

“Determinación de un método de inoculación sencillo, eficaz y reproducible de cultivares de soja con *Cercospora kikuchii* en condiciones controladas de invernadero.”

Trabajo Final de Grado
del alumno



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 11 de septiembre de 2021

“Determinación de un método de inoculación sencillo, eficaz y reproducible de cultivares de soja con *Cercospora kikuchii* en condiciones controladas de invernadero.”

Trabajo Final de Grado

del alumno

ANDRÉS MAXIMILIANO MONTERO

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Silvana Piubello)
Co-Director

(Miguel Ángel Lavilla)
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 11 de Septiembre de 2021.

Agradecimientos:

Quiero agradecer a mi familia, mamá, papá y mi hermano Martín, que siempre me brindaron su apoyo incondicional, me formaron como persona, me dieron el ejemplo del esfuerzo y trabajo y fueron el soporte fundamental por el cual pude estudiar.

A mi novia Cris, que siempre me motivó, me empujo a meterle pilas para no aflojar, y que siempre estuvo a la par para poder avanzar y no bajar los brazos.

A los amigos de toda la vida y a los que se suman en esta etapa de estudios, esos que están en el día a día y hacen posible avanzar sea cual fueran los resultados.

A Silvana Piubello, que siempre me ayudo, me tuvo paciencia, me enseñó y me brindó sus instalaciones y conocimientos para que hoy pueda estar presentando este TFG.

A mi director de tesis y profesor Miguel Lavilla, por guiarme y brindar su apoyo en esta hermosa carrera que es la Agronomía.

A la UNNOBA y a todos los profesores que fueron parte de esta etapa de formación académica, que brindaron sus conocimientos para que todos los que estudiamos en una Universidad pública podamos formarnos como buenos profesionales y estemos orgullosos de haber estudiado en la UNNOBA.

Índice General:

1. Resumen	5
2. Introducción	6
2.1. Taxonomía	8
2.2. Patogénesis	8
3. Hipótesis	11
4. Objetivo general	11
5. Objetivos específicos	11
6. Materiales y métodos	12
6.1. Siembra del ensayo	12
6.2. Preparación del inóculo	13
6.3. Inoculación	13
6.4. Incubación	13
6.5. Evaluación	13
7. Resultados	17
8. Discusión	21
9. Conclusión	22
10. Bibliografía	24
11. Anexo	27
11.1. Análisis estadístico	27
11.2. Imágenes del ensayo	30

Palabras Claves: Soja, Método, Inoculación, Enfermedad, *Cercospora kikuchii*.

1. Resumen:

En la actualidad la soja es el principal cultivo agrícola de la zona pampeana y el rubro más importante de exportación del país. Argentina es el tercer país productor de soja en el mundo, luego de Estados Unidos y Brasil, el tercer exportador mundial de poroto de soja y el primer exportador de aceite y harinas de soja. Los factores que limitan la productividad de esta oleaginosa están relacionados, entre otros, con el manejo de suelo y cultivo, condiciones de ambientes desfavorables y con factores bióticos como las malezas, plagas y enfermedades. Estas últimas, representan uno de los factores más relevantes que afectan su producción. Entre las enfermedades más importantes de soja en la zona núcleo de Argentina se destacan las llamadas "enfermedades de fin de ciclo" (EFC), dentro de estas EFC se encuentra el Tizón foliar por *Cercospora* (TFC) causado por *Cercospora kikuchii*. Esta enfermedad ha evolucionado significativamente en los lotes de soja. Debido al aumento de la importancia del tizón de la hoja y la mancha púrpura de la soja en las últimas campañas agrícolas, tanto el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) como la Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA) llevan adelante estudios relacionados con dicha enfermedad. Uno de los problemas que enfrentan los estudios de este hongo y en común en distintas especies del género *Cercospora* es su dificultad para esporular en medios de cultivos artificiales. El manejo actual del TFC es únicamente con fungicidas, pero es indispensable el uso de cultivares resistentes para incorporar al manejo integrado de la enfermedad. El objetivo de este trabajo de investigación fue adaptar el método de inoculación desarrollado por Mian para inocular plantas de soja con *Cercospora sojina* con *Cercospora kikuchii*. Esta investigación contribuiría a determinar un método de inoculación en condiciones controladas, necesario para evaluar el comportamiento varietal de los cultivares de soja frente al TFC y con ello lograr una base para futuras investigaciones. En este trabajo se evaluaron 4 Métodos de Inoculación (MI) con 3 testigos sobre 3 variedades de soja (Davis, Tracy y Lee). Todos los métodos de inoculación propuestos causaron enfermedad en las plantas de soja, expresando los síntomas en el tallo, hoja y pecíolo, siendo el los MI 1 y 2 los más eficientes. Estos 2 métodos emplean micelio del hongo como órgano de inoculación que es fácilmente reproducible en condiciones de cultivo artificial. La evaluación de la reproducibilidad del método se realizó con el MI 1. Esta vez se inocularon las 12 variedades diferenciales de soja que se utilizaron para determinar 11 razas de *Cercospora sojina*. Los resultados obtenidos, evidenciaron la eficiencia del método en la producción de la enfermedad en los órganos asperjados. Por una defoliación temprana se decidió evaluar solamente la enfermedad producida en los tallos de las plantas de soja. De las 12 variedades ensayadas solo 3 (CNS, Tracy y Davis) presentaron diferencias significativas con Palmeto que resultó ser la más susceptible. El

elevado error experimental impidió ver si existen mayores diferencias entre estas variedades en respuesta al aislamiento de *Cercospora kikuchii* ensayado.

2. Introducción:

En la actualidad la soja es el principal cultivo agrícola de la zona pampeana y el más importante rubro de exportación en Argentina. Actualmente, Argentina es el tercer país productor de soja en el mundo, luego de Estados Unidos y Brasil; siendo el tercer exportador mundial de poroto de soja y el primer exportador de aceite de soja y harinas de soja (Satorre et al., 2011).

Durante el ciclo 2019-2020 la superficie sembrada con soja fue de 16.9 millones de hectáreas; con una producción de 49 millones de toneladas (MinAgri, 2020). Los factores que limitan la productividad de la soja están relacionados, entre otros, con el manejo de suelo y cultivo, condiciones de ambientes desfavorables y con factores bióticos, como las malezas, plagas y enfermedades (Ivancovich, 2011a).

Las enfermedades se encuentran entre los factores más relevantes que afectan la producción de soja. Este cultivo es afectado desde el momento de la siembra hasta la cosecha incluido el período de almacenamiento, por diferentes enfermedades. Se ha calculado que las pérdidas de rendimiento provocadas por las enfermedades a nivel mundial oscilan entre un 10 a un 15% (Wrather et al., 2001).

El desarrollo de las enfermedades de soja en Argentina se ve favorecido, entre otras causas, por las condiciones ambientales, el aumento de la superficie sembrada, el monocultivo, el empleo de germoplasma de escasa variabilidad y el uso de nuevas técnicas de manejo del cultivo (Ivancovich, 2011b).

El panorama sanitario de la soja en Argentina ha cambiado, pasando de ser un cultivo prácticamente libre de enfermedades, en la década del 80, a la situación actual, donde se consideran a la misma como responsables de severas reducciones en el rendimiento y la calidad, con el consecuente impacto negativo en la producción y rentabilidad del cultivo (Ivancovich, 2011b).

Entre las enfermedades importantes de soja en la zona núcleo de Argentina se destacan las llamadas "enfermedades de fin de ciclo" (EFC), entre las cuales predominan: la mancha marrón, causada por *Septoria glycines* Hemmi; la mancha ojo de rana (MOR), causada por *Cercospora sojina* Hara y el tizón foliar por *Cercospora* (TFC) causado por *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu, 1925; Ivancovich, 2003; Ivancovich, 2011a; Ivancovich, 2011b). Estas EFC pueden reducir el rendimiento entre un 8 a un 10 % con un máximo del 30 % (Carmona et al., 2004).

Debido al aumento de la importancia del tizón de la hoja y la mancha púrpura de la soja en las últimas campañas agrícolas, tanto el INTA como la Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA) llevan adelante estudios relacionados con la transmisión de semilla a plántula, prueba de fungicidas biológicos y químicos, y ensayos a campo para determinar momentos de aplicación y eficacia de fungicidas (Guillin, 2018).

En general, los hongos pertenecientes al género *Cercospora*, así como otros géneros similares, presentan una gran dificultad en esporular cuando se cultivan sobre medio artificial (Cadwell, 1994; Avila de la Calle et al., 2004; Agrios, 2007; Quinteros Benítez et al., 2008). Al igual que Daub & Chung, (2009) coincidieron con lo reportado por otros autores, que la mayoría de los aislamientos fructificaron en AJV8.

No obstante, la información acerca de cual es el medio óptimo para el estudio de la esporulación de *Cercospora* es diversa y confusa, ya que no hay criterios uniformes entre los distintos autores. Este hecho particular pone en evidencia la gran variabilidad "entre" y "dentro" de las especies pertenecientes a este género (Chen et al., 1992; Jenns et al., 1989; Salvador & Garrido, 1990; Brunelli, 2004; Cai, 2004).

Boyette & Walker, (1985) y Vathakos & Walters, (1979) en sus estudios demostraron que la especie *Cercospora kikuchii* presenta escasa esporulación en medio de cultivo agarizado, limitando a los métodos de inoculación.

El manejo actual del TFC es únicamente con fungicidas, pero es indispensable el uso de cultivares resistentes para incorporar al manejo integrado de la enfermedad. Las inoculaciones en invernadero en condiciones controladas para evaluar comportamiento de variedades son importantes para el progreso de mejoramiento de las variedades y obtención de materiales resistentes.

En el presente trabajo se avalúan distintos variantes del métodos de inoculación desarrollado por Mian et al., (2008) para inocular plantas de soja con conidios de *Cercospora sojina* en condiciones controladas de invernadero. Posteriormente, se comprueba la eficiencia del método obtenido, inoculando las 12 variedades diferenciales de soja que utilizó Mian et al., (2008) para definir 11 razas de *Cercospora sojina*. En tal sentido esta investigación contribuiría a obtener un método de inoculación simple y reproducible para evaluar el comportamiento varietal de los cultivares de soja al TFC, contribuyendo así, al plan de mejoramiento de esta oleaginosa.

2.1. Taxonomía

SuperReino: Eucariota
Reino: Fungi
Sub-reino: Dikarya
Phylum: Ascomycota
Sub-phylum: Pezizomycotina
Clase: Dothideomycetes
Sub-clase: Dothideomycetidae
Orden: Mycosphaerellales
Familia: Mycosphaerellaceae
Género:
Fasesexual: Micospharella
Faseasexual: Cercospora
Especie: *Cercospora kikuchii*

(Goodwin et al., 2001; Schoch et al., 2020)

2.2. Patogénesis:

Cercospora kikuchii es un patógeno policíclico, que cada 12 días desarrolla una nueva generación de conidios cuando la humedad relativa es superior a 80%, y las temperaturas oscilan entre 23°C y 27°C (Sinclair & Shurtleff, 1975; Yeh & Sinclair, 1980; Schuh, 1993; Kudo et al., (2011) e Ivancovich, 2011a). Kudo et al., (2011), en sus estudios de Aerobiología de *Cercospora kikuchii*, en Brasil, concluyeron que el mayor número de conidios en el aire se producían entre las 8 y las 15 horas, con una humedad relativa superior a 80%, y temperaturas entre 23 y 27 °C indicando que la cantidad de conidios en el aire podría ser utilizada para el monitoreo de la enfermedad (Yeh & Sinclair, 1980; Schuh, 1993).

En las semillas levemente afectadas, la testa generalmente se abre antes de la emergencia y, por lo tanto, las plántulas escapan a la infección. En el caso de semillas severamente infectadas parte de la testa puede quedar adherida al cotiledón, emerger con la plántula, afectar a los cotiledones e incrementar el inóculo inicial de la enfermedad (Sinclair & Shurtleff, 1975).

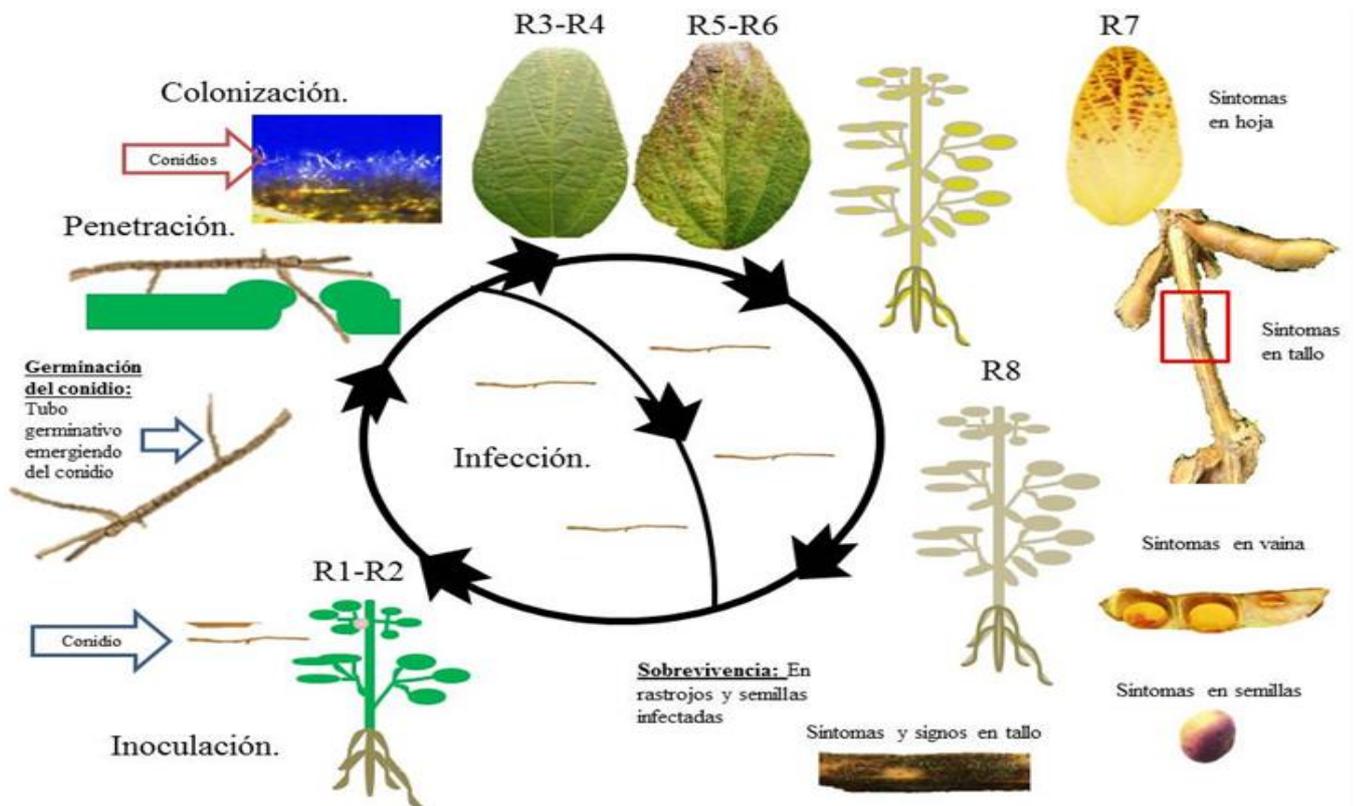
Estudios histopatológicos se demostró que las hifas de *Cercospora kikuchii* penetran en las semillas de soja a través de la región hiliar, por las traqueidas hiliares y luego se agregan en el parénquima estrellado. También penetran en la semilla a través de los poros epidérmicos y grietas en el recubrimiento de la semilla. *Cercospora kikuchii* puede invadir los tejidos del embrión, el endosperma y la cubierta de la semilla. En general, *Cercospora kikuchii* se localiza en el recubrimiento de la semilla, ocasionalmente se encuentra en los cotiledones y raramente en el eje hipocótil-radicular. Forma

agregados hifales en el recubrimiento de la semilla y causa necrosis de las células cotiledonales y elementos vasculares (Singh & Sinclair, 1986).

El proceso de infección en plantas de soja se inicia cuando los conidios y/o micelio, sobrevivientes en semillas o en rastrojos infectados, germinan y generan uno o varios tubos germinativos. Bajo condiciones controladas, 25°C y saturación hídrica (Schuh, 1991), el 50 % de los conidios germinan a las 2 horas de incubación como se corroboró experimentalmente. El tubo germinativo penetra en la superficie del folíolo del hospedante, a través de los estomas, desarrollándose las hifas primarias y secundarias que colonizan el mesófilo. Las hifas liberan micotoxinas (Velicheti & Sinclair, 1994) que destruyen las células circundantes, necrosando los tejidos y provocando el TFC. Las hifas de *Cercospora kikuchii* pueden encontrarse en la superficie de pétalos, folíolos, vainas y semillas, así como también en el ovario y la testa de la semilla (Chen, Lyda & Halliwell, 1979), creciendo en el cotiledón a través de los poros de la misma durante la germinación.

Después de la infección (tres a cinco días) se forman los conidióforos, en los cuales, a partir de la célula conidiógena, se produce una nueva generación de conidios libres que se propagan principalmente por viento para iniciar un nuevo ciclo de vida (Figura 1). Durante la conidiogénesis, un solo núcleo migra al extremo apical del conidio, dando lugar a todos los núcleos en el conidio. Los conidios maduros incluyen 13-27 células, la mayoría de las cuales son uninucleadas. Las células apicales o basales del conidio formarán conidióforos (Fernandez, Glawe & Sinclair, 1991).

Para que el ciclo de vida de *Cercospora kikuchii* se inicie, los conidios y/o micelio deben sobrevivir en semillas infectadas, en rastrojos infectados, en malezas hospederas del patógeno (Mc Lean & Roy 2009), que constituyen las fuentes de inóculo primario. Sin embargo, Marinelli et al. (2011) y Henning (2004) comprobaron que la tasa de transmisión planta-semilla era muy baja y que el mayor índice de infección por *Cercospora kikuchii* en la semilla era de 2,12 %. La mayoría de las especies del género *Cercospora*, incluyendo *Cercospora kikuchii*, no tienen estado sexual conocido, sin embargo, otras investigaciones sugieren que su fase sexual pertenecería al género *Micospharella* (Goodwin, Dunkle & Zismann, 2001).



Lavilla, Ivancovich y Díaz Paleo, 2018.

Figura 1. Ciclo biológico de *Cercospora kikuchii* y desarrollo de la enfermedad.

3. **Hipótesis:**

Hipotesis 1: Es posible inocular artificialmente en invernadero plantas de soja (*Glycine max*) con *Cercospora kikuchii* independientemente del órgano del hongo utilizado en el inóculo y reproducirlo en distintas variedades de soja.

Hipotesis 2: La inoculación bajo condiciones controladas de invernadero permite evaluar el comportamiento varietal frente a *Cercospora kikuchii* en los cultivares utilizados para identificar razas de *Cercospora sojina* en soja.

4. **Objetivo general:**

Disponer de una metodología de inoculación reproducible en condiciones controladas de invernadero que permita trabajar en la evaluación de cultivares de soja frente a *Cercospora kikuchii*.

5. **Objetivos específicos:**

- Evaluación de diferentes métodos de inoculación para *Cercospora kikuchii*.
- Comprobar la eficiencia y reproducibilidad de la metodología más promisoría en variedades que presentan comportamiento diferencial a razas de *Cercospora sojina*.

6. Materiales y métodos:

Primer ensayo:

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio privado de Fitopatología “Silvana Piubello” de la localidad de Junín, en el cual se probaron diferentes variantes del método de inoculación (MI) de Mian et al., (2008) el cual utiliza solo esporas para inocular con *Cercospora sojina*.

Se utilizó un diseño experimental en bloques con arreglo factorial de 7 (métodos de inoculación) x3 (variedades) y 3 repeticiones. Cada repetición es una maceta con 5 plantas. Métodos de inoculación (MI) :

- MI 1: Asperjado con trozos de micelio (20000 ml-1) con fotoperíodo de 12 horas;
- MI 2: Asperjado con trozos de micelio (20000 ml-1) con 48 horas de oscuridad;
- MI 3: Asperjado con esporas (20000 ml-1) con fotoperíodo de 12 horas;
- MI 4: Asperjado con esporas (20000 ml-1) con 48 horas de oscuridad;
- Testigo 1: Asperjado con agua con fotoperíodo de 12 horas (testigo);
- Testigo 2: Asperjado con agua con 48 horas de oscuridad (testigo);
- Testigo 3: testigo absoluto (sin asperjar).

Variedades:

- Tracy
- Davis
- Lee

Estas variedades fueron seleccionadas entre las 12 variedades diferenciales de soja usadas por Mian et al., (2008) para definir razas de *Cercospora sojina*. La variedad Lee se comporta como susceptible, la Davis como resistente, y la Tracy se comporta como resistente y susceptible para las razas 11 y 12 de *Cercospora sojina*, respectivamente, presentes en la Argentina. Se tomaron como antecedente estas 3 variedades con distintos comportamiento frente a *Cercospora sojina*, para verificar que frente a la inoculación con *Cercospora kikuchii* no influya el comportamiento de la variedad usada.

6.1. Siembra del ensayo:

Las semillas para su germinación fueron colocadas en bandejas con arena húmeda. Las cuales se introdujeron en bolsas de polietileno para lograr una cámara húmeda y se colocaron en una cámara de cultivo a 25°C+/- 2. Una vez germinadas las plántulas se trasplantaron a macetas, con sustrato compuesto por una mezcla de tierra y perlitas en una proporción 3:1. Se colocaron 5 plantas por macetas. Las macetas fueron colocadas en invernáculo donde crecieron hasta el momento de la inoculación, que se realizó cuando alcanzaron el estado fenológico V2 (Fehr et al., 1977). (Anexo: Imágenes 1, 2 y 3).

6.2. Preparación del inóculo:

El medio de cultivo para replicar el inóculo utilizado en el presente trabajo fue el jugo de vegetales V8. El inóculo de *Cercospora kikuchii* empleado para el ensayo fue un aislamiento proveniente de semillas de plantas cultivadas en San Miguel de Tucuman (2016), provisto por el Ing. Agr. Miguel Lavilla. Éste se repicó e incubó a 25°C +/- 2 con fotoperíodo de 12 horas. Las esporas de las colonias de *Cercospora kikuchii* fueron removidas con un pincel y disueltas en 100 ml de agua destilada estéril, y el micelio fue raspado y también disueltas en 100 ml de agua destilada estéril. El inóculo se filtró a través de una muselina para eliminar impurezas. La cuantificación de esporas y/o trozos de micelio se realizó con un hematocitómetro bajo microscopio óptico con un lente de 400x. Una vez finalizada la cuantificación, se preparó la solución a la concentración de 20000 conidios y/o trozos de micelio/ ml para la inoculación, agregándole TWEEN 20 (5 gotas por litro), con el fin de disminuir la tensión superficial de las gotas y mejorar la inoculación. (Anexo: imágenes 4, 5 y 6).

6.3. Inoculación:

La inoculación se realizó asperjando la solución sobre la parte aérea para inocular y evaluar la enfermedad en hojas, pecíolos y tallos, de los 3 cultivares de soja (Davis-DA, Tracy-TR y Lee-LI) en el estado fenológico V2 (Fehr et al., 1977), utilizando un aspersor manual. (Anexo 11.2: imagen 7).

6.4. Incubación:

La incubación de la enfermedad sobre las plantas se llevó a cabo en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura (25°C) y una humedad del 100%, con un fotoperíodo u oscuridad según corresponda el tratamiento asignado, durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo las plantas se llevaron al invernáculo, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad al 100% y fotoperíodo de 16 horas. (Anexo 11.2: imágenes 8, 9, 10 y 11).

6.5. Evaluación:

El comportamiento de las variedades de soja frente al TFC se realizó mediante la evaluación de la severidad (S) de la enfermedad en los 3 órganos de la planta inoculados: hojas, tallos y pecíolos. Para ello, se empleó la escala visual sobre hojas, tallos y pecíolos. (Figuras 2.a y 2.b). (Lavilla et al., 2018).

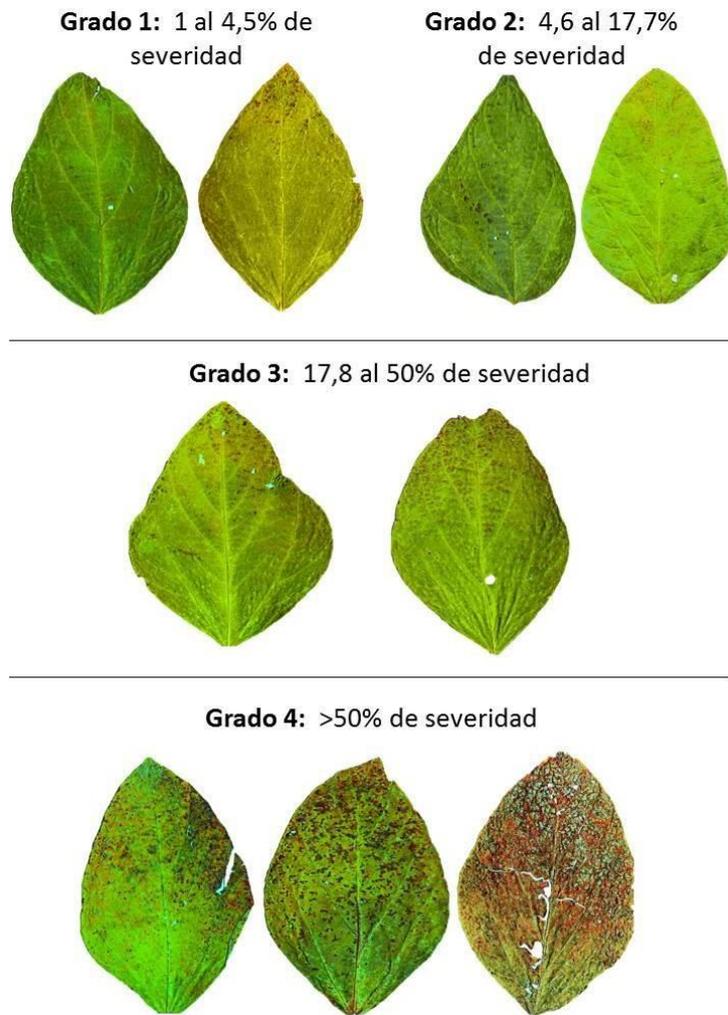


Figura 2. Escala en grados para evaluar al tizón foliar por *Cercospora* en folíolos de soja. (Lavilla et al., 2019b).

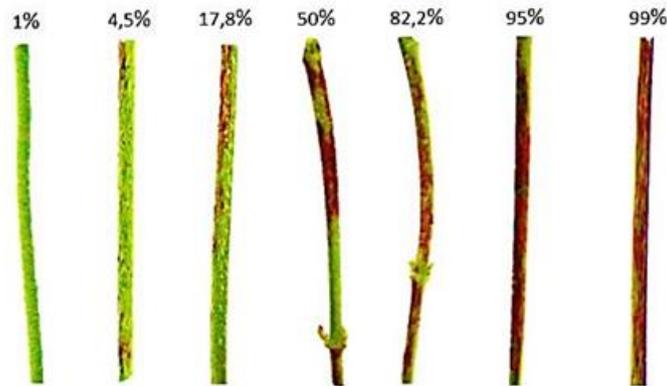


Figura 2.a. Escala del tizón foliar por *Cercospora* causado por *Cercospora kikuchii* en tallos o en pecíolos de soja (Lavilla et al., 2019b).

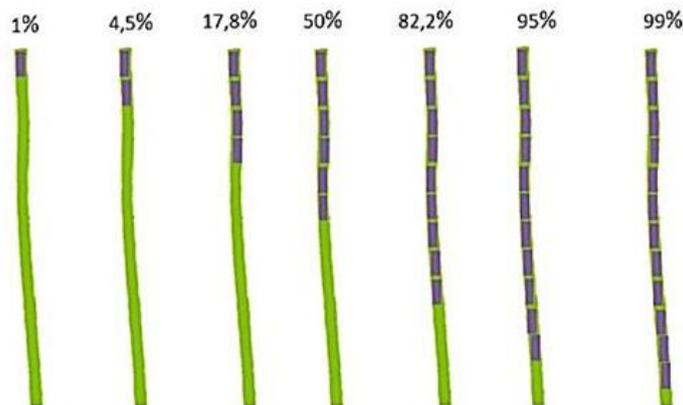


Figura 2.b. Escala de severidad diagramática del TFC causado por *Cercospora kikuchii* en tallos y pecíolos de soja (Lavilla et al., 2019b).

En todas las plantas de cada repetición se observaron las hojas, pecíolos y los tallos desde la cicatriz de la inserción de los cotiledones hasta la inserción de la 2ª hoja trifoliada (momento de la inoculación) y se determinaron visualmente el % del área ocupada por las manchas de la enfermedad. Las lecturas se realizaron a partir de 7 días pos inoculación, cada 7 días durante 7 semanas consecutivas. Los datos obtenidos fueron analizados a través del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE).

El ABCPE es una técnica de análisis recomendada cuando se requiere identificar las relaciones del progreso de la enfermedad. Este método de análisis epifitológico no necesita tipo de ajuste a modelos predeterminados y, por ende, no requiere de consecuentes transformaciones de valores que puedan enmascarar o confundir posibles efectos de tratamiento. Sin embargo, valores bajos de la enfermedad, durante el período monitoreado, tienen poco efecto sobre el ABCPE. El ABCPE estabiliza la varianza de los valores porcentuales de la enfermedad dentro de tratamientos. Es posible detectar efectos de los mismos que podrían no detectarse por el análisis de tasas relativas de incremento

de la enfermedad. Los resultados pueden ser más confiables donde, al reducir la varianza, disminuye el coeficiente de variación, el cual por lo regular es alto en este tipo de estudios, incrementado la confiabilidad de las conclusiones derivadas de este tipo de estudios epidemiológicos. Esta técnica calcula integrando los rectángulos formados por el punto medio de la intensidad de la enfermedad (incidencia o severidad) alcanzada entre diferentes tiempos en que se monitorea.

Fórmula de ABCPE:

$$ABCPE = \sum_i \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde Y_i es la intensidad de la enfermedad y t es el período de evaluación en días después de la siembra o cualquier otra escala que se desee usar en función del tiempo. En este caso las unidades serán porcentajes (%) y días. Además, es bueno decir que este método de análisis epifítico considera la variación de la epidemia en el tiempo, para los análisis comparativos visuales que pudieran requerirse.

Los datos obtenidos se compararon a partir de un análisis de la varianza (ANOVA), realizando la comprobación de los supuestos teóricos correspondientes. Las comparaciones de medias fueron realizadas a través del test de LCD Fisher (nivel de significancia: 0,05).

Segundo ensayo:

Una vez establecido el método de inoculación, se comprueba su eficiencia en una nueva inoculación, en la cual se usaron las 12 variedades de soja que Mian et al., (2008), usó para definir a 11 razas de *Cercospora sojina*.

Las variedades diferenciales son:

- Diferencial 1: Davis
- Diferencial 2: Peking
- Diferencial 3: Kent
- Diferencial 4: CNS
- Diferencial 5: Palmeto
- Diferencial 6: Tracy
- Diferencial 7: Hood
- Diferencial 8: Lincoln
- Diferencial 9: Lee
- Diferencial 10: Richland
- Diferencial 11: S100
- Diferencial 12: Blackhawk

El diseño experimental utilizado fue en bloques al azar con 12 tratamientos (variedades), 4 repeticiones de cada tratamiento, que a su vez constaron de 5 plantas por maceta. Siembra y trasplante del ensayo, preparación del inóculo, inoculación, e incubación se llevaron a cabo como fueron descritos para el ensayo 1. Se realizaron 5 evaluaciones de

la severidad (S) de TFC cada 7 días a partir del séptimo día después de la inoculación, utilizando la escala visual de hoja, pecíolo y tallo, (figura 2.a y 2.b) (Lavilla et al., 2018). Con los datos de las 5 evaluaciones se determinó el % de severidad y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE).

Los datos obtenidos se compararán a partir de un análisis de la varianza (ANOVA), realizando la comprobación de supuestos teóricos correspondientes. Las comparaciones de medias serán realizadas a través del test tukey (nivel de significancia: 0,05).

7. Resultados:

Primer Ensayo:

Todos los métodos de inoculación utilizados pudieron producir la enfermedad en los 3 órganos evaluados (tallo, hoja y pecíolo), en las 3 variedades de soja utilizadas (Davis, Lee y Tracy). Las tres variedades diferenciales de soja utilizadas en esta experiencia no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), en el ABCPE de la SEV del TFC en el follaje (Tabla 1).

Tabla 1. Área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) de la severidad de los síntomas del tizón foliar por *Cercospora*, a partir de las inoculaciones con aislamientos de *Cercospora kikuchii* en los distintos órganos y en las diferentes variedades.

Variedades diferenciales	ABCPE de la severidad de los síntomas en hoja	ABCPE de la severidad de los síntomas en tallo	ABCPE de la severidad de los síntomas en pecíolo
Davis	0,63A	2,51A	0,56A
Lee	0,66A	3,04A	0,61A
Tracy	0,66A	3,78A	0,62A
D.M.S.	0,11055	1,47489	0,13891

D.M.S.: diferencia mínima significativa (Alfa=0,05). □□□ Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Figura 3: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hoja de los tratamientos en función del tiempo:

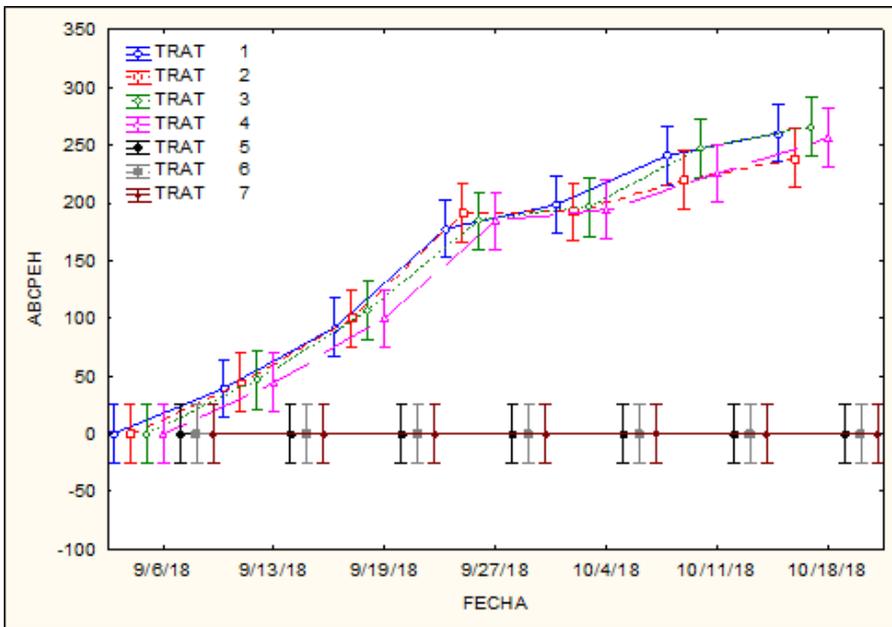


Figura 4: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en tallo de los tratamientos en función del tiempo:

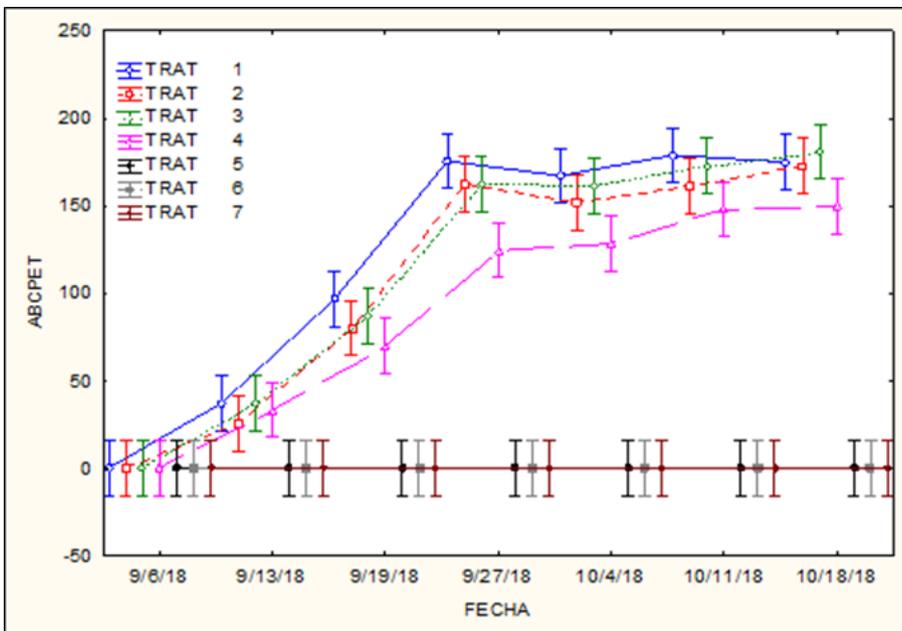
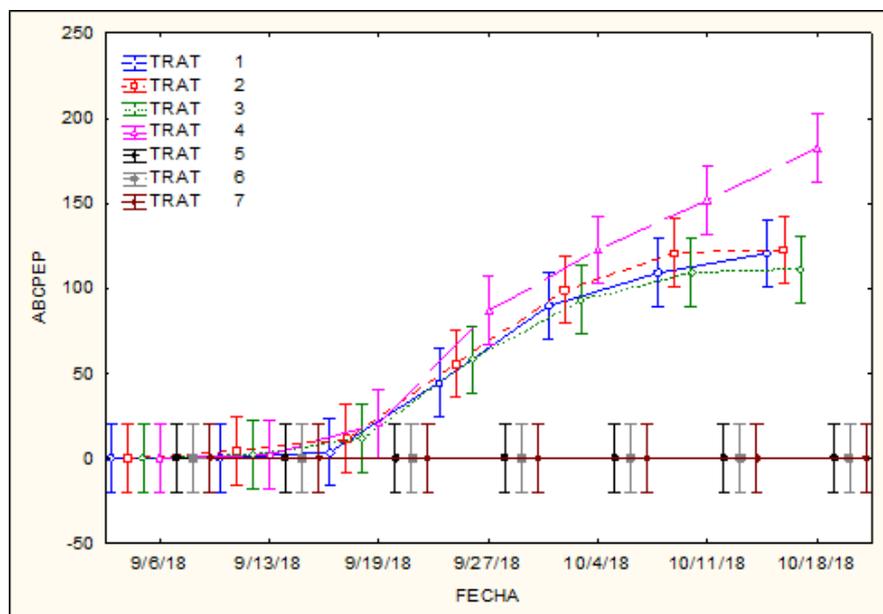


Figura 5: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en peciolo de los tratamientos en función del tiempo:



En la tabla 2, y en las figuras 3, 4 y 5 se observa que a partir de la sexta semana la evolución de la enfermedad no presentaría diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) respecto a la anterior evaluación. Por lo tanto el tiempo de evaluación de la SEV del TFC en el follaje debería prolongarse hasta la quinta semanas después de la inoculación.

Tabla 2. Evolución temporal de la severidad del tizón foliar por *Cercospora* (SEVTFC) causado por *Cercospora kikuchii* en hoja, peciolo y tallo. (promedio de los 4 MI)

Fecha de evaluación	SEVTFC hoja	SEVTFC tallo	SEVTFC peciolo
06/09/2018	0A ^{ΔΔΔ}	0A	0A
13/09/2018	7,16 ^B	5,39 ^B	0,32 ^{AB}
19/09/2018	11,83 ^C	10,47 ^C	1,91 ^B
27/09/2018	14,53 ^D	11,83 ^D	6,83 ^C
04/10/2018	17,39 ^E	13,02 ^E	9,68 ^D
11/10/2018	20,71^F	13,73^E	10,32^{DE}
18/10/2018	21,03^F	13,97^E	11,59^E
Método de inoculación	**	**	**
Bloque	n.s.	n.s.	n.s.
C.V. [□]	8,29	6,26	17,18
D.M.S. ^{□□}	1,95113	1,08898	1,7742
Media de SEV TFC	13,24	9,77	5,80

Referencias: n.s: diferencias no significativas, **Diferencia altamente significativa; [□]C.V.: coeficiente de variación; ^{□□}D.M.S.: diferencia mínima significativa ($\alpha = 0,05$). ^{□□□}Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

En la tabla 3 se describen el análisis del porcentaje del Severidad de la TFC en los 3 órganos evaluados. El % SEV de TFC en hojas no presentó diferencias diferencias significativas entre los tratamientos. Con respecto al tallo el MI 4 se diferencia significativamente del 1 y 3. Y en pecíolo el MI 4 se diferencia significativamente del 1, 2 y 3. Dada la dificultad en lograr la formación de conidios in vitro, y observando los resultados de la tabla 3, el órgano de inoculación más eficiente es el micelio. Por lo tanto, el MI 1: asperjado con trozos de micelio (20000 ml-1) con fotoperíodo de 12 horas y MI 2: asperjado con trozos de micelio (20000 ml-1) en oscuridad son los métodos que facilitan la inoculación con el uso de micelio, dado que este órgano se desarrolla sin dificultad en el medio V8, medio seleccionado para su multiplicación.

Tabla 3: Severidad (%) del tizón foliar por Cercospora (SEVTFC) causado por *Cercospora kikuchii* en hoja, pecíolo y tallo según el método de inoculación utilizado.

Tratamientos	SEVTFC hoja	SEVTFC tallo	SEVTFC pecíolo
Método1 [□]	23,12 ^{B□□□□}	18,57 ^C	8,73 ^B
Método 2	22,38 ^B	17,06 ^{BC}	9,6 ^B
Método3	23,97 ^B	18,1 ^C	8,89 ^B
Método4	23,18 ^B	14,68 ^B	13,41 ^C
Testigo1	0A	0A	0A
Testigo2	0A	0A	0A
Testigo3	0A	0A	0A
Tratamiento	**	**	**
Bloque	n.s.	n.s.	n.s.
C.V. ^{□□}	28,42	29,61	45,12
D.M.S. ^{□□□}	2,342	2,753	2,491

**Diferencias altamente significativas; n.s: diferencias no significativas, [□]MI: método de inoculación; ^{□□}C.V.:coeficiente de variación; ^{□□□}D.M.S.: diferencia mínima significativa (Alfa=0,05). ^{□□□□}Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Resultados:

Segundo ensayo

Establecido que el micelio es el órgano del hongo que permite reproducir la TFC en plantas de soja en condiciones controladas, y que su producción es eficiente, se evaluó su reproducibilidad, seleccionando al MI 1 ya que las plantas se mantienen en cámara de cultivo con fotoperíodo.

Con el MI 1 se pudo producir el TFC en las 12 variedades de soja ensayadas, confirmando así la reproducibilidad del mismo.

La inoculación realizada sobre el follaje determino que el TFC produjera una brusca defoliación a los 21 días después de la inoculación, no pudiendo completarse el ciclo de las 5 lecturas post inoculación preestablecidas, por lo cual se decidió no realizar su análisis estadístico. En tallo el desarrollo de la enfermedad permitió realizar las 5 lecturas y por lo tanto realizamos el análisis estadístico correspondiente. En la tabla 4 se describe el comportamiento de las 12 variedades analizando el área bajo la curva del progreso de la enfermedad de los síntomas del TFC en tallo.

Tabla 4: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad de la severidad (ABCPES) de los síntomas del tizón foliar por Cercospora, a partir de la inoculación con el aislamiento de *Cercospora kikuchii* en el tallo en 12 variedades de soja.

Variedad Diferencial	Medias	ANOVA
CNS	139,54	A
Tracy	150,36	A
Davis	160,15	A
Richland	211,24	AB
Lee	214,18	AB
S100	216,61	AB
Peking	239,37	AB
Lincoln	263,62	AB
Hood	313,58	AB
Blackhawk	403,80	AB
Kent	457,30	AB
Palmeto	541,68	B
DMS	354,23368	

D.M.S.: diferencia mínima significativa (Alfa=0,05). □□□Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Los resultados obtenidos, muestran que cuando se analiza el área bajo la curva del progreso de la severidad de la enfermedad en TFC en el tallo, hay 3 variedades (CNS, Tracy y Davis) que se diferencian significativamente de una sola (Palmeto).

8. Discusión:

La inoculación en condiciones controladas de laboratorio y/o invernadero, es una herramienta necesaria para la búsqueda de cultivares de soja resistentes al TFC. Un método de inoculación adecuado, sencillo, eficaz y reproducible es necesario para facilitar las futuras investigaciones en el mejoramiento genético de los cultivares de soja frente al TFC. Boyette & Walker, (1985) y Vathakos & Walters, (1979) en sus estudios demostraron que la especie *Cercospora kikuchii* presenta escasa esporulación en medio de cultivo agarizado, limitando a los métodos de inoculación. Para superar esta limitante usualmente

se utilizan medios líquidos con agitación. Para sortear esta problemática, en nuestra experiencia se pudo corroborar que empleando micelio se puede producir una correcta infección del follaje de plantas de soja bajo condiciones controladas de invernadero. En tal sentido los métodos 1 y 2 de inoculación ensayados, empleando micelio en lugar de conidios permiten solucionar la desventaja observada por estos autores para la producción de conidios. Asimismo el tiempo de evaluación de la enfermedad en invernáculo es relativamente corto, obteniendo resultados concretos a las cinco semanas después de la inoculación; pudiendo realizar más de un ensayo por año.

En el segundo ensayo la manifestación de la TFC en hojas fue muy agresiva produciendo una brusca defoliación que impidió su evaluación. Las hojas son los órganos de evaluación más importantes en estas enfermedades que producen manchas foliares, por lo tanto, sería importante tratar de mejorar el método, logrando menos agresividad de la enfermedad en las hojas. Esto podría deberse a que el micelio como fuente de inóculo se presenta como más agresivo o a que las condiciones ambientales en las cuales estuvieron las plantas mientras se desarrollaba la enfermedad también fueron muy predisponentes. Por lo tanto, sería importante, avanzar con nuevos ensayos donde se evalúen distintas alternativas a estos dos factores, para encontrar la condición más adecuada. Además, Latorre Rapela (2012) concluye que las poblaciones de *Cercospora kikuchii* y *Cercospora sojina* son fenotípica, genotípica y geográficamente variables, constituyendo un grupo muy heterogéneo. Como se utilizó un solo aislamiento de *Cercospora kikuchii*, considerado muy agresivo, habría que probar con distintos aislamientos de *Cercospora kikuchii* para poder evaluar su efecto.

Los resultados del segundo ensayo en el órgano evaluado (tallo), tuvo un elevado coeficiente de variación (Tabla 4), es decir, que hay una gran dispersión de los datos de la variable respuesta respecto a su media, por lo cual solo nos permite analizar una tendencia de comportamientos de las variedades frente a *Cercospora kikuchii*. El elevado error experimental impidió ver si existe mayores diferencias significativas entre estas variedades en respuesta a este aislamiento de *Cercospora kikuchii*.

Al evaluarse la severidad del TFC en tallo, los resultados obtenidos no pueden ser comparados con los de Mian et al., (2008), pues él evalúa la severidad de MOR, causada por *Cercospora sojina*, en hoja. En nuevos ensayos se debería evaluar la severidad del TFC en hojas y observar si el comportamiento de las variedades diferenciales utilizadas en MOR, es similar para el TFC.

9. Conclusiones:

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten: aceptar la hipótesis 1, ya que fue posible inocular artificialmente en invernadero plantas de soja (*Glycine max*) con *Cercospora kikuchii*, y evaluar la severidad del TFC en hoja, tallo y pecíolo en distintas

variedades de soja. Asimismo se rechaza la Hipotesis 2 porque no se pudo evaluar la severidad en hoja del TFC en los cultivares utilizados para identificar razas de *Cercospora sojina* en soja. Los resultados de la evaluación de la severidad del TFC en tallo no fueron contundentes, por lo tanto se pudo observar una tendencia, pero no se pudo llegar a una conclusión del comportamiento varietal de las variedades ensayadas frente al TFC.

10. Bibliografía:

- Agrios, G.N. (2007) Fitopatología LIMUSA, D.F., México.
- Ávila de la Calle, A.; Benali, A. y Trapero Casas, A. (2004) Variabilidad morfológica y cultural de *Pseudocercospora cladosporioides*, agente del emplomado del olivo. Bol. Sanid. Veg. Plagas 30:369-384.
- Boyette, C. D., and Walker, H. L. 1985. Production and storage of inoculum of *Cercosporakikuchii* for field studies. *Phytopathology* 75:183-185.
- Brunelli, K. (2004) *Cercospora zea-maydis*: Esporulação, diversidade morfo genética e reação de linhagens de milho. Doctoral Thesis, Universidade de Sao Paulo, Brasil.
- Cadwell, V. (1994) Cercosporioid fungi on Australian native plants. Doctoral Thesis, University of Melbourne, Australia.
- Cai, G. (2004) *Cercospora* leaf blight of soybean: pathogen vegetative compatibility groups, population structure, and host resistance. Doctoral Thesis. Louisiana State University. <http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-12112003-143624/>.
- Cai G., Schneider R.W. & Padgett G.B. 2009. Assessment of lineages of *Cercospora kikuchii* leaf blight. *Plant Dis.* 93:868-874.
- Carmona, M.D., Ploper, P., Grijalba, M., Gally D., Barreto, D. 2004. Enfermedades de fin de ciclo del cultivo de soja. Guía para su reconocimiento y manejo, Buenos Aires. 20 pp.
- Chen, M., Lyda, S., & Halliwell, R. 1979. Infection of Soybeans with *Conidia* of *Cercosporakikuchii*. *Mycologia*, 71(6), 1158-1165. doi:10.2307/3759102.
- Chen, W.; Hoy, J.W. y Schneider, R.W. (1992) Species-specific polymorphism in transcribed ribosomal DNA of the five *Pythium* species. *Exp. Mycol.* 16: 22–34.
- Daub, M.E. y Chung, K.R. (2009) Photoactivated perylequinone toxins in plant pathogenesis. En: *The mycota V* (Ed.: Deising, H.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, p. 201-219.
- Fehr W.R., Caviness C.E., Burnood D.T., Pennington J.S. 1977. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science* 11:929–931.
- Fernandez, F., Glawe, D., & Sinclair, J. 1991. Microcycle Conidiation and Nuclear Behavior during Conidiogenesis in *Cercosporakikuchii*. *Mycologia*, 83(6), 752-757. doi:10.2307/3760432
- Goodwin, S. B., Dunkle, L. D., & Zismann, V. L. 2001. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91:648- 658.
- Guillin, E. 2018. Disponible en: <http://ria.inta.gob.ar/contenido/soja-la-mancha-purpura-es-causa-de-preocupacionepidemiologica>.
- Henning A. 2004. Patología e tratamento de sementes noções gerais. Londrina Embrapa-soja, 49pp.

- Ivancovich, A. 2003. Enfermedades de la soja. Curso de actualización, FAVE. Universidad Nacional del Litoral. 84 pp.
- Ivancovich, A. 2011a. Diagnóstico y manejo de enfermedades de soja. Buenos aires: INTA. 100 p. Il.Color.
- Ivancovich, A. 2011b. Enfermedades de soja: diagnóstico y manejo. Buenos Aires: INTA, 78 p. Il. Color.
- Jenns, A.E.; Daub, M.E. y Upchurch, R. G. (1989) Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 79: 213-219.
- Kudo, A., Blum, L. & Lima M. 2011. Aerobiology of *Cercosporakikuchii*. *Ciencia Rural*, Santa Maria, v.41: n.10, 1682-1688.
- Latorre Repela M.G.M. 2012. Diversidad morfo-genética de *Cercospora* en soja. Detección precoz de la infección por *C. kikuchii*. Tesis doctoral. 224 p. Disponible en: <http://web10.unl.edu.ar:8080/tesis/bitstream/handle/11185/435/Tesis.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Lavilla, M.A, Ivancovich A., Díaz Paleo, A., Piubello, S., Montero, A.M., Tonellotto, A.C. 2018. Diagrammatic scale for assessment of severity of *Cercospora* leaf blight on soybean stems. *Enprensa*.
- Marinelli, A., Mainardi, A., March, G., Oddino C. y García, J. 2011. Transmisión de *Cercosporakikuchii* (tizón de la hoja, mancha púrpura de la semilla) y su detección temprana en el cultivo. 5° congreso de la soja del Mercosur. Primer foro de la soja Asia-Mercosur.
- Matsumoto, T., and Tomoyasu, R. 1925. Studies on the purple speck of soybean seed. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 1: 1-14.
- McLean, K.S. & Roy, K.W. 2009. Purple seed stain of soybean caused by isolates of *Cercosporakikuchii* from weeds, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 10:2, 166-171, DOI: 10.1080/07060668809501749
- Mian M.A.R., Missaoui A.M., Walker D.R., Phillips D.V., and Boerma H.R, (2008). Frog-eye Leaf Spot of Soybean: a Review and Proposed Race Designations for Isolates of *Cercosporasojina* Hara. *CropSci* 48: 14-24.
- MinAgri (ministerio de agricultura, ganadería y pesca). 2018. Disponible en: <http://www.sii.gov.ar/apps/sii/estimaciones/estima2.php>. <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>
- Quinteros Benítez, J.A.; Apodaca Sánchez, M.A.; Loredó Vega, J.G. y Fierro Corrales, D. (2008) Manual de Prácticas Micológicas. Departamento de Parasitología Rama de Fitopatología. Universidad Autónoma de Sinaloa. Ahome. Sinaloa.
- Salvador, D. y Garrido, M. (1990) Características culturales y patogenicidad del hongo causante de la mancha en cadena del sorgo. *Fitopatol. Venez.* 3: 11-15.
- Satorre Emilio H; BenechArnold Roberto L; Slafer Gustavo A; de la Fuente Elba B; Miralles Daniel J; Otegui María E y Savin Roxana. 2011. Producción de Granos: Bases funcionales para su manejo. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

- Schoch C.L., Ciuffo S., Domrachev M., Hotton C.L., Kannan S., Khovanskaya R., Leipe D., McVeigh R., O'Neill K., Robertse B., Sharma S., Soussov V., Sullivan J.P., Sun L., Turner S., Karsch-Mizrachi I. 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). Jan 1;2020: baaa062. doi: 10.1093/database/baaa062. PMID: 32761142; PMCID: PMC7408187.
- Schuh, W. 1991. Influence and leaf wetness period on conidial germination in vitro and infection of *Cercosporakikuchii* on soybean. Phytopathology 81: 1315-1318.
- Schuh W. 1993. Influence of interrupted dew periods, relative humidity, and light on disease severity and latent infections caused by *Cercosporakikuchii* on soybean. Phytopathology 83:109-113.
- Sinclair, J.B. & Shurtleff, M.C. 1975. Compendium of soybean diseases. The American Phytopathological society, Inc., 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, Minnesota 55121.
- Singh, T. & Sinclair, J. B. 1986. Further studies on the colonisation of soybean seeds by *Cercosporakikuchii* and *Phomopsis* sp. Seed Science and Technology 14: 71-77. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19861316980>
- Vathakos, M. G. & Walters, H. J. 1979. Production of conidia by *Cercosporakikuchii* in culture. Phytopathology 69: 832-833.
- Velicheti, R.K. & Sinclair, J.B. 1994. Production of cercosporin and colonization of soybean seed coats by *Cercosporakikuchii*. Plant Dis. 78:342-346.
- Wrather, J. A.; Anderson, T. R.; Arsyad, D. M.; Tan, Y.; Ploper, L. D.; Porta-Puglia, A.; Ram, H. H. and Yorinori, J. T. 2001. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. Can.J. PlantPath, v. 23, pp. 115-121.
- Yeh, C. C., & Sinclair, J. B. 1980. Sporulation and variation in size of conidia and conidiophores among five isolates of *Cercosporakikuchii*. PlantDisease 64:373-374.

11. Anexo:

11.1. Análisis estadístico:

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en hoja:

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABCPEH	21	0,98	0,97	12,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	56298,55	6	9383,09	93,7	<0,0001
fecha	56298,55	6	9383,09	93,7	<0,0001
Error	1401,93	14	100,14		
Total	57700,48	20			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=17,52417							
Error: 100,1378 gl: 14							
fecha	Medias	n	E.E.				
6-sep	0	3	5,78	A			
13-sep	25,06	3	5,78		B		
19-sep	56,97	3	5,78			C	
27-sep	105,43	3	5,78				D
4-oct	111,7	3	5,78				D
11-oct	133,35	3	5,78				E
18-oct	146,1	3	5,78				E
Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0,05)							

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en tallo:

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABCPET	21	1	0,99	4,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28644,39	6	4774,06	511,77	<0,0001
fecha	28644,39	6	4774,06	511,77	<0,0001
Error	130,6	14	9,33		
Total	28774,99	20			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=5,34867							
Error: 9,3286 gl: 14							
fecha	Medias	n	E.E.				
6-sep	0	3	1,76	A			
13-sep	18,88	3	1,76		B		
19-sep	47,6	3	1,76			C	
4-oct	86,95	3	1,76				D
27-sep	89,2	3	1,76				D
11-oct	94,45	3	1,76				E
18-oct	96,95	3	1,76				E
Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0,05)							

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en pecíolo:

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABCPEP	21	0,96	0,95	21,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20094,36	6	3349,06	58,83	<0,0001
fecha	20094,36	6	3349,06	58,83	<0,0001
Error	796,93	14	56,92		
Total	20891,29	20			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=13,21247						
Error: 56,9234 gl: 14						
fecha	Medias	n	E.E.			
6-sep	0	3	4,36	A		
13-sep	1,11	3	4,36	A		
19-sep	6,67	3	4,36	A		
27-sep	34,93	3	4,36		B	
4-oct	57,79	3	4,36		C	
11-oct	70,28	3	4,36		C	D
18-oct	76,94	3	4,36			D

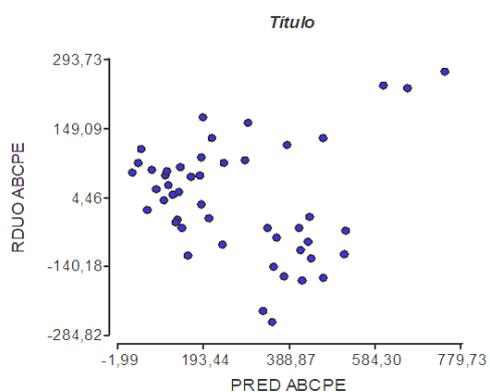
Medias con una letra común no son significativamente diferentes(p<= 0,05)

Confirmación del método en la nueva inoculación:

Shapiro-wilks modificado

Datos normales:

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D
RDUO ABCPE	48	0	119,56	0,97	0,7705



Área bajo la curva del progreso de la enfermedad en tallo:

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABCPE	48	0,68	0,54	51,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1425113,54	14	101793,82	5	0,0001
Variedad Diferencial	728264,83	11	66205,89	3,25	0,0042
Repeticion	696848,7	3	232282,9	11,41	<0,0001
Error	671806,08	33	20357,76		
Total	2096919,62	47			

Variedad Diferencial	Medias	ANOVA	
CNS	139,54	A	
Tracy	150,36	A	
Davis	160,15	A	
Richland	211,24	AB	
Lee	214,18	AB	
S100	216,61	AB	
Peking	239,37	AB	
Lincoln	263,62	AB	
Hood	313,58	AB	
Blackhawk	403,80	AB	
Kent	457,30	AB	
Palmeto	541,68	B	
DMS	354,23368		
Error: gl: 33	20357,76		
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)			
Test: Tukey Alfa=0,05			

11.2. Imágenes del ensayo:

Imagen 1: siembra del ensayo.



Imagen 2: Germinación en cámara de cultivo.



Imagen 3: macetas en invernadero



Imagen 4: preparación del medio de cultivo, jugo de vegetales V8.

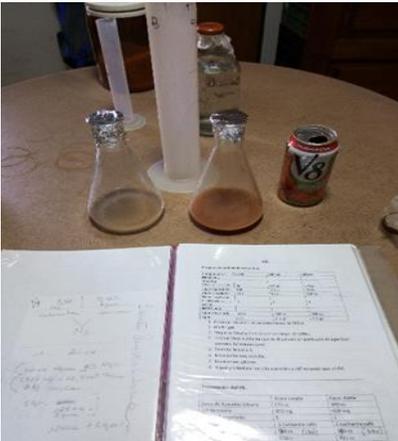


Imagen 5: replicación del inóculo.



Imagen 6: inóculo.



Imagen 7: Inoculación con aspersor manual en platas de soja.



Imagen 8 y 9: incubación en cámara de cultivo de las plantas de soja con su correspondiente tratamiento



Imagen 9:



Imagen 10: Plantas de soja en condiciones controladas de humedad y temperatura en el invernáculo



Imagen 11: Plantas de soja en invernáculo previo a la toma de datos.

