación Argentina de Girasol.

Pereyra, V., & Escande, A. (1994). Manual de reconocimiento de enfermedades del Girasol en la Argentina. INTA.

Pérez Fernández, J. (2002). Capítulo 8. "Enfermedades: identificación y manejo". Manual práctico para el cultivo de Girasol. 151.

Pérez Fernández, J. & Figueruelo, A. (2008). Capítulo 7. "Enfermedades: identificación y manejo". El cultivo de girasol en la región semiárida pampeana. 65.

Pericin, D., Jarak, M., Antov, M., & Dozet, B. (1994). Pectinase from *Phomopsis helianthi*- The agent of sunflower stem canker. *Helia*, 17, 21-30.

Perlo Gallio, A., Corró Molas, A., & Ghironi, E. (2021). Ensayos Comparativos de Rendimiento de Girasol 2020/21. Informe electrónico. 16 pp. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/9995>

Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS one*, 7(5), e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>

Peterson, G. W., Dong, Y., Horbach, C., & Fu, Y. B. (2014). Genotyping-by-sequencing for plant genetic diversity analysis: A lab guide for SNP genotyping. *Diversity* 6, 665-680.

Pilorgé, E. (2020). Sunflower in the global vegetable oil system: situation, specificities and perspectives. *OCL*, 27, 34. <https://doi.org/10.1051/ocl/2020028>

Pinochet, X., & Estragnat, A. (1996). Field evaluation of hybrid sensitivity to *Diaporthe helianthi*: relationship between symptoms and yield losses. In: *Proceedings of the 14th International Sunflower Conference*, Beijing, China, 777-780.

Pöggeler, S. (2001). Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 589-601.

Pogoda, C. S., Reinert, S., Talukder, Z. I., Attia, Z., Collier-zans, E. C. E., Gulya, T. J., Kane, N. C. & Hulke, B. S. (2021). Genetic loci underlying quantitative resistance to necrotrophic pathogens *Sclerotinia* and *Diaporthe* (*Phomopsis*), and correlated resistance to both pathogens. *Theoretical and Applied Genetics*, 134, 249-259.

Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E., & Jannink, J. L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS One*, 7, e32253.

Poland, J. A., & Rife, T. W. (2012). Genotyping by sequencing for Plant Breeding and Genetics. *Plant Genome*, 5, 92-102.

Putt, E. D. (1997). Early history of sunflower. In: Scheiter AA (ed) Sunflower Production and Technology. American Society Agronomy, Madison, WI, 1-19.

Rafiei, V., Banihashemi, Z., Jiménez-Díaz, R. M., Navas-Cortés, J. A., Landa, B. B., Jiménez-Gasco, M. M., ... & Milgroom, M. G. (2018). Comparison of genotyping by sequencing and microsatellite markers for unravelling population structure in the clonal fungus *Verticillium dahliae*. Plant pathology, 67(1), 76-86. <https://doi.org/10.1111/ppa.12713>

Ramsden, S. C., Berry, I. R., Ellard, S., Charlton, R., Yau, S., Gokhale, D., & Taylor, G. R. (2016). Practice guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation.

Regnault, Y. (1985). Premieres observations sur le Phomopsis du tournesol. Inform. Tech. CETIOM, 92,13-20.

Rehner, S. A., & Uecker, F. A. (1994). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. Can. J. Bot. 72,1666-1674. <https://doi.org/10.1139/b94-20>

Rekab, D., Del Sorbo, G., Reggio, C., Zoina, A., & Firrao, G. (2004). Polymorphisms in nuclear rDNA and mtDNA reveal the polyphyletic nature of isolates of *Phomopsis* pathogenic to sunflower and a tight monophyletic clade of defined geographic origin. Mycological research, 108(4), 393-402. <https://doi.org/10.1017/S0953756204009372>

Riccioni, L., Duvnjak, T., Pucci, N., & Hartman, G. L. (2005). PCR- RFLP identification of the *Phomopsis* /*Diaporthe* species on soybean seeds. In: 5 th ISTA-SCH Seed Health Symposium, May 10-13, Anger, Francia, p.12.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. Mol. Biol. Evol. 34, 3299-3302.

SAGyP. (1994). Normas de Calidad, Muestreo y Metodología para los granos y Subproductos–N.º 1075/94., p. 195.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

SAMtools. (2020). BCFtools, Version 1.11. Acceso diciembre 2022. <https://github.com/samtools/bcftools/releases/tag/1.11>

Santos, J. M., & Phillips, A. J. L. (2009). Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. Fungal Divers, 34, 111-125.

Santos, J. M., Correia, V. G., & Phillips, A. J. (2010). Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology*, 114(2-3), 255-270. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.01.007>

Santos, J. M., Vrandečić, K., Cosić, J., Duvnjak, T., & Phillips, A. J. L. (2011). Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia*, 27, 9-19.

Santos, L., Alves, A. & Alves, R. (2017). Evaluating multi-locus phylogenies for species boundaries determination in the genus *Diaporthe*. *PeerJ*, 5, p.e3120.

Says-Lesage, V., Roeckel-Drevet, P., Viguié, A., Tourvielle, J., Nicolas, P., & Tourvielle de Labrouhe, D. (2002). Molecular variability within *Diaporthe/Phomopsis helianthi* from France. *Phytopathology*, 92, 308-313.

Scaglione, D., Fornasiero, A., Pinto, C., Cattonaro, F., Spadotto, A., Infante, R., ... & Testolin, R. (2015). A RAD-based linkage map of kiwifruit (*Actinidia chinensis* Pl.) as a tool to improve the genome assembly and to scan the genomic region of the gender determinant for the marker-assisted breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 11, 1-10.

Scheben, A., Batley, J., & Edwards, D. (2017). Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes: choosing the right tool for the right application. *Plant Biotech. J*, 15, 149-161. <https://doi.org/10.1111/pbi.12645>

Schneider, A. A., & Miller, J. F. (1981). Description of Sunflower Growth Stages. *Crop Sci.* 21, 901-903.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Seiler, G. J., & Rieseberg, L. H. (1997). Systematics, origin, and germplasm resources of the wild and domestic sunflower. In A.A. Schneider (ed.) *Sunflower Technology and Production*. Agron. Monogr. 35, ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. 21-65.

Skorić, D. (2009). Possible uses of sunflower in proper human nutrition. *Med Pregl*, 62, 105-110.

Skorić, D. (1985). Sunflower breeding for resistance to *Diaporthe/Phomopsis helianthi* Munt-Cvet *et al.* *Helia*, 8, 21–24.

Skripka, O. V., Shelukhin, V. I., Petina, V. V., & Serebryakova, T. P. (1993). *Phomopsis* of sunflower. *Zashch. Rast*, 8, 24-25.

Smit, W. A., Viljoen, C. D., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., & Calitz, F. J. (1996). A new canker disease of apple, pear, and plum rootstocks caused by *Diaporthe ambigua* in South Africa. *Plant Disease*, 80(12), 1331-1335.

Stewart, S., Arrivillaga, S., & Castaño, J. P. (2004). Mapas de riesgo del cancro del tallo en girasol. Recuperado de:
http://www.inia.org.uy/gras/sig/phomo/evol_phomo.html

Stewart, S. (2005). La Phomopsis o el cancro del tallo del Girasol. *Revista INIA* (2), 20-22.

Stewart, S., & Rodríguez, M. (2018). Cancro del tallo del girasol: Epidemiología y control en Uruguay. Primer taller Nacional de Enfermedades en cultivos extensivos. Tema: Cancro por *Diaporthe*/Phomopsis en soja y girasol. Libro de Resúmenes.

Suyama, Y., & Matsuki, Y. (2015). MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific Reports*, 5, Article number: 16963. <https://doi.org/10.1038/srep16963>

Talukder, Z. I., Underwood, W., Ma, G., Seiler, G. J., Misar, C. G., Cai, X. & Qi, L. (2020). Genetic Dissection of Phomopsis Stem Canker Resistance in Cultivated Sunflower Using High Density SNP Linkage Map. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1497.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38, 3022-3027.

Tamuri, A., & Goldman, N. (2017). Avoiding ascertainment bias in the maximum likelihood inference of phylogenies based on truncated data. *BioRxiv*, 186478. <https://doi.org/10.1101/186478>

Thompson, S. M., Neate, S. M., Gulya, T. J., & Aitken, E. A. (2023). *Diaporthe gulyae* colonizes seeds of sunflower (*Helianthus annuus*) systematically through leaf, petiole and stem infection. *European Journal of Plant Pathology*, 1-18.

Thompson, S. M., Tan, Y. P., Young, A. J., Neate, S. M., Aitken, E. A. B., & Shivas, R. G. (2011). Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (Phomopsis) species. *Persoonia*, 27, 80-89.

Thompson, S. M., Tan, Y. P., Neate, S. M., Grams, R. M., Shivas, R. G., Lindbeck, K., & Aitken, E. A. B. (2018). *Diaporthe novem* isolated from sunflower (*Helianthus annuus*) and other crop and weed hosts in Australia. *European journal of plant pathology*, 152, 823-831.
<https://doi.org/10.1007/s10658-018-1515-7>.

Torkamaneh, D., Laroche, J., & Belzile, F. (2016). Genome-Wide SNP Calling from Genotyping by Sequencing (GBS) Data: A Comparison of Seven Pipelines and Two Sequencing Technologies. *PLoS ONE*, 11, e0161333.

Torkamaneh, D., Boyle, B., Belzile, F. (2018). Efficient Genome wide genotyping strategies and data integration in crop plants. *Theor. Appl. Genet.*, 131, 499.

Tourvieille, D., Vear, F., & Pelletier, C. (1988). Use of two mycelium tests in breeding sunflower resistant to *Phomopsis*. *Proc. 12th Int. Sunflower Conf.*, Novi Sad, 110-114.

Trogia, C., Corró Molas, A. E., Ghironi, E., & Astiz, V. (2022). Comportamiento de híbridos de girasol frente al Cancro del tallo y podredumbre del capítulo de girasol por *Diaporthe* sp In: XVII Jornadas Fitosanitarias. Pergamino, Argentina.

Turgeon, B. G. (1998). Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 115-137.

Turgeon, B. G., & Yoder, O. C. (2000). Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 31, 1-5.

Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., & Hyde, K. D. (2014). Species limits in *Diaporthe*: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytospora*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. *Persoonia*, 32, 83-101.
<https://doi.org/10.3767/003158514X679984>

Udayanga, D., Xingzhong, L., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. A., & Hyde, K. D. (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common pathogens. *Fungal Divers*, 50, 189-225.

Udayanga, D., Liu, X., Crous, P. W., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2012). A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Divers*, 56, 157-171.

Uecker, F. A. (1988). A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Contributions from the U.S. National Fungus Collection. Mycologia Memoir*, 13, 9-12.

van Niekerk, J. M., Groenewald, J. Z., Farr, D. F., Fourie, P. H., Halleen, F., & Crous, P. W. (2005). Reassessment of *Phomopsis* species on grapevine. *Australasian Plant Pathology*, 34, 27-39.

van Rensburg, J. C. J., Lamprecht, S. C., Groenewald, J. Z., Castlebury, L. A., & Crous, P. W. (2006). Characterisation of *Phomopsis* spp. associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. *Studies in mycology*, 55(1), 65-74.

Vartia, S., Villanueva-Cañas, J. L., Finarelli, J., Farrell, E. D., Collins, P. C., Hughes, G. M., & Cross, T. F. (2016). A novel method of microsatellite genotyping-by-sequencing using individual combinatorial barcoding. *Royal Society Open Science*, 3(1), 150565.

Vergara, M., Capasso, T., & Gobbi, E. (2005). Plasmid distribution in European *Diaporthe helianthi* isolates. *Mycopathologia*, 159, 591-599.
<https://doi.org/10.1007/s11046-005-1327-0>

Verschoor, M., Castaño, F., Ridao, A., & Salaberry, T. (2014). Variabilidad de la longitud del cancro causado por dos aislamientos de *Phomopsis helianthi* en tallos de híbridos de girasol. *SEMIÁRIDA Revista de la Facultad de Agronomía UNLPam*, Vol 24(1), 39-48.

Viguié, A., Vear, F., & Tourvieille de Labrouhe, D. (1999). Interactions between French isolates of *Phomopsis/Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet. et al. and sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *European Journal of Plant Pathology*, 105(7), 693-702.

Vilaró Nieto, D. (2007). Caracterización de cultivares de girasol en su comportamiento frente a *Phomopsis helianthi*. In: *Jornada Técnica de Cultivos de Verano (2007, Montevideo)*. Memorias. Montevideo, INIA. 55-58. (Actividades de Difusión no. 505).

Voros, J., Leranth, J., & Vajna, L. (1983). Overwintering of *Diaporthe helianthi* a new destructive pathogen of sunflower in Hungary. *Acta Phytopathol. Acad.Sci. Hung*, 18, 303-305.

Vranceanu, A. V., Craiciu, D. S., Soare, G., Pacureanu, A. V., Voinescu, G., & Sandu, I. (1993). Sunflower genetic resistance to *Phomopsis helianthi* attack. In: *Proceedings of the 13th International Sunflower Conference*, Vol. II, Pisa, Italy, 1301-1306.

Vrandecic, K., Cosic, J., Jurkovic, D., Duvnjak, T., & Riccioni, L. (2009). First Report of *Diaporthe phaseolorum* on sunflower (*Helianthus annuus*) in Croatia. *Plant Dis*, 93, 1074. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1074C>

Wehmeyer, L. E. (1933). The genus *Diaporthe* Nitschke and its segregates. *University of Michigan Studies* 9, 1-161.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, 315-322. Academic Press, San Diego, USA.

Wickland, D., Battu, G., Hudson, K. A., Diers, B. W., Hudson, M. E. (2017). A comparison of genotyping-by-sequencing analysis methods on low-coverage crop datasets shows advantages of a new workflow, GB-eaSy. *BMC Bioinform*, 18, 586.

Wingfield, M. J., de Beer, Z. W., Slippers, B., Wingfield, B. D., Groenewald, J. Z., Lombard, L., & Crous, P. W. (2012). One fungus, one name promotes progressive plant pathology. *Mol. Plant Pathol*, 13, 604-613.

Wunsch, M., Schaefer, M., Gautam, P., Besemann, L., & Harveson, R. (2014). Sclerotinia head rot: Improving the methods used to screen sunflowers for resistance and prospects for using fungicides for management. 36th Annual Sunflower Research Forum. Fargo, ND. January 8-9, 2014.

Yun, S. H., Berbee, M. L., Yoder, O. C., & Turgeon, B. G. (1999). Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5592-5597.

Zambelli, A., Mancebo, M. F., Bazzalo, M. E., Reid, R. J., Sanchez, M. C., Kontz, B. J., & Mathew, F. M. (2020). Six species of *Diaporthe* associated with *Phomopsis* stem canker of sunflower in southern pampean region of Argentina. *Plant Health Progress*, 22(2), 136-142.
<https://doi.org/10.1094/PHP-07-20-0059-S>

Žilic, S., Barac, M., Pešic, M., Crevar, M., Stanojevic, S., Nišavic, A., Saratlic, G., & Tolimir, M. (2010). Characterization of sunflower seed and kernel proteins. *Helia*, 33, 103-114.

Zollinger, R. (2014). North Dakota Weed Control Guide. North Dakota State University Extension Publication. W253.

APÉNDICE

Apéndice I

Receta de medios de cultivo A) Agar Extracto de Malta (MEA). B) Agar Papa Glucosado (APG). C) Agar Avena (OA). D) Agar agua (AA)

Agar Extrato de Malta (MEA) (según Pitt, J.I. & Hocking, A.D., 1985)

Extracto de malta en polvo	20g
Peptona	1g
Glucosa	20g
Agar-agar	20g
Agua destilada	1 litro
pH final 5,6	

Agar Papa Glucosado (APG) (según Pitt, J.I. & Hocking, A.D., 1985)

Papas (infusión hecha con la masa detallada)	250g
Glucosa	20g
Agar-agar	15g
Agua destilada	1 litro

Esterilización en autoclave por 15 minutos a 121° C a 1 atmósfera de presión a nivel de mar.

Las papas peladas cortadas en cubos se hirvieron en agua destilada estéril por 30 min, luego se filtró y enrasó a un litro.

Agar Avena (OA)

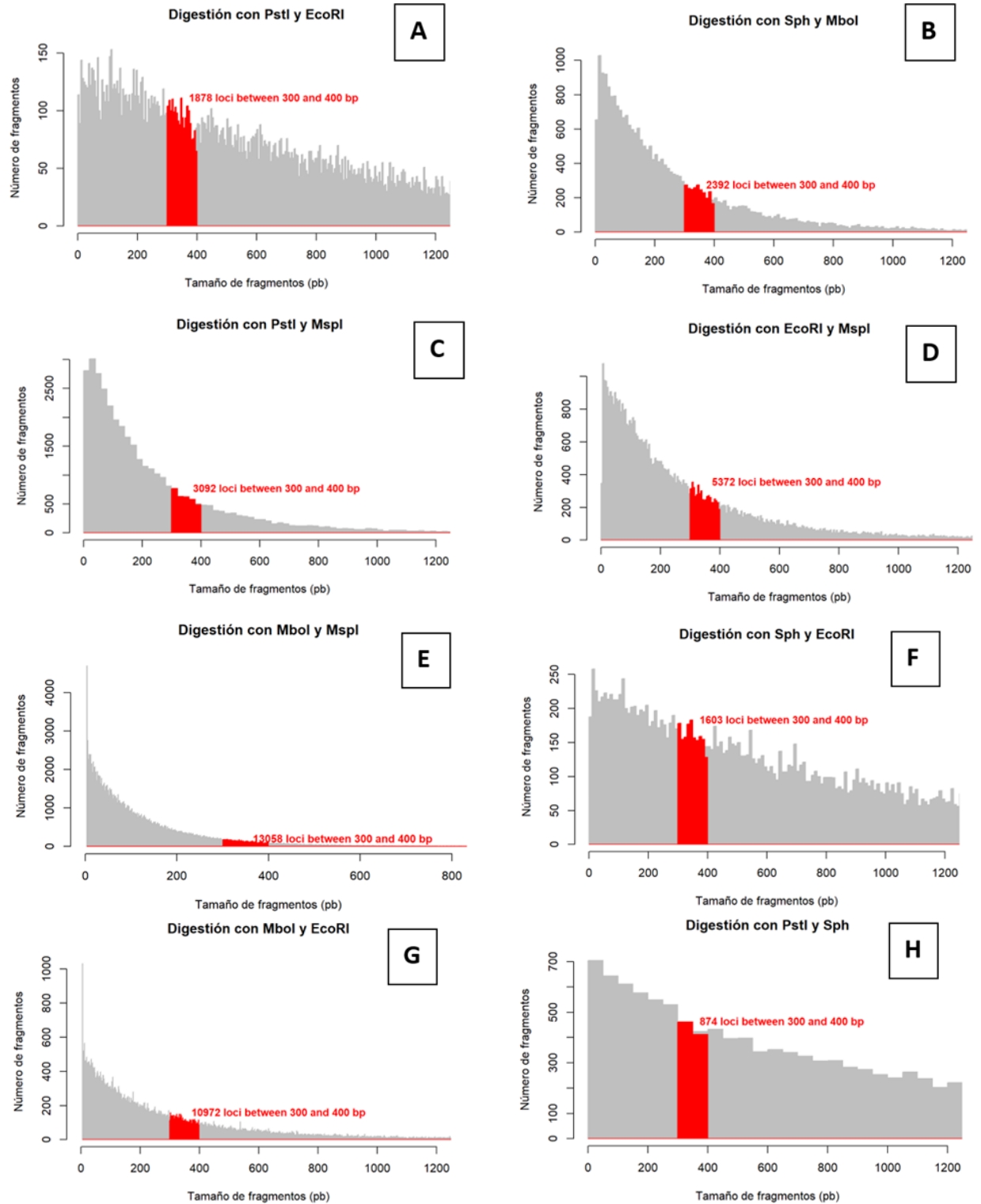
Avena	30g
Agar-agar	15g
Agua destilada	1 litro

Agar Agua (AA)

Agar-agar	20g
Agua destilada	1 litro

Apéndice II

Digestión *in silico* de genoma disponible de *D. helianthi* con enzimas de restricción.



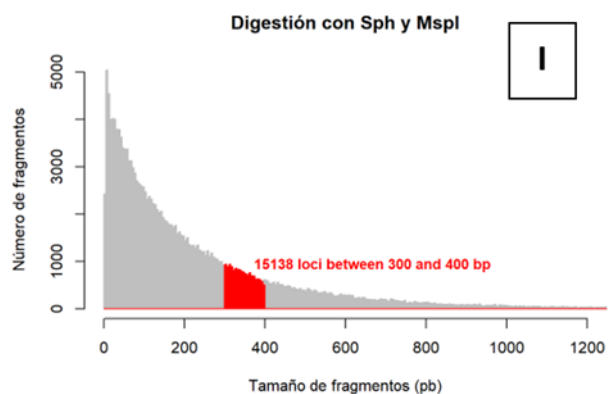


Figura N° 33. Digestión *in silico* sobre el genoma disponible de *D. helianthi* para las diferentes combinaciones de enzimas de restricción. A. Digestión con PstI y EcoRI. B. Digestión con Sph y MboI. C. Digestión con PstI y MspI. D. Digestión con EcoRI y MspI. E. Digestión con MboI y MspI. F. Digestión con Sph y EcoRI. G. Digestión con MboI y EcoRI. H. Digestión con PstI y Sph. I. Digestión con Sph y MspI.

Apéndice III

ADN genómicos obtenidos para cada aislamiento observados en gel de agarosa con el uso de transiluminador de luz UV con cámara incorporada.

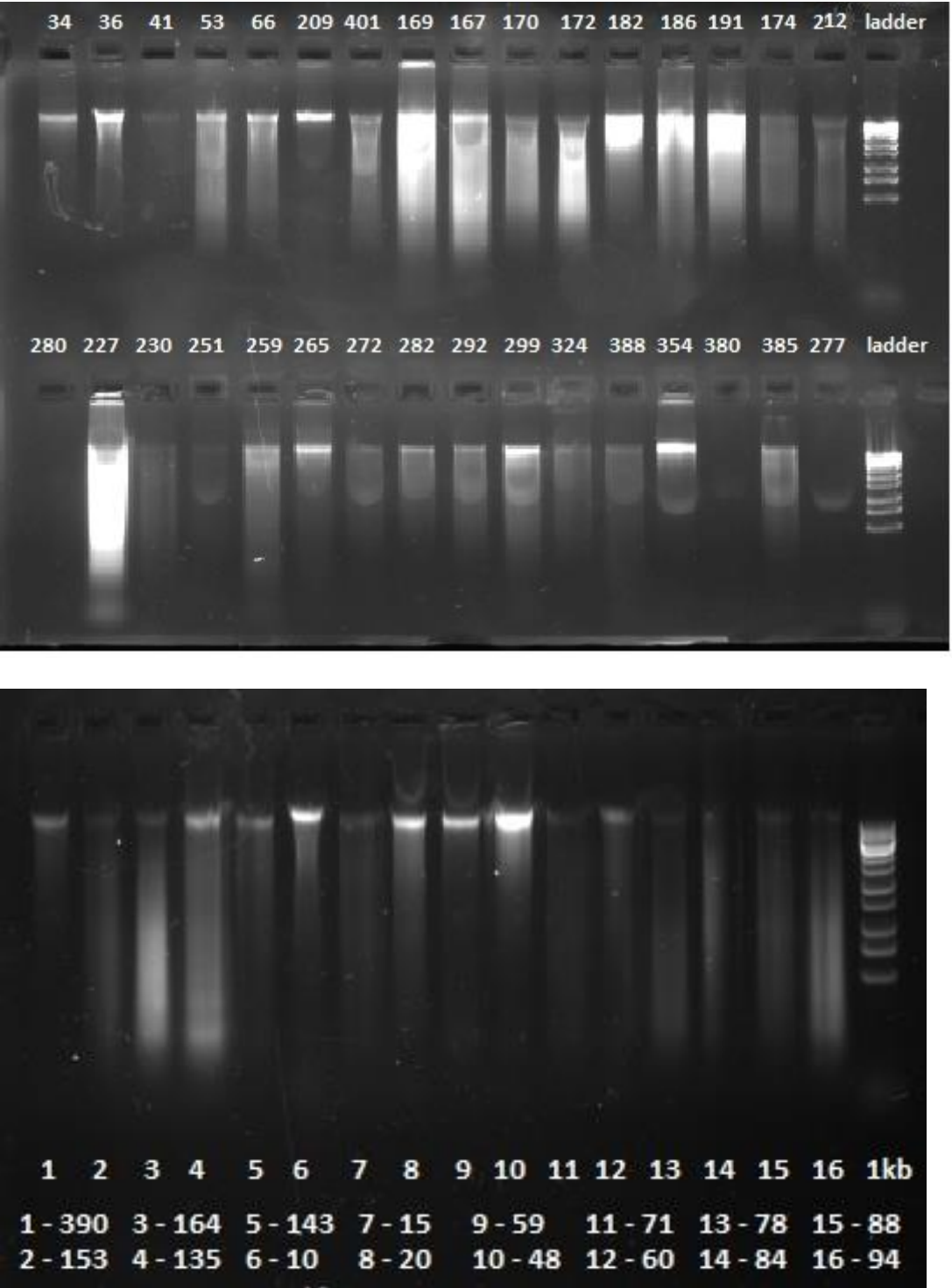


Figura N° 34. ADN genómicos en gel de agarosa observados con transiluminador de luz UV con cámara incorporada (GEL DOC XR System, BioRad).

ADN genómicos obtenidos para cada aislamiento observados en gel de agarosa con el uso de transiluminador de luz UV con cámara incorporada.

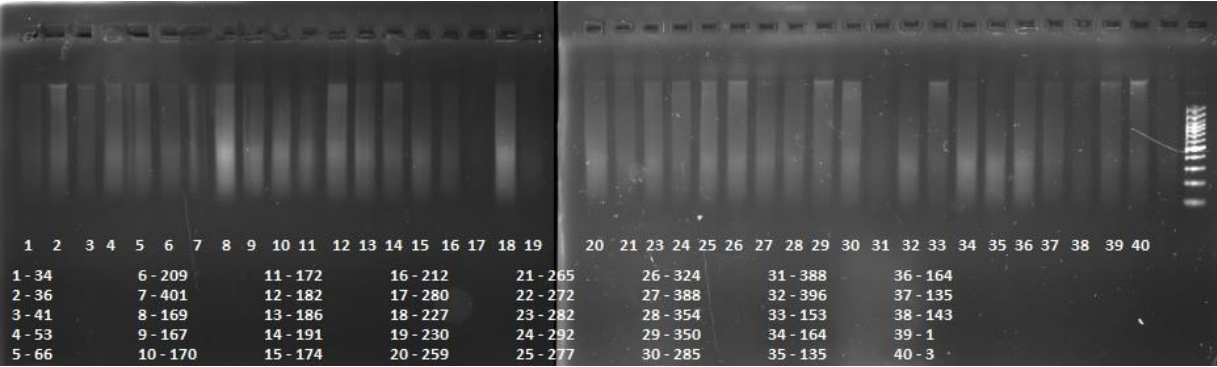


Figura N° 35. ADN genómicos y sus digestiones con enzimas de restricción PstI y MboI en gel de agarosa observados con transiluminador de luz UV con cámara incorporada (GEL DOC XR System, BioRad).

Apéndice IV

Número de secuencias resultantes de la técnica de ddRADseq para cada aislamiento.

Tabla N° 19. Cantidad de secuencias obtenidas (ddRADseq) para cada aislamiento.

Aislamiento	N° de secuencias (millones)	Aislamiento	N° de secuencias (millones)	Aislamiento	N° de secuencias (millones)
1	2	153	3,8	272	3,5
3	5,1	164	3	277	2,4
10	8,2	167	1,6	280	1,2
15	5,7	169	1,9	282	4,5
20	7,7	170	2,7	292	5,6
29	6,7	172	2	299	7,1
34	4,2	182	7	324	4,3
35	3,2	182b	0,4	343	0,5
36	10	186	2,5	354	6,8
41	5,8	191	2,7	380	6,4
48	6,5	194	5	385	1,9
53	4,7	212	2,6	388	4,4
60	5,3	227	2,6	390	3,4
66	7,4	230	2,3	390b	0,4
71	2,3	251	1,2	401	3
135	2,6	259	5,8		
143	2,5	265	5,7		