



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Agrarias
Maestría en Producción Vegetal



TESIS DE MAESTRIA

**Tizón foliar (*Alternaria* sp.) en crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*).
Caracterización diagnóstica y estrategia de control para la Provincia de
Corrientes.**

Tesista: Ing. Agr. Mónica Patricia GAUNA.

Directora: Ing. Agr. Dra. Susana A. Gutiérrez.

Co-directora: Ing. Agr. Dra. María G. Cabrera

Año 2019

Dedicatoria

A mis padres por enseñarme el valor de la perseverancia y el amor al estudio y al trabajo.

A mis hijos Alejandro, Constanza y Jazmín que son mis amores.

Agradecimientos:

A Dios por permitirme terminar este ciclo de mi vida.

A mi familia y amigos por su apoyo y compañía en el camino de realización de la maestría.

A las Doctoras María Graciela Cabrera y Susana A. Gutiérrez, por su gran dedicación, profesionalismo, constancia y aporte fundamental a la Dirección de esta tesis.

A la srta. Valeria Mambrim por su gran ayuda en la ilustración del trabajo y solidaridad hacia mi persona.

Al Dr. Gustavo A. Bich y equipo de trabajo del Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis), por su apoyo incondicional a este trabajo.

A los ingenieros Oscar Taffarel, y Walter Mathiew de la Empresa Gadiersa S.A. y a los señores César Fernández y Hugo Barolín, responsables del área de producción del Establecimiento "Las Margaritas", por la cordialidad e información brindadas.

A los ingenieros: Alfonso Lovato, Mario Sussini, Pamela Dirchwolf, Lisandro Bastida, Gabriela Ayala, Griselda Bóbeda, al profesor Sergio Galarza, Gabriel Pinto Ruiz, Sebastián Sáez y ayudantes de la Cátedra de Fitopatología (Eugenia Maluk y Felipe Zamudio).

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Índice general	IV-VI
Índice de Tablas	VII-VIII
Índice de Figuras	IX-XI
Abreviaturas	XII
Resumen	XIII
Abstract	XIV
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCION	1
1.1. El hospedante.	2
1.2. Centro de origen y distribución.	3
1.3. Condiciones agroecológicas del cultivo.	4
1.4. Enfermedades del crisantemo.	6
1.5. El patógeno: <i>Alternaria</i> spp.	7
Problema planteado	10
Hipótesis	11
Objetivos generales.	11
Objetivos específicos.	11
CAPÍTULO II	12
MATERIALES Y MÉTODOS	12
A.Trabajos de Campo.	12
B.Trabajos de Laboratorio.	13
B.1.Sintomatología.	13
B. 2.Etiología.	14
2.1. Aislamientos comunes.	14
2.2. Aislamientos monospóricos.	14
2.3. Estudios de características culturales y morfométricas.	14

2.4. Diagnóstico micológico.	15
2.5. Análisis de componentes principales.	15
2.6. Dendrograma.	15
3. Pruebas de Patogenicidad.	15
3.1. En plantas.	16
3.2. Método de hoja suelta.	16
4. Análisis molecular de las cepas.	17
5. Evaluación <i>in vitro</i> de la fungitoxicidad de fungicidas foliares.	17
CAPÍTULO III	19
RESULTADOS	19
A-Trabajos de Campo.	19
1. Monitoreos y recolección de muestras.	19
2. Sintomatología	19
3. Entrevista a productores.	20
4. Cuantificación de la enfermedad.	21
B- Trabajos de Laboratorio.	25
1. Sintomatología.	25
2. Etiología.	26
2.1. Aislamientos comunes.	26
2.2. Aislamientos monospóricos.	26
2.3. Estudios culturales, morfométricos y diagnóstico micológico.	26
2.4. Análisis de componentes principales de las Cepas Monospóricas.	34
2.5. Análisis de Conglomerados.	35
3. Pruebas de patogenicidad.	36
4. Análisis Molecular de las Cepas.	38
5. Prueba de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Alternaria</i> a distintos fungicidas.	38
Análisis estadístico.	38
5 a. Evaluación del Porcentaje de Inhibición (%) del fungicida	
Carbendazim correspondientes a la dosis 0, 10, 50 y 100 ppm.	38
Prueba post-ANOVA.	
5 b. Evaluación del Porcentaje de Inhibición (%) del fungicida	

Azoxistrobina correspondientes a la dosis 0, 10, 50 y 100 ppm.	39
5 c. Evaluación del Porcentaje de Inhibición (%) del fungicida	
Mancozeb correspondientes a la dosis 0, 10, 50 y 100 ppm.	40
6. Cálculo de CI50.	41
6.1. Escalas de sensibilidad en base a la CI50.	42
CAPÍTULO IV	43
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
CAPÍTULO V	49
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS.	56
1. Análisis estadísticos: Análisis de componentes principales y conglomerados.	56
2. Descripción morfológica de especies de <i>Alternaria</i> según diversos autores	58
3. Secuencias nucleotídicas en formato FASTA (INBIOMIS).	61

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Clasificación de crisantemos según el tipo de Inflorescencia.	2
Tabla 2	Sinopsis de la entrevista a productores	20
Tabla 3	Incidencia del tizón en Establecimiento Gadiersa S.A. en estado de floración. (Mayo del 2015)	21
Tabla 4	Incidencia de tizón en Establecimiento Gadiersa S.A., en estado de floración (septiembre del 2015).	22
Tabla 5	Incidencia de tizón en Establecimiento: "Las Margaritas" en estado de floración (Mayo del 2015)	22
Tabla 6	Incidencia en Establecimiento "Las Margaritas," en estado de floración. (Septiembre del 2015).	22
Tabla 7	Severidad del tizón por <i>Alternaria</i> cuantificada en el Establecimiento Gadiersa S.A. en estado de pimpollo. (Mayo del 2015).	23
Tabla 8	Estudio de Severidad GADIERSA S.A. en estado de floración (Septiembre de 2015).	23
Tabla 9	Severidad del tizón por <i>Alternaria</i> cuantificada en el Establecimiento Establecimiento Las Margaritas (Mayo de 2015).	23
Tabla 10	Severidad del tizón por <i>Alternaria</i> cuantificada en el Establecimiento Las Margaritas, en estado de pimpollo (Septiembre de 2015).	24
Tabla 11	Severidad del tizón por <i>Alternaria</i> cuantificada en el Establecimiento Las Margaritas, en estado de pimpollo (Septiembre de 2015).	24
Tabla 12	Análisis molecular y bioinformático de las Cepas 9 y 17.	38
Tabla 13	Prueba Post ANOVA tratamiento con Carbendazim.	39
Tabla 14	Prueba Post ANOVA tratamiento con Axizostrobin.	39
Tabla 15	Prueba Post Anova tratamiento con Mancozeb.	40
Tabla 16	Valores de los parámetros del modelo.	41
Tabla17	Valores de la CI ₅₀	41
Tabla 18	Escalas de sensibilidad en base a la CI ₅₀ , Edginton, <i>et al</i> (1971) (Benzimidazoles).	42
Tabla 19	Escala de Lim (1980).	42

Tabla 20	Matriz de riesgo de resistencia de Frac (2018).	47
----------	---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Pag
Figura 1. Tipos de flores. A	3
Figura 2. Tipos de flores. B	3
Figura 3. Fotografía de conidios y conidióforos de <i>Alternaria alternata</i> . (Ellis 1971).	8
Figura 4. Áreas de monitoreos y trabajos de campo en la Provincia de Corrientes.	12
Figura 5. Escala diagramática de severidad de enfermedad propuesta por Villanueva-Couoh <i>et al.</i> , (2005).	13
Figura 6. Inóculos sobre hojas.	16
Figura 7. Inoculaciones: A. Método de la hoja suelta; B. En plantas, en condiciones de cámara húmeda.	16
Figura 8. A. Reverso de una caja de Petri con las marcas realizadas para observaciones de crecimiento micelial, donde las letras a, b, c y d corresponden a los radios de medición siendo A el inóculo depositado en el centro de dicha caja; B, C, D, E y F, representan márgenes del avance micelial (a intervalos iguales de tiempo); B. Colonias de <i>Alternaria alternata</i> en crecimiento.	18
Figura 9. A. Monitoreo en Establecimiento Gadiersa S.A.; B. Establecimiento Las Margaritas.	19
Figura 10. Sintomatología. A. Síntomas de tizón foliar en hojas en plantinera; B. Monitoreo en plantinera; C. Síntomas de la enfermedad en plántulas en invernadero de producción, D. Tizón foliar en plantas adultas.	20
Figura 11. Observación y extracción de muestras para la cuantificación de la enfermedad en ambos establecimientos. A. Gadiersa S.A.; B. Las Margaritas.	21
Figura 12. A. Hojas de crisantemo con síntomas equivalentes a grado 2 de severidad (Las Margaritas); B. Hojas de crisantemo con síntomas equivalentes a grado 3 de severidad (Gadiersa.S.A), según escala de severidad de Villanueva-Couoh <i>et al.</i> , (2005).	25
Figura 13. Síntomas. A. Síntomas de tizón en flores; B. Lesiones necróticas en pétalos, sépalos y pedúnculos; C. Conidio de <i>Alternaria</i> sobre tejido de pétalo.	25
Figura 14. A. Aislamientos comunes; B. Selección de colonias y repiques a tubos de ensayo.	26

Figura 15. A. Conidios, conidióforos e hifas de <i>A. tenuissima</i> ; B. Conidios y conidióforos (Ellis, 1971).	27
Figura 16. Estructuras de <i>A. longipes</i> . A. y B. Fotografías de conidios y conidióforos presentes en hojas de crisantemo; C. Conidios y conidióforo Ellis & Holliday (1970).	28
Figura 17. Fotografías que muestran en forma consecutiva características de conidios y colonias de cepas 1- 6.	29
Figura 18. Fotografías que muestran las características de conidios y colonias correspondientes a las cepas 7 -12.	31
Figura 19. A y B. Conidios e hifas de <i>A. radicina</i> de este trabajo; C. Estructuras de esta especie según Ellis (1971).	32
Figura 20. A. Estructuras de <i>A. alternata</i> de la Cepa 17; B. Conidios, y conidióforos de <i>A. alternata</i> (Ellis, 1971).	33
Figura 21. Fotografías que muestran las características de conidios y colonias correspondientes a las cepas 13 -18.	33
Figura 22. A y B Fotografías de estructuras de <i>Teretispora leucanthemi</i> ; C. Conidios y conidióforos de <i>A. chrysanthemi</i> (Ellis, 1971).	34
Figura 23. Gráfico de biplots o de componentes principales.	34
Figura 24. Gráfico de Conglomerados o Dendrograma con los datos de este trabajo.	35
Figura 25. Pruebas de Patogenicidad: A. Síntomas del tizón en plantas inoculadas; B, C y D Síntomas de tizón en hojas sueltas (B y C, tratamiento con heridas; D. tratamiento sin heridas respectivamente).	36
Figura 26. Gel de agarosa al 1 % para corroborar la extracción de ADN= peso molecular	37
Figura 27. Gel de agarosa al 2% para visualización de los productos de PCR. PM: peso molecular.	37
Figura 28. Conidios e hifas de <i>Alternaria alternata</i> teñidos con azul de metileno (Cepa N° 9) fotografiados en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (Inbiomis).	37
Figura 29. Efecto de aplicación de Carbendazim sobre colonia de <i>Alternaria</i> .	39
Figura 30. Efecto de aplicación de Azoxistrobina sobre colonia de <i>Alternaria</i> .	40
Figura 31. Efecto de la aplicación de Mancozeb sobre la colonia de <i>Alternaria alternata</i> .	41

Figura 32. A y B. Avance de la enfermedad desde la base hacia el ápice.	43
Figura 33. A- D. Invernaderos en producción con presencia de malezas y plantas con síntomas de tizón foliar. A y C. Establecimiento Gadiersa S. A.; B y D. Establecimiento Las Margaritas.	45
Figura 34. A. Deformaciones de conidios y adelgazamiento de hifas; B. Pérdida de los tabiques; C. Deformación de la espora.	48

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AA	Agar agua
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la Varianza
APG	Agar Papa Glucosa
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
has	Hectáreas
ITS	Internal Transcribed Spacer
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEA	Nordeste Argentino
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PM	Peso Molecular
ppm	Partes por millón
sp	Especie
spp.	Especies
µm	Micras

RESUMEN

Tizón foliar (*Alternaria* sp.) en crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*). Caracterización diagnóstica y estrategia de control para la Provincia de Corrientes

El crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) es la segunda flor de corte más importante a nivel internacional y la primera a nivel nacional. En el país uno de los puntos de producción se halla en el departamento Concepción, Provincia de Corrientes, expandido actualmente a los departamentos Lavalle y San Miguel. Este trabajo enfoca la problemática fitosanitaria de los crisantemos, donde una de las micosis más relevantes es el "tizón", asociado a un complejo de hongos del género *Alternaria* Nees. A tal fin, se planteó realizar estudios para obtener conocimientos sobre las especies que intervienen en el complejo *Alternaria* que causan tizón en cultivos de crisantemo. Mediante monitoreos se extrajeron plantas u órganos con síntomas de la enfermedad, que se examinaron en laboratorio para realizar el diagnóstico mediante técnicas fitopatológicas. La identificación morfológica de los hongos aislados se realizó en base a características culturales y morfométricas de estructuras fúngicas, utilizando bibliografía especializada. Una de las especies, fue analizada por técnicas moleculares. Con estos datos se realizó análisis de componentes principales y de conglomerados, para ver similitudes y diferencias entre las cepas de *Alternaria* obtenidas. Se cuantificó la enfermedad considerando la incidencia, severidad e intensidad, en el estadio de floración de las plantas; la patogenicidad de los microorganismos aislados, se evaluó mediante inoculaciones en plantas y en hojas sueltas. Respecto al control del tizón foliar, se evaluó *in vitro* la sensibilidad de tres fungicidas foliares sobre el crecimiento micelial del complejo *Alternaria*, por medio del cálculo de la CI_{50} . La caracterización diagnóstica lograda por las técnicas tradicionales (sintomatología y etiología de la enfermedad) y el resultado de las pruebas de patogenicidad, permitieron concluir que el tizón foliar del crisantemo es causado por un complejo de especies del género *Alternaria* (*alternata*, *tenuissima*, *longipes* y *radicina*), diferenciación apoyada por el análisis de componentes y conglomerados. Respecto a la intensidad de la enfermedad, varió entre 10 y 23% en los establecimientos monitoreados. Los fungicidas evaluados resultaron ineficientes para el control del patógeno. Se propone cambios de manejo de la enfermedad que contemplen estos resultados a fin de mejorar la fitosanidad de los crisantemos.

Palabras clave: etiología, fungitoxicidad, Micosis

ABSTRACT**Leaf blight (*Alternaria* sp.) In chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*).
Diagnostic characterization and control strategy for the Province of Corrientes.**

Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) is the second most important cut flower at the international level and the first at the national level. In the country, one of the production points is in the Concepción department, Corrientes Province, currently expanded to the Lavalle and San Miguel departments. This work focuses on the phytosanitary problem of chrysanthemums, where one of the most relevant mycoses is "blight", associated with a complex of fungi of the genus *Alternaria* Nees. To this end, studies were carried out to obtain knowledge about the species that intervene in the *Alternaria* complex that cause blight in chrysanthemum crops. Through monitoring, plants or organs with symptoms of the disease were removed, which were examined in the laboratory to make the diagnosis using phytopathological techniques. The morphological identification of the isolated fungi was made based on cultural and morphometric characteristics of fungal structures, using specialized bibliography. One of the species was analyzed by molecular techniques. With these data, analysis of main components and clusters was performed, to see similarities and differences between the *Alternaria* strains obtained. The disease was quantified considering the incidence, severity and intensity, in the flowering stage of the plants. The pathogenicity of the isolated microorganisms was evaluated by inoculations in plants and in loose leaves. Regarding the control of leaf blight, the sensitivity of three foliar fungicides on the mycelial growth of the *Alternaria* complex was evaluated in vitro, by means of the calculation of the IC50. The diagnostic characterization achieved by traditional techniques (symptomatology and etiology of the disease) and the result of the pathogenicity tests, they concluded that the leaf blight of the chrysanthemum is caused by a complex of species of the *Alternaria* genus (*alternata*, *tenuissima*, *longipes* and *radicina*), differentiation supported by the analysis of components and conglomerates. Regarding the intensity of the disease, it varied between 10 and 23% in the monitored facilities. The fungicides evaluated were inefficient for pathogen control. It is proposed change of disease management that contemplate these results in order to improve the phytosanity of *chrysanthemums*.

Keywords: etiology, fungitoxicity, mycosis.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las plantas ornamentales y florales constituyen actualmente un elemento indispensable para adornar jardines, lugares públicos, hoteles, eventos de importancia social o política, así como en los hogares. En muchos países constituyen un renglón importante para la economía (Pérez Bocourt *et al.*, 2011). Al respecto, son numerosas las especies de la familia Asteraceae cultivadas como plantas ornamentales y para flor de corte, debido a que poseen flores vistosas, de mucho color. La producción de flores a nivel mundial es una de las actividades del agro más importantes, por lo que se ha convertido en un negocio de grandes proporciones. El avance de las comunicaciones y comercios aéreos han impulsado fuertemente esta actividad en los últimos años. Los grandes consumidores son los países más desarrollados: Estados Unidos, Japón, Alemania, Francia, Italia y Noruega. (<http://www.ecuadorexporta.org>). En este rubro, el crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Kitamura), es la segunda flor de corte más importante entre las tres principales que se cultivan anualmente a nivel internacional, después de la rosa (*Rosas* pp.) y el clavel (*Dianthus caryophyllus* L.). A nivel internacional, los mercados más atractivos son Estados Unidos y Europa, siendo el mercado europeo estacional, mientras que el mercado norteamericano es anual.

Se puede decir que la floricultura es uno de los rubros más dinámicos de la economía mundial, con una tasa de crecimiento de alrededor del 6% anual y un gran generador de puestos de trabajo. Sin embargo, pese a tener condiciones climáticas y fitosanitarias necesarias para participar de ese atractivo negocio, Argentina es todavía, una espectadora pasiva y distante; no obstante esto, la situación en nuestro país respecto a la producción y comercialización de flores y plantas en maceta ocupa un lugar relevante, ya sea por los beneficios económicos que genera, como por el elevado nivel de ocupación de mano de obra, que dicho rubro presenta directa e indirectamente, considerando la expansión de la actividad como una alternativa de desarrollo regional (INTEA, 2003). Con todo, la floricultura ha tenido un desarrollo menor que en otros países, en particular, en lo que se refiere a la búsqueda de la mejora continua de calidad. No obstante, la producción nacional se destina principalmente al mercado interno, el cual se abastece en mercados concentradores, que priorizan precio antes que calidad. Sólo el 20% de las flores que se comercializan es de alta calidad (Palau & Jatib, 2003).

En la Argentina, de acuerdo a la información manejada, el valor de la producción es de 200 millones de dólares, con más de 1.300 productores que cultivan una superficie total de 2.500 ha. El 50% de los productores se ubican en el interior del país y está en crecimiento. La producción argentina de flores de corte abarca aproximadamente 1.300 hectáreas concentradas, situadas en su mayor parte en el cinturón verde del Gran Buenos Aires, si bien existen otros centros de producción en el país que están creciendo año tras año, particularmente en las provincias de Corrientes, Santa Fe, Córdoba, Tucumán, Jujuy, Mendoza y en la zona de la Patagonia; al respecto, se destacan la provincia de Buenos Aires, la región de Cuyo, con Tucumán a la cabeza y el NEA, donde la provincia de Corrientes alcanzaría la primacía como productora. Actualmente, en la producción de plantas florales en el país la flor de corte más cultivada es el crisantemo, la cual lo producen el 60% de los productores de flores de corte; el segundo lugar es ocupado por el clavel, que es producida por el 46% de los productores y la tercera especie más producida es la rosa (32% de los productores (http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/16537/mod_resource/content/4/GUIA/FLORICULTURA/ARGENTINA/2013.pdf)).

Sin embargo, se debe considerar que la expansión de cualquier tipo de cultivo está relacionada con el desarrollo de tecnologías adecuadas, el logro de precios competitivos

y en especial, con la obtención de altos niveles de calidad y sanidad que permitan acceder a canales eficientes de comercialización (Morisigue *et al.*, 2012).

Puntualmente, desde la década del 80 a la fecha, en la provincia de Corrientes la producción de plantas ornamentales y para flor de corte, se concentra especialmente en el noroeste de la provincia. La superficie total dedicada al cultivo de flores, es de 1.667 has, favorecida por la ausencia o baja ocurrencia de heladas y mayor temperatura del otoño-invierno respecto a otras zonas, lo cual permite una producción con menores costos al no ser necesario el uso de calefacción, y a la relativa cercanía a los mayores centros de consumo. Ambos factores posicionan a esta provincia como la mejor para la producción de plantas ornamentales, así como la de flores para corte (Avila *et al.*, 2013; Morisigue *et al.*, 2012).

1.1. EL HOSPEDANTE

1.1.1. Caracteres botánicos del crisantemo

El crisantemo *Chrysanthemum morifolium* Ramat (sin. *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitam.), familia Asteraceae, es una planta ornamental y florícola de enorme diversidad de tipos, que espontáneamente han ido dando lugar a formas múltiples, pero a su vez han sido utilizadas por los mejoradores para obtener por cruzamientos, las nuevas variedades de valor comercial (Bornas & Urcullo, 1953). Etimológicamente el nombre *Chrysanthemum* proviene de dos palabras griegas: *khrysos* y *antheon* que significan "flor de oro". Originario de Asia, el crisantemo es considerado como una de las especies florícolas más comercializadas en el mundo. En países como Japón, EE.UU., Holanda y Alemania, su producción es similar a la de rosa y clavel, debido a la conservación y durabilidad de la flor y a la gran variabilidad de formas y colores (Horst & Nelson, 1997). En el crisantemo lo que se conoce como flor es realmente una inflorescencia, denominada capítulo; existen diversos tipos de capítulo cultivados comercialmente, aunque en general, la inflorescencia está formada por dos tipos de flores: femeninas radiales que se corresponden con la hilera exterior en las margaritas, y hermafroditas concéntricas, que se corresponden con las centrales. Según la forma de la inflorescencia, los crisantemos se clasifican en varios tipos o variedades culturales (Tabla Nº 1, Figs. 1 y 2) (Granitto, 2013).

Tabla Nº 1. Clasificación de crisantemos según el tipo de Inflorescencia.

Clasificación	Características
Sencillas	Tipo margarita. Compuestas de una o dos hileras de flores radiales y con flores hermafroditas centrales.
Anémonas	Similares a las sencillas, pero con flores concéntricas tubulares y alargadas. El color de las flores radiales y concéntricas puede ser el mismo o no.
Recurvadas	En forma globular, con las flores radiales recurvadas hacia adentro.
Reflejas	En forma redondeada con las flores radiales doblándose hacia afuera y hacia abajo.
Arañas, plumas, cucharas, hirsutas	Las flores radiales se incurvan y son tubulares excepto en el caso de la cuchara.
Pompones	En forma globular, constituidos por flores radiales cortas y uniformes. No presenta flores tubulares.
Decorativas	Similares a los pompones, se componen principalmente de flores radiales, aunque las hileras exteriores son más largas que las centrales, dándole a la inflorescencia una forma plana e irregular.



Figura 1. Tipos de flores: A. Sencillas; B. Anémonas; C. Recurvadas.



Figura 2. Tipos de flores. A. Reflejas; B. Arañas; C. Pompón.

El crisantemo que actualmente cultivan los floricultores en la región de este estudio, es un híbrido complejo y la mayoría de las especies de las que provienen los cultivares actuales, son originarias de China. Éstas son: *Chrysanthemum indicum*, *Chrysanthemum morifolium* y *Chrysanthemum x hortorum*. El crisantemo en maceta es denominado *Dendranthema* (<http://www.infoagro.com/flores/flores/crisantemo.htm>).

1.2. CENTRO DE ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

1.2.1 Centro de origen

Existen unas 150 especies naturales de *Chrysanthemum* originarias de Asia y África. Las especies que han dado origen a las actuales variedades cultivadas de crisantemos son: *C. indicum*, *C. morifolium* y *C. arcticum* (Arquero, 2000).

Desde hace más de 2000 años, en China, el crisantemo ya era cultivado y apreciado como ornamento; de allí pasó al Japón, donde se convirtió en una flor santa que recibía veneración divina, siendo su flor nacional.

El crisantemo fue introducido en Europa en 1688 por un mercader holandés, Jacob Breynius; luego, en 1764, ingresó a los Estados Unidos al Chelsea Physical Garden; pero recién hacia 1789 comenzó a extenderse como cultivo, primero en Francia y luego en Inglaterra. A partir de ese año el crisantemo ha sido mejorado dando origen a las variedades actuales (Granitto, 2013).

1.2.2 Distribución de la especie

La producción de crisantemos es importante en varios países europeos, así como en Colombia, Estados Unidos y Canadá, en los cuales es un cultivo industrializado. En Japón es muy requerido debido a que tiene un gran valor simbólico. Después de la rosa, el crisantemo sigue siendo la flor cortada más vendida; el de color blanco es el más demandado (40%), seguido en importancia por los amarillos (31%) y los violetas (11%) (Granito, 2013).

1.2.3 Lugares de cultivo en Argentina

En Argentina la producción de flores y especies ornamentales se centraliza principalmente en la provincia de Buenos Aires, siguiendo en importancia las provincias de Santa Fe, Corrientes, Formosa, Misiones, Tucumán, Córdoba, Mendoza, Jujuy y Entre Ríos. La mayor superficie cultivada particularmente para producción de flores de corte se realiza en condiciones de invernadero (INTEA, 2003, Ávila *et al.*, 2013). Pero la zona productora más importante corresponde al cinturón verde bonaerense en la zona sur de La Plata (Los Porteños, Abasto, Villa Elisa, A. Seguí, Las Banderitas, C. Urquiza y L. Olmos), con una superficie de más de 30 has (constituiría el 25- 30 % de la producción de flores). El 5% restante se produce en la zona norte (Escobar); otra zona productora de menor importancia es el Partido de General Pueyrredón (Mar de Plata, Batán, Laguna de los Padres) (Granitto, 2013).

En la provincia de Corrientes, el crisantemo concentra su zona productiva en el departamento Concepción, pero ésta se ha expandido a los departamentos de Lavalle y San Miguel.

1.3. CONDICIONES AGROECOLOGICAS DEL CULTIVO

1.3.1 Método de cultivo

En Corrientes, el cultivo del crisantemo se realiza bajo invernadero, en cultivos sucesivos desde marzo hasta fines de noviembre. Generalmente, los plantines se logran por multiplicación de esquejes terminales obtenidos de plantas madres seleccionadas. También se pueden emplear estaquillas obtenidas a partir de los brotes, que se desarrollan en la base de los esquejes, cuando alcanzan cierto tamaño. El trasplante a los invernaderos se realiza a partir de los veinte días, llegando el ciclo del cultivo a una duración de tres meses. Por lo tanto, durante el año el cultivo se repite tres veces en los mismos invernaderos, quedando estas estructuras ociosas de la actividad desde el mes de diciembre hasta principios de marzo (Taffarel, 2012).

Por otro lado, de acuerdo a los tipos de desbotonado que se realiza, se obtendrán dos tipos de floración. Cuando se eliminan todos los botones laterales se obtiene un tallo estándar con una sola flor terminal por tallo; al contrario, si se elimina el botón apical y se dejan desarrollar los laterales se obtendrán flores “spray” (Granitto, 2013).

1.3.2 Requerimientos nutricionales

Los suelos deben tener buen drenaje y estar enriquecidos con compostado o abonos antes de la siembra. Además, se deben regar al menos una vez por semana en suelos algo pesados y más frecuentemente en suelos franco-arenosos, durante el estadio de crecimiento. Los requerimientos de N, P y K son altos para el cultivo del crisantemo; de manera general se aplica la formulación 100-120-120 kg/ha. Las dosis deben ser aplicadas en todo el ciclo del cultivo, dosificando las aplicaciones para un mejor aprovechamiento del fertilizante; además la aplicación de fertilizante foliar, principalmente con micro-elementos debe ser aplicado para un mejor desarrollo de la planta (Linares, 2005). Se debe abonar de modo equilibrado, aproximadamente una vez por mes, o fertilizar durante todo el tiempo de crecimiento. Durante los dos primeros meses, es importante mantener niveles altos de nitrógeno en el suelo, pues las plantas crecen a ritmo muy rápido y los sistemas radiculares no están muy expandidos. Para obtener flores y plantas de calidad, se debe operar de este modo, ya que si durante este período se produce una deficiencia moderada de este nutriente, no se logrará recuperar la calidad de la flor que se haya perdido, incluso con aplicaciones posteriores de nitrógeno.

Sin embargo, la eficiencia de recuperación de N por parte de la planta aumenta con el tiempo, y durante los últimos 20 días solamente la inflorescencia crece rápidamente y los nutrientes minerales se transportan desde las hojas (Cotero, 2015).

En las condiciones del área de producción de Corrientes, no se han observado deficiencias notorias de micro-elementos, pero en caso necesario éstos se pueden aportar por vía foliar, con pulverizaciones cada dos semanas, de un formulado complejo (Taffarel, 2012).

1.3.3 Requerimientos ambientales de la especie

Si bien el cultivo en invernaderos genera un ambiente óptimo para el desarrollo de las plantas de crisantemo, generalmente con un alto gradiente de humedad (Culp & Thomas, 1964) y temperaturas casi siempre cálidas, son sin embargo, condiciones micro-ambientales en los que se presentan a menudo problemas fitosanitarios vinculados principalmente a enfermedades, cuyos agentes causales hallan también en ese ámbito las condiciones ideales para su desarrollo (Cumes Mantanico, 2008). Por lo tanto, para mantener la productividad y calidad en la producción es importante, además del manejo adecuado del cultivo, un eficiente tratamiento fitosanitario (García Filgueira & Di Stéfano, 2002). Así mismo, el cultivo de crisantemos requiere pleno sol y protección contra vientos fuertes si se realiza a campo.

Los cultivares de crisantemo se comportan de forma diferente y se adaptan a condiciones específicas de temperaturas y de duración del día. Según su respuesta particular a temperatura y fotoperíodo se clasifican en:

Crisantemos de floración temprana: Florecen en respuesta a temperaturas cálidas, mayores o iguales a 15° C, independientemente de la longitud del día (termo-positivos). La temperatura de 15° C es la media de las temperaturas diurna y nocturna, con temperaturas diurnas que no excedan los 25° C y nocturnas superiores a 10° C.

Crisantemos de todo el año: Responden al fotoperíodo, concretamente a días cortos, y en menor medida a las temperaturas. Manipulando la longitud del día, pueden obtenerse flores en cualquier época del año. Se subdividen en grupos de respuesta, de acuerdo con el número de semanas necesarias entre la iniciación de la yema floral y la floración real. La mayoría de las flores para corte se obtienen de los cultivares de 10 a 12 semanas.

Cultivares de termocero: Muestran poca inhibición floral entre los 10 y los 27° C. La floración se produce rápidamente a 15.5° C. Son los más adecuados para la floración de todo el año.

Cultivares termo-positivos: La floración se inhibe, cuando la temperatura es menor a los 15.5° C. Las yemas florales, se pueden iniciar pero no se desarrollan más allá de un estado de cabezuela a bajas temperaturas. Si se mantiene la temperatura apropiada, estos cultivares pueden utilizarse para floración durante todo el año.

Cultivares termo-negativos: La floración se inhibe cuando la temperatura es mayor a los 15° C. Temperaturas inferiores (10° C), pueden retardar la floración, pero no inhiben la iniciación. Deberán cultivarse solamente cuando las temperaturas nocturnas puedan ser controladas a 15.5° C ó ligeramente por debajo. En caso de no poder regular la temperatura, se deberá evitar el cultivo en los meses más calurosos del año (Granitto, 2013).

1.4. ENFERMEDADES DEL CRISANTEMO

Las plantas de crisantemo son muy susceptibles a diversas enfermedades, pero particularmente a varias micosis (Chase, 1997; Fernández Valiela, 1978; Horst & Nelson, 1997).

1.4.1 Enfermedades informadas en el extranjero

Debido a la importancia del cultivo de crisantemo se han estudiado desde hace tiempo las patologías que lo afectan, encontrando que dentro de los patógenos fúngicos con mayor incidencia sobre las plantas se encuentran especies de los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* y *Rhizoctonia*, además de algunos Peronosporomycetes (= Oomycetes) como *Pythium* y *Phytophthora* (Chase, 1997). Diversas enfermedades son frecuentes y características en los cultivos de crisantemo. Entre las enfermedades fúngicas más comunes se citan a la roya blanca causada por *Puccinia horiana* [Palmucci & Wright (1982); Gunta Smith *et al.*, (1992); Shimura & De Souza (1993); Rodríguez Navarro *et al.*, (1996); Horst & Nelson (1997); Agrios (2005)]; los marchitamientos provocados por *Fusarium* sp. [Agrios (2005), Bornas & Urcullu (1953); Jarvis (1992), Domínguez García- Tejero (1993); Gullino & Garibaldi (1994); Horst & Nelson (1997)]; y por causa de *Verticillium* sp. [Horsfall & Cowling (1978); Kranz *et al.*, (1982); Bigre *et al.*, (1990); Gullino & Garibaldi (1994); Horst & Nelson (1997); Agrios (1998)]; el tizón causado por *Alternaria* spp. (Agrios 1998); los oídios [Agrios (2005); Gullino & Garibaldi (1994)]; la rhizoctoniosis [Horst & Nelson (1997); Domínguez García- Tejero (1993); Bigre *et al.*, (1990)]; el moho gris por *Botrytis cinérea* [Agrios (2005, 1986); Bigre *et al.*, (1990)] y las manchas foliares por *Septoria* sp. [Bigre *et al.*, (1990); Jarvis (1992)].

También se citan diversas patologías provocadas por bacterias [Agrios (2005, 1986); Horst & Nelson (1997)]; y por virus [Horsfall & Cowling (1978); Horsfall & Dimond (1959)].

Entre las micosis, una de las más relevantes parece ser el tizón foliar y de flores asociado a un hongo del género *Alternaria* Nees (1816), anamorfo pleosporáceo (Arun Kumar, 2008). Según Kopacki *et al.*, (2018), Odenapur (2011), Arun-Kumar (2008) y Villanueva-Couoh *et al.*, (2005) el tizón foliar es considerado una de las enfermedades más destructivas del crisantemo, ocasionando significativas pérdidas económicas en los campos de producción y también en las condiciones de mercado. Como síntomas de esta patología, se observan lesiones necróticas extensivas en las hojas y en las flores se observa oscurecimiento y podredumbre de capítulos, por lo que se vuelve inviable su comercialización Freitas-Astúa (2005); Boote *et al.*, (1983).

Sin embargo, de acuerdo a los antecedentes bibliográficos el tizón foliar del crisantemo es causado por diferentes especies del género *Alternaria*, entre las cuales se destacan: *A. alternata* (Fr.) Keissler, *A. chrysanthemi* Simmons y Crosier, y *A. zinniae* M.B. Ellis, Ellis, (1971, 1976); Cabrera *et al.*, (2004); Villanueva-Couoh *et al.*, (2005); Odenapur, (2011).

No obstante, Woudenberg *et al.*, (2013), informaron que estudios moleculares revelaron la existencia de múltiples géneros no monofiléticos dentro del complejo *Alternaria*, además del clado-especie *Alternaria*, los cuales no siempre se correlacionaron a las especies-grupos basados sólo sobre características morfológicas. Esta información fue importante en la decisión de estudiar la patología en las condiciones de cultivo de la provincia de Corrientes.

1.4.2 Enfermedades del crisantemo informadas en Argentina

Siendo el crisantemo originario de regiones templadas, se la considera una planta absolutamente rústica, en climas análogos a los originarios. Sin embargo, se caracteriza por ser muy sensible ante cualquier descuido en su cultivo. Por tal razón, esta especie florícola es afectada por enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus, que se manifiestan en diferentes estadios fenológicos (Wolcan *et al.*, 2012; Cabrera *et al.*, 2004).

En el país entre las enfermedades se pueden mencionar como las de mayor importancia a la roya blanca (*Puccinia horiana*), Palmucci & Wright (1982), marchitamientos (*Fusarium* sp. y *Verticillium* sp.) Wolcan *et al.*, (1999), manchas y tizones foliares causados por *Alternaria* sp., y *Septoria* sp., oídio (*Oidium* sp.), rhizoctoniosis (*Rhizoctonia solani*) y moho gris (*Botrytis cinerea*), entre otras (Wolcan *et al.*, 2012; Cabrera *et al.* 2004; Fernández Valiela, 1978; Marchionatto, 1948).

Con respecto a las enfermedades que afectan al cultivo en la provincia de Corrientes, Cabrera *et al.*, (2004) identificaron varios géneros de hongos asociados a distintos órganos: (*Puccinia horiana*, *P. tanacetii*, *Alternaria chrysanthemi*, *A. alternata*, *Cercospora calendulae*, *Drechslera hawaiiensis*, *Septoria* sp., *Oidium* sp. y *Cladosporium* sp.) afectando las hojas; (*Cladosporium* y *Fusarium* spp.) en flores; y (*Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Fusarium* sp. y *Pythium* sp.) en tallos y raíces.

Además, como resultado del estudio de esta problemática, Cabrera *et al.*, (2004), cuantificaron a *A. chrysanthemi* y *A. alternata* causando tizón foliar con una severidad de hasta 50% en algunos invernaderos.

Por otro lado, según Taffarel (2012), en los últimos años, en el departamento Concepción (Provincia de Corrientes), se observaron síntomas de tizón en hojas y flores causados por *Alternaria* sp., que ocasionaron pérdidas de hasta el 60%, en cultivos de crisantemos en la localidad de Santa Rosa.

Esta situación ha generado preocupación también en otros productores de la zona, originando consultas periódicas de diagnóstico y solicitudes de posibles medidas de control.

1.5. EL PATOGENO: *Alternaria* spp.

El género *Alternaria* fue establecido en 1816 por Nees Von Esenbeck, describiendo a *Alternaria alternata* (originalmente *A. tenuis* Nees ex Pers.), como el aislamiento tipo (Lawrence *et al.*, 2013; Tomma, 2003). Este es un hongo perteneciente al grupo de los Hyphomycetes dematiáceos, cuyos conidios son pigmentados y septados de modo muriforme (Fig. 3), y se desarrollan sobre el ápice de conidióforos característicos (Simmons, 2007).

De acuerdo al Index Fungorum el Nombre Corriente es *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (Visita 20 de septiembre de 2018). El mismo sitio aporta una amplia sinonimia como sigue: *A. alternata* (Fr.) Keissler, (1912) var. *alternata*; *A. alternata* var. *rosicola* V.G. Rao, (1965); *A. fasciculata* (Cooke & Ellis) L. R. Jones & Grout, (1897); *A. rugosa* Mc Alpine, (1896); *A. tenuis* Nees, (1816) [1816-17]; *A. tenuis* f. *chalaroides* Sacc., (1903); *A. tenuis* f. *genuina* Unamuno, (1933); *A. tenuis* Nees, (1816) [1816-17] f. *tenuis*; *A. tenuis* f. *trichosanthis* D. Sacc., (1898), *A. tenuis* var. *mali* Marchal & É. J. Marchal, (1921); *A. tenuis* Nees, (1816) [1816-17] var. *tenuis*; *Macrosporium fasciculatum* Cooke & Ellis, (1877); *Torula alternata* Fr., (1832) [Synonymy Contributor(s): Kew Mycology (2015)].

Actualmente el hongo *Alternaria* se clasifica del modo siguiente:

Reino: Fungi
 Phylum: Ascomycota
 Subphylum: Pezizomycotina
 Clase: Dothideomycetes
 Sub-Clase: Pleosporomycetidae
 Orden: Pleosporales
 Familia: Pleosporaceae
 Género: *Alternaria*
 (Fuente: MycoBank 2015, Indexfungorum 2015).

Otras fuentes modernas consultadas clasifican al género *Alternaria* como un gran complejo de especies, por ejemplo, de acuerdo a Woudenberg *et al.*, (2013), el género *Alternaria* se clasifica en 24 secciones, y Lawrence *et al.*, (2013) en 8 secciones.

Como característica general, los aislamientos del género *Alternaria* pueden desarrollar colonias de color negro o gris, o a veces, negro verdoso. Los conidios se forman generalmente en cadenas, cortas o largas, a veces ramificadas. Su forma puede variar de obclavados, obpiriformes, ovoides o elipsoides, con más de ocho tabiques transversales generalmente, y con uno a varios tabiques longitudinales u oblicuos (Fig. 3), midiendo en promedio de 20-63 μm de longitud x 9-18 μm de diámetro, en su parte más ancha.

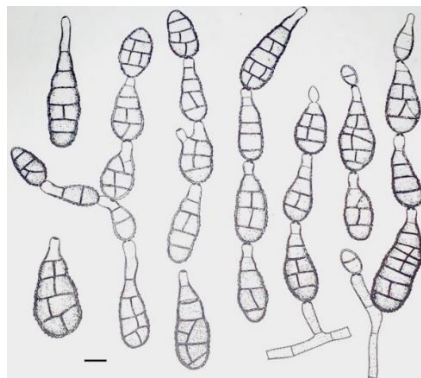


Figura 3. Fotografía de conidios y conidióforos de *Alternaria alternata* (Ellis 1971). Escala = 10 μm

Una revisión detallada de la posición y taxonomía histórica del género *Alternaria* desde que fue primeramente establecido por Nees en 1816, ha sido publicada por Neergaard (1945), y luego por Tweedy & Powell (1963). Sin embargo, aún sigue necesitando alguna revisión.

Rao (1964), hizo una primera enumeración y caracterización sobre el género *Alternaria* en la India. Allí este hongo posee gran importancia económica y promueve el desarrollo de manchas foliares y tizones en plantas, siendo de comportamiento foliícola, así como ubicuo, que a menudo asume un rol destructivo y de amplia dispersión. Curiosamente el hongo de este género no había recibido hasta entonces, una atención adecuada e intensiva en la India, en lo que respecta a su taxonomía hasta dicho trabajo. El género *Alternaria* es "un grupo de hongos diversos y ubicuos". Algunas especies son saprobias que viven comúnmente en el suelo o sobre tejidos muertos de plantas enfermas. Sin embargo, la mayoría de sus especies son patógenos de plantas, que colectivamente causan un rango de enfermedades económicamente importantes, sobre una gran variedad de cultivos en el mundo entero (Rotem 1998). Más tarde, Gherbawy (2005), informó a través de los resultados de su estudio, empleando técnicas moleculares, que existe una variabilidad considerable entre los aislamientos de *Alternaria*. La similitud

genética entre los aislados del grupo de la especie de *A. alternata* varió de 14.8 a 100%, mientras que el rango fue de 14.81 a 96.30% entre las otras especies de *Alternaria* utilizadas en este estudio. Los resultados indicaron una variabilidad genética considerable entre los aislados de *Alternaria*, incluso dentro de una misma especie. El género de grupo externo filogenéticamente *Stemphylium* no pudo separarse claramente utilizando los criterios de bandas RAPD. Asimismo, Guo et al., (2004) llegaron a resultados semejantes, en otro trabajo con empleo de técnicas de biología molecular, utilizando dos cebadores RAMS (CCA y CGA) 1273, para determinar a *A. alternata*. Estos autores destacaron que el hongo *A. alternata* parece tener el potencial de evolucionar relativamente rápido y mantener variación genética significativa.

Las especies de este género son sumamente cosmopolitas y pueden sobrevivir como saprófitas tanto como parásitos débiles en el interior de planta. El género *Alternaria* se caracteriza por la formación de conidios polimórficos ya sean individuales o en cadenas cortas o largas, las cuales pueden ser transportadas por el viento o agua y permanecer en latencia en el suelo (Pattanamahakul, 1999). El cuerpo de los conidios puede estrecharse gradualmente hasta alcanzar la forma de un pico cónico (Woudenberg et al., 2013).

1.5.1 Historia de la enfermedad del Tizón foliar.

Schmidt (1958) informó por primera vez sobre una mancha fúngica en *Chrysanthemum maximum* L. del Tirol austriaco, causada por *Alternaria chrysanthemi* Simmons y Crosier. A su vez en la India, Srinath & Sarwar (1965), informaron por primera vez la enfermedad en *C. cinerariifolium* (Trev.) var. *piretro*, causada por *Alternaria*. Por otro lado, Sobers (1965), en Norte América informó que en 1963 ocurrió una grave enfermedad en plantas de margaritas recibidas para su diagnóstico, desde un invernadero de Gainesville, en Florida. Numerosas lesiones en hojas y pecíolos fueron observados y algunas de las plantas con hojas más severamente afectadas morían como resultado de la infección. La enfermedad de estas plantas afectó más del 25% de aproximadamente 2000 tallos de crisantemos margaritas, cuyas hojas, pecíolos y tallos mostraron síntomas de enfermedad. Un hongo del género *Alternaria*, identificado como *A. chrysanthemi* fue consistentemente aislado desde las hojas y pecíolos enfermos.

Según Arun kumar (2008), durante 1987, en la India se observó una enfermedad severa de la hoja de *Chrysanthemum morifolium*, causado por una especie de *Alternaria*, en los campos así como en los huertos familiares, en partes del distrito de Dharwad, causando pérdidas económicas. Los síntomas de la enfermedad se observaron en las hojas y también en los tallos, desarrollando manchas castaño oscuras, rodeadas de halo amarillo en la superficie inferior y superior de las hojas, que más tarde condujeron a la destrucción de la hoja entera y finalmente a la defoliación.

Por otro lado, en Italia, Cavallini et al., (1992), informaron que *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* como causantes de enfermedades importantes de los crisantemos comerciales (*C. indicum*). Asimismo, Sen & Pathania (1997), seleccionaron sesenta cultivares de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzveler [sin. *C. morifolium* Ramat.]), para evaluar la resistencia a la mancha foliar causada por *Septoria chrysanthemella* y *Alternaria* sp., en experimentos de campo en la University Research Farm (UHF-Nauni, Himachal Pradesh, India) durante 1995 y 1996.; ninguno de los 60 cultivares estudiados estuvo libre de enfermedades.

También Ellis (1998), describió la enfermedad del tizón de la hoja del crisantemo causada por *A. chrisanthemi*, describiendo síntomas en tallos, hojas, flores y semillas de *C. maximum*. En las hojas, las manchas eran circulares, al principio de color gris pálido, luego color gris o castaño oscuro, a menudo con una mancha blanquecina en el centro rodeada de anillos concéntricos pálidos y oscuros. Las manchas se pueden

extender a lo largo de las nervaduras de las hojas. Después estas lesiones se cubren de un moho negro que corresponde a la esporulación del hongo. Estas lesiones pueden coalescer, cubriendo toda la hoja y producir su muerte. Los tallos florales pueden resultar atacados, sufrir un colapso y morir (Vázquez Guadamarra, 2016). Más tarde, Kopacki & Wagner (2003), en Polonia, evaluaron diez variedades de crisantemo de jardín, *Dendranthema grandiflora* [= *C. morifolium*], por su resistencia al invierno y agentes patógenos de planta. Inicialmente todos los cultivares mostraron buena resistencia; sin embargo, en el segundo año de investigaciones, los síntomas de la enfermedad aparecieron en las plantas probadas. Además de los síntomas típicos de la enfermedad, se observaron cambios en la forma y el tamaño de las plantas. Hubo diferencias significativas en el diámetro medio de la planta y la altura media de la planta entre años, mientras que el diámetro medio de la flor no difirió entre el año 2000 y 2001, pero difirió significativamente entre esos años y 2002. Además el tizón aumenta su agresividad, cuando la planta se aproxima a la floración (Populer, 1978).

También Shamala & Janardhana (2015) informaron que el tizón foliar del crisantemo es considerada una de las principales enfermedades destructivas del crisantemo, afectando el rendimiento en la región sur de Karnataka (India). En tanto en Polonia, Kopacki *et al.*, (2018), informaron que el tizón de la hoja causado por *Alternaria alternata* es una de las enfermedades más destructivas, prevaleciendo comúnmente en casi todos los cultivos de *Chrysanthemum* de ese país.

En relación al control del tizón del crisantemo, en los campos de producción, la utilización de fungicidas foliares es considerada una alternativa viable, según los trabajos realizados por Divyajyothi *et al.*, (2018); Arun Kumar *et al.*, (2011); Odenapur (2011); Arun Kumar (2008) y Villanueva-Couoh *et al.*, (2005), quienes evaluaron algunos productos químicos, tales como Azoxistrobina, Carbendazim, Hexaconazole 0,1 % Hexaconazole 4%+ Zineb 68%, Mancozeb, y Difenconazole. Asimismo, Arunkumar (2008) evaluó la sensibilidad *in vitro* de *A. alternata* frente a 9 formulaciones de fungicidas obteniendo control del patógeno utilizando Propiconazole y Hexaconazole al 0,1, 0,2 y al 0,3 % respectivamente, siendo éstos, netamente superiores a los otros tratamientos; en tanto Odenapur (2011) evaluó la sensibilidad *in vitro* con fungicidas de contacto (Hexaconazole 4% + Zineb 68% y Mancozeb al 75%) y sistémicos (Propiconazole y el Hexaconazole al 0,1 %), logrando los mejores resultados con estos 4 productos.

PROBLEMA PLANTEADO

De acuerdo a los antecedentes, el tizón foliar del crisantemo es causado por diferentes especies de *Alternaria*. Por este motivo, se planteó la realización de nuevas observaciones y estudios para la caracterización y obtención de conocimientos sobre cuál o cuáles son las especies que intervienen en el complejo *Alternaria*, asociados a plantas de crisantemos cultivados en la Provincia de Corrientes.

Asimismo, a fin de determinar la importancia de esta enfermedad para la región de producción, fue necesario evaluar la intensidad de la misma, con el objetivo de proponer estrategias de control del tizón foliar del crisantemo.

HIPÓTESIS:

1. El tizón foliar del crisantemo en la Provincia de Corrientes es causado por un complejo de especies del género *Alternaria*.

2. Los fungicidas foliares utilizados actualmente en cultivos de crisantemo en la provincia de Corrientes, resultan ineficientes para el control de *Alternaria* spp. causante del tizón foliar.

OBJETIVOS GENERALES

Obtener conocimientos sobre el patosistema crisantemo-*Alternaria* spp., caracterizando a las especies de hongo intervinientes y los posibles síntomas diferenciados de cada uno, necesarios para el diagnóstico de la enfermedad en condiciones de campo, y la implementación (*in vitro*) de medidas de control químico eficientes, en Corrientes.

Objetivos específicos

1. Caracterizar los síntomas y a los agentes etiológicos del tizón foliar que afecta a los cultivos de crisantemo de la Provincia de Corrientes.
2. Cuantificar la incidencia, severidad e intensidad de la enfermedad.
3. Evaluar *in vitro* la sensibilidad de *Alternaria* spp. a tres fungicidas foliares por medio del cálculo de la CI_{50} .

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

A- Trabajos de campo

1- Obtención de materiales

Se realizaron monitoreos y extracción de plantas u órganos con síntomas de tizón (foliar y de flores), en cultivos sitios en la localidad de Santa Rosa, Departamento Concepción (Latitud sur, 28° 26 y longitud oeste 58°11), Provincia de Corrientes, Argentina. El estudio de campo se realizó en los Establecimientos Gadiersa S.A. y Las Margaritas, ubicados en la localidad de Santa Rosa. Las muestras enfermas procedieron de cultivos de crisantemo para flor de corte, implantados en dichas empresas. Además, se obtuvieron muestras enfermas de jardines particulares, viveros, paseos y de florerías comerciales, del departamento Capital (Fig.4).



Figura 4. Áreas de monitoreos y trabajos de campo en la Provincia de Corrientes.

Se trabajó con plantas de crisantemo de la variedad tipo Margarita Spray, de la serie Reagan, origen brasileño, cultivadas bajo cobertura plástica.

2- Detección de enfermedades fúngicas en cultivos de crisantemo

Mediante los monitoreos periódicos en cultivos de crisantemo en estado vegetativo y reproductivo, se observó la presencia de síntomas de micosis en diferentes órganos de las plantas.

La extracción de plantas y/ o órganos con síntomas para estudio de laboratorio se llevó a cabo en plantineras y cultivos implantados en invernaderos, a fin de ser analizados mediante técnicas comunes de fitopatología (French & Hebert, 1980; Commonwealth Mycological Institute, 1986).

3- Entrevista a los productores

Durante la visita a los establecimientos señalados, se realizó una encuesta a los dos productores de crisantemo de mayor relevancia de la región.

4- Cuantificación de la enfermedad

- a) **Muestreo en invernáculos en producción:** En cada invernadero se seleccionaron 10 canteros en forma completamente al azar; cada cantero estuvo constituido por dos líneas de plantas, para lo cual se eligió un línea al azar por cada cantero y se realizó el conteo total de plantas por línea. Posteriormente, se efectuó el conteo de plantas con síntomas en los distintos órganos y por último extracción de órganos con síntomas (flores, hojas y tallos) para su evaluación en laboratorio y confección de herbario.
- b) **Medida de la enfermedad.** Se realizó mediante la determinación de los parámetros epidemiológicos incidencia (I): porcentaje de individuos o de órganos con síntomas, y severidad (S): porcentaje de tejido afectado por planta), aplicando las fórmulas de March *et al*, (2010).

$I = (\text{número de plantas infectadas} / \text{número total de plantas evaluadas}) * 100.$

$S = (\text{total de área infectadas} / \text{número total de órganos evaluados}) * 100.$

Para la determinación de la severidad de la enfermedad, se utilizó la escala propuesta por Villanueva-Couoh *et al.*, (2005) (Fig. 5).

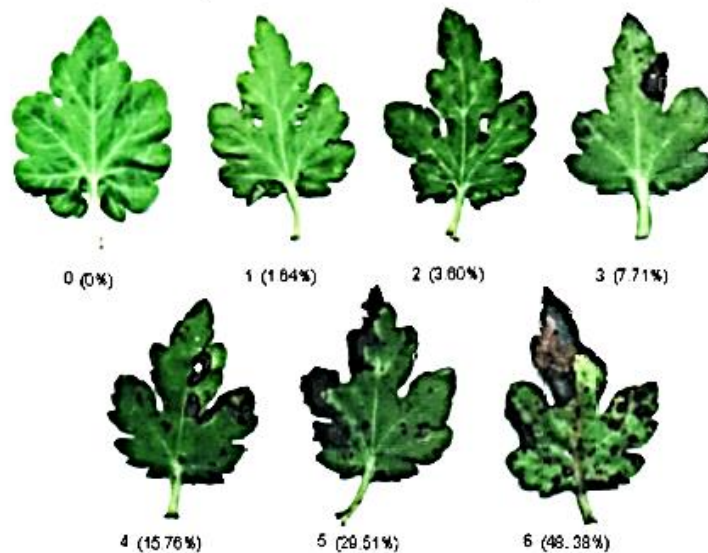


Figura 5. Escala diagramática de severidad del tizón propuesta por Villanueva-Couoh *et al.*, (2005).

Utilizando los valores de incidencia (I) y severidad (S), se obtuvo el índice de Intensidad de la enfermedad (I e), en cada establecimiento aplicando la fórmula: $(I e) = (I) + (S).$

B- Trabajos de Laboratorio.

1-Sintomatología

Se realizaron observaciones macro y microscópicas de muestras enfermas, con descripción de síntomas y signos de la enfermedad, complementando con la confección de cámaras húmedas (de hojas, tallos y flores), a fin de favorecer el desarrollo del signo de la enfermedad (French & Hebert, 1980; Commonwealth Mycological Institute, 1986).

2- Etiología

2.1- Aislamientos comunes. Partiendo de muestras enfermas de crisantemo con síntomas de tizón (foliar y de flores), se realizaron siembras en medio de cultivo APG 1,5%, pH 6, partiendo de trozos de tejido vegetal (de hojas, tallos y flores dañados), con previa desinfección con hipoclorito de sodio al 1,5%. Luego este material se enjuagó con agua destilada estéril, hasta quedar libre de cloro. A continuación los pequeños cortes se colocaron sobre papel de filtro para eliminar el exceso de agua. Estos cortes se realizaron bajo campana de flujo laminar para la siembra, colocando de 4 a 5 cortes por caja de Petri conteniendo APG al 2% y pH 7, (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). El material se incubó en estufa a 25° C, para el desarrollo de colonias del hongo en estudio.

Posteriormente se realizaron aislamientos comunes a partir de las colonias desarrolladas en esas placas de agar, y se repicaron como sub-cultivos en tubos de ensayo con medio APG inclinado en pico de flauta.

Cuando desarrollaron los hongos, se seleccionaron varias cepas, verificándose bajo microscopio que todas tuvieran características del género *Alternaria*.

Las colonias se observaron primero con microscopio estereoscópico y se describieron sus características. Luego, tomando parte del micelio se hicieron preparados microscópicos de los que se estudiaron conidios, hifas y conidióforos de las distintas colonias. El líquido de montaje empleado fue agua esterilizada.

2.2- Aislamientos monospóricos

Posteriormente se obtuvieron cepas monospóricas desde los aislamientos comunes previos, mediante el uso del método semi-mecánico que consistió en preparar una suspensión de conidios, empleando agua esterilizada. A tal efecto previamente se desinfectaron con alcohol 70% cajas de Petri, y el microscopio óptico. Se recolectaron conidios de colonias de *Alternaria* (crecidas en APG) de las diferentes cepas, con ayuda de un asa humedecida y agitarla en agua estéril colocada en un Erlenmeyer, con una gota de Twen al 80 %, para que las esporas se separen. Dicha suspensión, fue sembrada en estrías, barriendo suavemente la superficie de cajas de Petri, conteniendo una capa delgada de medio de cultivo agar-agua (AA) e incubado a 24 °C. Alrededor de 5 a 10 horas posteriores, y con ayuda del microscopio óptico, usando sólo el objetivo 10 x, se localizaron aquellos conidios germinados y que se encontraran separados entre sí, para lo cual se concentró en ese lugar un haz de luz del microscopio, a fin de proceder a su extracción. Para ello y mediante un sacabocados, se cortaron bloquitos de medio agar que contenía al conidio, verificando luego que no hubo contacto con ninguna espора cercana, asegurando así el crecimiento monospórico. Dicho bloque de agar con el conidio germinado, fue transferido con una aguja estéril a cajas de Petri con medio de APG. Este procedimiento se repitió varias veces para cada colonia procedente de un cultivo común (CMI, 1986).

2.3-Estudio de características culturales y morfométricas

Los aislamientos monospóricos fueron repicados en cajas de Petri con APG para determinar las características culturales de las colonias fúngicas y el modo de crecimiento en condiciones controladas de luz y temperatura.

Esta actividad se complementó con los estudios de morfometría de los conidióforos y conidios de cada una de las cepas monospóricas obtenidas a las que se asignó un número de referencia. Se examinaron largo y ancho de los conidios, longitud de picos, número de tabiques transversales, longitudinales y oblicuos, longitud, diámetro y

número de tabiques de los conidióforos, empleando para ello microscopios ópticos (CETI – ENOSA) con aumento 400x. Además, se obtuvieron microfotografías de estas estructuras con un microscopio óptico Leica DM 500, con cámara incluida Leica ICC 50, adaptado a un software LAS EZ del Servicio a terceros de la Sala de Microscopía D 2 de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE.

2.4-Diagnóstico micológico

La identificación morfológica de los hongos aislados se realizó en base a las características culturales y a las descripciones morfométricas de las estructuras vegetativas y reproductivas, utilizando bibliografía correspondiente Kate *et al.*, (2017); Woudenberg *et al.*, (2013); Odenapur, (2011); Cório, Da Luz (2011); Cório Da Luz (2010); Cório Da Luz & Inácio (2009); Arun Kumar (2008); Villanueva Couoh *et al.*, (2005); Rotem, (1998); Horst, & Nelson, (1997); Hanlin, (1992); Simmons (1981); Sutton, (1980); Ellis,(1976,1971); Milholland,(1973); Barnett & Hunter,(1972); Sobers, (1965) Ver Anexos (Descripción morfológica).

2.5- Análisis de componentes principales

Con los datos obtenidos en los estudios de morfometría de los conidios de cada una de las cepas monospóricas (largo y ancho de los conidios, longitud de picos y número de tabiques transversales, longitudinales y oblicuos) se realizó un análisis de componentes principales (ACP). A tal fin, se construyeron ejes artificiales (componentes principales, CP1 y CP2) que permitieron obtener gráficos de dispersión de observaciones y/o variables con propiedades óptimas para la interpretación de la variabilidad y covariabilidad subyacentes. El gráfico de biplots muestra las observaciones y las variables en el mismo gráfico, de manera de poder realizar interpretaciones sobre las relaciones conjuntas entre observaciones y variables (ver Anexo). Se utilizó para este análisis, el Software InfoStat (2017).

2.6 - Dendrograma

Se realizó el análisis de conglomerados con el objetivo de ver similitudes y diferencias entre las 18 cepas monospóricas, considerando algunas de las mediciones de la morfometría obtenidas (largo total, ancho, número de tabiques transversales, longitudinales y oblicuos). La distancia utilizada fue la de Gower, dado que se evaluaron variables cuantitativas continuas y discretas, con el método promedio (average linkage).

3- Pruebas de patogenicidad

Con la finalidad de cumplir los Postulados de Koch se realizaron estudios de patogenicidad de las cepas monospóricas de *Alternaria*, utilizando dos métodos:

3.1- Inoculaciones en plantas de crisantemo (de 30 días de edad), criadas en macetas en condiciones de invernáculo. Los tratamientos empleados consistieron en la aplicación directa de discos de agar con inóculo sobre hojas de dichas plantas, cubiertos con apósitos de algodón embebidos en agua estéril en las plantas testigo, se depositó discos de agar estéril sobre las hojas. Las plantas inoculadas fueron mantenidas en condiciones de cámara húmeda (mini invernadero de plástico) durante 72 hs (CMI, 1986). Fig 6.



Figura 6. Inóculos sobre hojas.

3.2- Método de hoja suelta. Para su ejecución se separaron hojas de plantas de crisantemo de 30 días de edad, las cuales fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% y lavadas 3 veces con agua estéril; luego fueron depositadas en bandejas plásticas esterilizadas, sobre 3 capas de papel absorbente, humedecido con agua estéril. En el centro de cada hoja, se colocaron discos de inóculo del patógeno obtenidos de colonias desarrolladas *in vitro*, los cuales se cubrieron con una fina capa de algodón húmedo (Fig.7) Bañuelos-Balandrán & Mayek-Pérez, (2007). Para cada cepa fúngica a testear, se utilizaron dos tratamientos (sin heridas y con heridas). Asimismo, se llevaron los testigos correspondientes, colocando discos de agar sin inóculo sobre las hojas preparadas para tal fin.

La unidad experimental fue cada hoja utilizada en los tratamientos; las bandejas se incubaron durante ocho días en condiciones de laboratorio, bajo campana de iluminación, a 25-28 °C de temperatura.



Figura 7. Inoculaciones: A. Método de la hoja suelta; B. En plantas, en condiciones de cámara húmeda.

4-Análisis molecular de las cepas

Del total de cepas obtenidas en este trabajo fueron seleccionadas dos monospóricas de *Alternaria* spp., al azar, ya que todas presentaban características bastante similares (Cepa N° 9 y 17), a fin de realizar su identificación molecular.

Dichas cepas fueron enviadas al Instituto de Biología Molecular de Misiones (INBIOMIS).

5- Evaluación *in vitro* de la fungitoxicidad de fungicidas foliares en el crecimiento micelial del agente causal

La fungitoxicidad se estudió en condiciones de laboratorio, mediante la exposición del patógeno a los fungicidas en estudio, a fin de medir su respuesta a diferentes concentraciones del principio activo (p.a.). La concentración que inhibe en un 50 % el crecimiento micelial y/o la germinación de esporas, se denomina Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀). Un valor bajo de CI₅₀ indica una alta acción fungicida (Edgington *et al.*, 1971).

Metodología de trabajo: se utilizó una cepa de *A. alternata* con patogenicidad probada y los siguientes fungicidas Carbendazim 50%, Azoxistrobina 25% y Mancozeb 80%. INTA (2012). Con cada uno de los fungicidas se preparó una solución patrón según la técnica propuesta por Edgington *et al.*, (1971), disolviendo 1 gramo del p.a. del fungicida en 5 ml de acetona (95%), y se llevó a volumen de 100 ml con agua destilada estéril, obteniéndose una solución patrón de 10.000 ppm. A partir de la solución patrón se realizaron diluciones en serie, tomando 1 ml de cada uno y colocando en tubos de ensayo que previamente contengan 9 ml de agua destilada estéril, obteniéndose concentraciones de 100, 50, 10 ppm respectivamente. Posteriormente se tomaron 1 ml de cada concentración del fungicida para depositar en cajas de Petri que contenían 9 ml de APG, logrando así concentraciones de 100, 50 y 10 ppm de principio activo de cada fungicida en el medio de cultivo.

Discos de micelio del patógeno, procedentes de colonias de 10 días de edad, se sembraron en el centro de cada una de las cajas de Petri con medio de cultivo envenenado con la concentración del principio activo usado. El tratamiento testigo consistió de cajas de Petri con medio de cultivo, pero sin fungicida.

Las cajas sembradas fueron incubadas en estufa a 25 °C +/- 2°C por 7 días, sobre la cual se midió el crecimiento micelial a fin de calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) Edgington *et al.*, (1971), aplicando la siguiente fórmula:

$$PIC (\%) = \frac{Cr \text{ Test (mm)} - Cr \text{ Trat (mm)}}{Cr \text{ Test (mm)}} \times 100$$

Cr Test: crecimiento micelial testigo

Cr Trat: crecimiento micelial tratamiento

A fin de determinar el ritmo de crecimiento de las colonias *in vitro*, se procedió a dibujar una cruz sobre el envés de cada caja de Petri, marcando el centro (A) y los cuatro radios con una letra con ayuda de un fibrón de tinta indeleble.

Considerando que el inóculo se depositó en el punto central de cada caja (A), su crecimiento radial fue medido dividiendo la base de la caja en 4 cuadrantes o secciones (norte, sur, este y oeste), imitando el modelo del autor, a partir del punto central de la caja. Se realizaron tres mediciones, a iguales intervalos de tiempo, culminando la misma cuando las cajas testigos completaron su crecimiento en toda la superficie (Fig. 8) (French & Hebert, 1980).

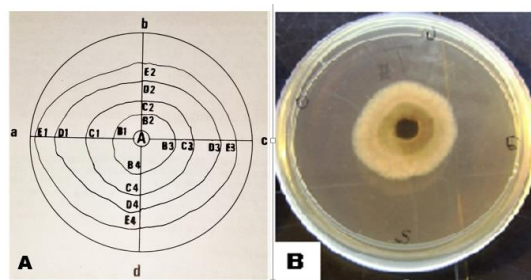


Figura 8. A. Reverso de una caja de Petri con las marcas realizadas para observaciones de crecimiento micelial, donde las letras a, b, c y d corresponden a los radios de medición, siendo A, el inóculo depositado en el centro de dicha caja; B, C, D,

y E, representan márgenes del avance micelial (a intervalos iguales de tiempo); B. Colonia de *Alternaria alternata* en crecimiento.

Tratamiento y diseño experimental

Unidad experimental: Una caja de Petri.

Variable dependiente: Porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno.

Variable independiente: Concentración del p.a. en el medio de cultivo.

El diseño experimental correspondió a un Diseño Completamente al Azar, con el objetivo de evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo *Alternaria* en los diferentes tratamientos, siendo su modelo el siguiente: $Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \xi_{ijk}$, donde Y_{ij} : es la respuesta del i -ésima, μ : es la media general, τ_i : es el efecto de la i -ésima tratamiento $i = 1, \dots, a$ y ξ_{ijk} : es el término del error aleatorio.

Los tratamientos correspondieron a 3 fungicidas y sus respectivas dosis (10; 50 y 100 ppm), y el tratamiento testigo, aplicando 10 repeticiones.

Se efectuó un análisis de regresión simple entre el crecimiento micelial del hongo en estudio y la concentración de los productos, a fin de calcular la dosis capaz de inhibir en un 50 % el crecimiento del patógeno y clasificar su sensibilidad según la escala propuesta por Edgington *et al.*, (1971), y Lim (1980); se aplicó análisis de la Varianza (ANOVA) y post ANOVA (Tukey).

Hipótesis a probar:

H_0 = las medias de todos los tratamientos de fungicidas son iguales.

H_a = al menos una media de tratamiento de fungicidas es diferente.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Software InfoStat (2017).

CAPÍTULO III

RESULTADOS

A.Trabajos de campo

1- Monitoreos y recolección de muestras: Para la ejecución de este trabajo se cumplieron ocho visitas de monitoreo de cultivos de crisantemo y extracción de muestras, en plantinera e invernaderos de producción, obteniendo 360 muestras para estudio (plantines y plantas adultas con síntomas de tizón foliar, en cultivos ubicados en

las localidades de Santa Rosa). Además, en la ciudad de Corrientes (Capital), se recolectaron otras 48 muestras (Figs. 9 A, B).



Figura 9. A. Monitoreo en Establecimiento Gadiersa S.A.; B. Establecimiento Las Margaritas.

2- Sintomatología.

En hojas: manchas anfégenas, de color castaño, con halo amarillento, en los lóbulos, las cuales aumentaron de tamaño, extendiéndose sobre la lámina, coalesciendo a veces y cubriendo toda la hoja, o bien, abarcando gran parte del limbo, alcanzando inclusive pecíolo y tallo (Fig. 10). También en otros casos, se observaron hojas enteras de color amarillento.

En flores: manchas castañas en sépalos y pétalos, y a medida que la enfermedad avanzaba, las lesiones descendían hacia el pedúnculo floral. El tamaño de la flor afectada fue menor.



Figura 10. Sintomatología. A. Síntomas de tizón foliar en hojas en plantinera; B. Monitoreo en plantinera; C. Síntomas de la enfermedad en plántulas en invernadero de producción; D. Tizón foliar en plantas adultas.

3- Entrevista a los productores

Tabla N° 2. Sinopsis de la entrevista a productores de crisantemo según establecimiento.

Cultivo	Gadiera S.A.	Las Margaritas
Manejo del cultivo	El cultivo se inicia en marzo y finaliza en noviembre. Riego por goteo, manejo del fotoperíodo, tutorado.	Mismo manejo.
Rotación	Cultivo continuo todo el año. Rotación anual.	Continuo, sin rotación.
Rendimientos	65/plantas/ m ² : 5-6 paquetes de flores/ m ² .Rendimiento/ ha: 50.000 paquetes de flores.	Idem. Rendimiento algo menor (45.000 paquetes de flores)
Fertilización	De base: fertilizante granulado de 100 g/ m ² de una fórmula 10-20-20. Pulverización foliar cada 2 semanas con formulado complejo.	Pulverización foliar cada 2 semanas con formulado complejo.
Control de enfermedades	Cada 10-15 días aplicación preventiva de Captan, Mancozeb y Carbendazim.	Mancozeb, Carbendazim, Estrobilurina. Miclobutanil;Azoxistrobina+ Difenconazole.
Manejo de residuos		Residuos de crisantemos usados como abono, sin proceso de compostaje.
Manejo de malezas	Solarización en verano y limpieza manual (insuficiente)	Idem

4- Cuantificación de la enfermedad

Se evaluó incidencia (I), severidad (S) e intensidad del tizón foliar en los cultivos de crisantemo en los invernaderos de producción de ambos establecimientos, en la localidad de Santa Rosa (Fig. 11).



Figura 11. Observación y extracción de muestras para la cuantificación de la enfermedad en ambos establecimientos. A. Gadiera S.A.; B. Las Margaritas.

A continuación se presentan los valores de ambos parámetros determinados en los establecimientos respectivos (Tablas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10).

Tabla N° 3. Incidencia del tizón foliar en el Establecimiento Gadiersa S.A. (floración). (Mayo del 2015).

Líneo	Plantas Enfermas	Plantas por líneo	Observaciones	
1	0	170		
2	0			
3	0			
4	4			
5	7			
6	14			
7	7			
8	10			
9	28*			*Líneos ubicados en el centro del invernadero
10	20*			

Plantas con síntomas 90

$$\text{Incidencia} = \frac{\sum \text{plantas enfermas} \times 100}{\text{Total de plantas}} = \frac{90 \times 100}{1700} = 5,29 \%$$

Tabla N° 4. Incidencia de tizón foliar en el Establecimiento Gadiersa S.A. (floración) (septiembre del 2015).

Líneo	Plantas Enfermas	Plantas por líneo	Observaciones
1	7	170	
2	15*		*Líneos ubicados en el área central del invernadero
3	12		
4	9		
5	9		
6	9		
7	9		
8	8		
9	13*		
10	6		

Plantas con síntomas 97, Incidencia: 5,70%

Tabla N° 5. Incidencia de tizón en Establecimiento: "Las Margaritas" en estado de floración (Mayo del 2015)

Líneo	Plantas Enfermas	Plantas por líneo	Observaciones
1	7	112	
2	13	113	
3	6	115	
4	12	113	
5	33*	115	
6	24*	115	*Líneos ubicados en el centro del invernadero
7	9	113	
8	20*	113	
9	7	112	
10	13	112	

Plantas con síntomas: 144, Total de plantas: 1.133, Incidencia: 12,70%

Tabla N° 6. Incidencia en el Establecimiento “Las Margaritas,” en estado de floración. (Septiembre del 2015).

Líneo	Plantas Enfermas	Plantas por líneo	Observaciones
1	41	112	
2	20	113	
3	12	115	
4	14	115	
5	10	115	
6	33*	112	*Líneos ubicado en el area central del invernadero
7	35*	115	
8	38*	112	
9	42	115	
10	25	115	

Plantas con síntomas: 270, Total de plantas: 1.142, Incidencia: 23,64%

Tabla N° 7. Severidad del tizón foliar, cuantificada en el Establecimiento Gadiersa S.A. en estado de pimpollo (Mayo del 2015).

Grado	Muestras
0	5
1	1
2	4
3	5
4	8
5	13
6	14

Total de plantas enfermas: 50

Severidad= $\frac{\text{total de áreas enfermas}}{\text{N}^\circ \text{ total de } \text{órganos}} \times 100$

$$S = \frac{1 \times 5 + 2 \times 1 + 3 \times 4 + 4 \times 5 + 5 \times 8 + 6 \times 13 + 7 \times 14}{50} = 5,1 \%$$

Tabla N° 8. Severidad del tizón foliar en Gadiersa S.A., en estado de floración (Septiembre de 2015).

Grado	Muestras
0	1
1	4
2	3
3	8
4	8
5	12
6	14

Total de plantas enfermas: 50, S: 5,6%

Tabla N° 9. Severidad del tizón foliar cuantificada en el Establecimiento Las Margaritas, en estado de floración (Mayo de 2015).

Grado	Muestras
0	4
1	3
2	5
3	6
4	8
5	11
6	13

Total de plantas enfermas: 50, S: 4,92%

Tabla N° 10. Severidad del tizón foliar en el Establecimiento Las Margaritas, en estado de pimpollo (Septiembre de 2015).

Grado	Muestras
0	3
1	3
2	2
3	3
4	11
5	7
6	23

Total de plantas enfermas: 52, S: 4,13%

Tabla N° 11. Severidad del tizón por *Alternaria* cuantificada en el Establecimiento Las Margaritas, en estado de floración completa (septiembre de 2015).

Grado	Muestras
0	2
1	0
2	1

3	6
4	0
5	11
6	16

Total de plantas enfermas: 36, S: 5,75%

En el Establecimiento Las Margaritas se hizo el relevamiento de plantas enfermas en crisantemos en estado de pimpollo y floración completa en septiembre porque en ese establecimiento fue notoria las diferencias de los estados fenológicos en que se encontraba la producción de crisantemos no así en el Establecimiento Gadiersa S.A. Se proponía además, con esta medición buscar algún contraste entre esos diferentes estados. (Susceptibilidad de la planta a la enfermedad, debido a la edad y/o estado fenológico) Populer (1978).

Las evaluaciones realizadas en ambos establecimientos permiten concluir que la incidencia de la enfermedad varió entre 4,93 y 5,35% en Las Margaritas y Gadiersa respectivamente. En tanto la severidad promedio de la enfermedad fue de 4,93 % en Las Margaritas y 5,35% en Gadiersa, correspondiendo a grados de severidad 2 y 3 según la escala Villanueva- Couoh *et al*, (2005).

La intensidad de la enfermedad fue de 10,85 % para Gadiersa, mientras en Las Margaritas, alcanzó valores de 23,1%.



Figura 12. A. Hojas de crisantemo con síntomas equivalentes a grado 2 de severidad (Las Margaritas); B. Hojas de crisantemo con síntomas equivalentes a grado 3 de severidad (Gadiersa.S.A), según escala de severidad de Villanueva-Couoh *et al*, (2005).

B.Trabajos de laboratorio.

1. Sintomatología.

En laboratorio se observaron en detalle los síntomas necróticos expansivos en hojas y flores. Se pudo observar que el tejido lesionado se deprimía adquiriendo coloración castaño claro, con márgenes cloróticos, con presencia de estructuras del agente causal (conidios) visibles bajo microscopio estereoscópico. (Fig.13 C). También los pétalos florales fueron afectados, destruyendo rápidamente el órgano foliar. Por otro lado, se

constató que el tizón tanto foliar como floral, se extiende a los sépalos, pedúnculos y tallos, desarrollando lesiones necróticas, profundas que terminan por destruir la planta completa (Fig.13 A; B).

Parte del material estudiado se herborizó, a fin de confeccionar un herbario de muestras enfermas, que se conserva en la cátedra de fitopatología, como comprobante del estudio.



Figura 13. Síntomas. A. Síntomas de tizón en flores; B. Lesiones necróticas en pétalos, sépalos y pedúnculos; C. Conidio de *Alternaria* sobre tejido de pétalo.

2. Etiología

2.1- Aislamientos comunes. En el estudio para identificación del agente asociado a los síntomas, se realizaron cultivos (siembras) comunes del hongo (Fig. 14 A) a partir de muestras enfermas entre las que se seleccionaron al aza las correspondientes al género *Alternaria*, las cuales fueron repicadas a tubos de ensayo con medio APG inclinado (Fig.14 B).

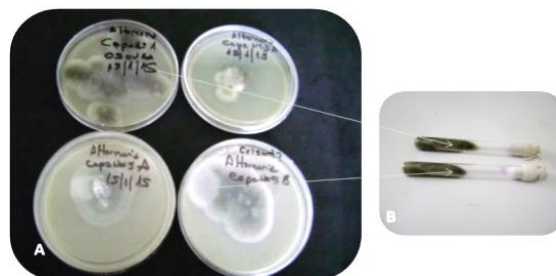


Figura 14. A. Aislamientos comunes; B. Selección de colonias y repiques a tubos de ensayo.

2.2- Aislamientos monospóricos: con las técnicas descritas se obtuvieron 18 cepas fúngicas. Además se trabajó en la identificación morfométrica de otras 5 cepas no monospóricas, con resultado tentativo.

2.3- Estudios de características culturales, morfométricas y diagnóstico micológico. Se realizaron descripciones de la morfología de cada estructura desarrollada en las colonias en medio de cultivo (APG y AA). Las características morfométricas de los conidios y conidióforos del hongo se determinaron a partir de

colonias de 8 días de edad y la identificación de las cepas se basó en la bibliografía especializada.

Cepa Monospórica N° 1. Los conidios son castaños, claviformes, con picos cortos, cónicos, con varios septos transversales y escasos tabiques longitudinales. Los conidios de mayor tamaño presentan entre 3-7 septos transversales y los más pequeños, 2-3 septos, de 30,67 x 8,02 μm de promedio, hialinos, con contenido plasmático granuloso. En observaciones al microscopio óptico se pueden visualizar formaciones en cadena de células conidiales. Los conidióforos son cilíndricos, solitarios, moderadamente sinuosos, de mediana longitud con un promedio de 66,4 μm . Algunos conidióforos son geniculados a levemente sinuosos, más densos en los ápices, que son redondeados y presentan una cicatriz hilar oscura. Otros conidióforos son bifurcados, y generalmente de uno de sus extremos se desprenden conidios en cadena (Fig. 17. A).

La colonia desarrollada en APG es de color gris, de crecimiento moderadamente elevado, aspecto veloso, con profuso y abundante micelio (Fig.17. D).

Las características morfométricas de esta cepa, se correspondieron con *Alternaria alternata*.

Cepa Monospórica N° 2. Los conidios son castaños, con pared espinulosa (Fig. 15 A); presentan forma ligeramente cilindroide, algunos con picos muy largos y tabicados, también de color castaño, y otros que parecen haber perdido el pico o rostro, cuyo cuerpo tiene forma elipsoide y presentan leves constricciones en los septos transversales.

Los conidios de esta cepa tienen escasos tabiques longitudinales y oblicuos.

El tamaño es muy variable, con un promedio de largo total de 28,9 μm de largo y 7,2 μm de ancho. Tienen forma ovoide, sin pico o rostro aparente.

Los conidióforos son cilíndricos, tabicados, moderadamente sinuosos, de color castaño oscuro, de 38,5 μm de largo en promedio (Fig.17 B).

La colonia es de color gris oscuro, de escaso crecimiento aéreo, con micelio denso, escasamente elevado. (Fig. 17 E).

Las características morfométricas de esta cepa, se correspondieron a *A. tenuissima*.

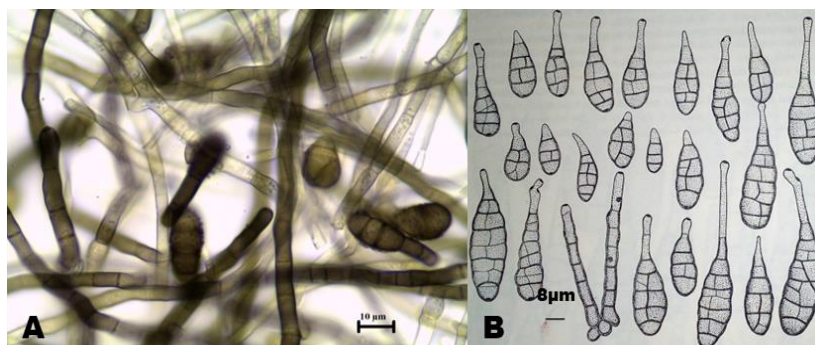


Figura 15. A. Conidios, conidióforos e hifas de *A. tenuissima*; B. Fotografías de conidios y conidióforos (Ellis, 1971).

Cepa Monospórica N° 3. Los conidios castaño medio dorados, ordenados en cadenas cortas, son claviformes, superficie suavemente espinulosa, con 3-5 tabiques transversales (constreñidos en los septos transversales) y escasos tabiques longitudinales y oblicuos. Presentan picos o rostros

cortos e hilos negros, de 21,7 μm de largo y 7,6 μm de ancho en promedio (Fig. 17 C). Hifas del micelio tabicadas, ligeramente coloreadas de gris a la madurez. Conidióforos cilíndricos, tabicados, cortos, de 54,8 μm de largo.

La colonia en APG es de color blanquecina, con escaso micelio aéreo algodonoso (Fig. 17 F). Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden a *A. alternata*.

Cepa Monospórica N° 4. Los conidios de coloración que oscila entre el amarillo-castaño al castaño medio, claviformes, ovoides o elipsoidales, con picos cortos, presentando marcada cicatriz negra en la base del pico o rostro. Se observa la presencia de 3 a 5 tabiques transversales en cada conidio y de 1 a 2 tabiques longitudinales y tabiques oblicuos y formación de cadenas cortas de 4 a 5 conidios. El promedio del largo total es de 21,2 μm y el ancho de 8,2 μm . Los conidióforos en general son rectos, de color castaño-dorado, con septos. El promedio del largo de los conidióforos es de 26,6 μm (Fig. 17 G).

La colonia es grisácea-blanquecina, con abundante micelio algodonoso, de crecimiento aéreo escaso a medio, con áreas concéntricas de crecimiento (Fig. 17 J). Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden a *A. alternata*.

Cepa Monospórica N° 5. Los conidios de coloración castaño dorado, presentan marcadas constricciones en los septos. Poseen 3 a 8 septos transversales, con escasos tabiques longitudinales u oblicuos. El pico o rostro es prolongado y ligeramente más claro que el cuerpo del conidio y se adelgaza hacia la base. El pico es tabicado, con 2 a 4 septos por conidio siendo el promedio igual a dos y una cicatriz hilar bien marcada. El promedio del largo total es de 39,2 μm con esporas que van desde 28 a 78,4 μm y el promedio del ancho es de 11 μm (Fig. 17 H). Los conidióforos son bastantes rectos aunque su aspecto general es flexuoso. Son tabicados, de coloración castaña, con presencia de cicatrices hilares marcadas de color oscuro, casi negro. En esos puntos el conidióforo presenta hinchazones leves. El promedio del largo de conidióforos es de 108,18 μm . Hifas tabicadas, bastante regulares en su calibre, muy ramificadas.

Colonia en medio APG, de color gris, con crecimiento micelial en anillos concéntricos de color más claro (Fig. 17 K). Estas características morfológicas de colonia y estructuras conidiales caracterizan a la cepa como *A. longipes* (Fig. 16).

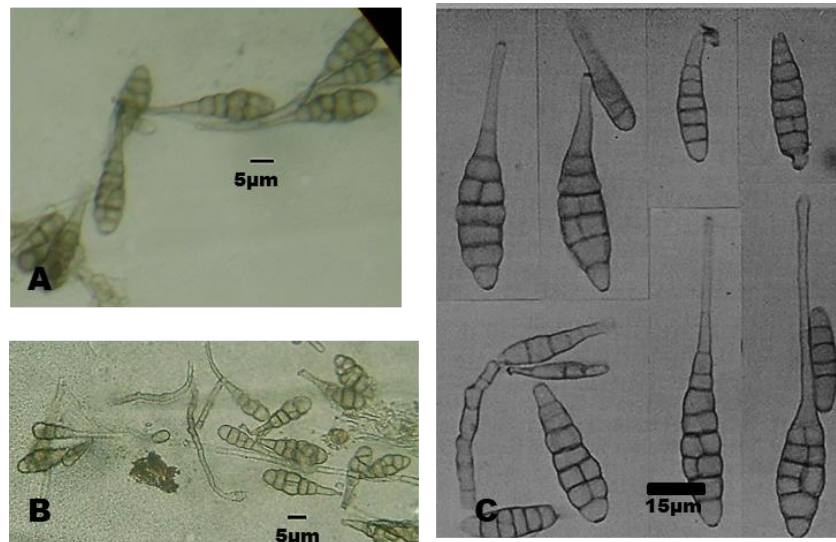


Figura 16. Estructuras de *A. longipes*. A. y B. Fotografías de conidios y conidióforos presentes en hojas de crisantemo; C. Fotografías de conidios y conidióforo (Ellis & Holliday, 1970).

Cepa Monospórica N° 6. Conidios castaños oliváceo claros, pequeños, formando cadenas medianas, con formas elipsoides o de clava, con 3 a 4 tabiques transversales,

y 1 a 2 tabiques longitudinales, de $18 \mu\text{m} \times 6 \mu\text{m}$. Algunos conidios no tienen pico o rostro y son muy constreñidos en los septos, uni, bi o tritabcados. Las hifas son de color castaño oliváceo claro y tabicadas. Los conidióforos son rectos o sinuosos, tabicados, de longitudes variables, (de $22,4$ a $72,8 \mu\text{m}$), de color castaño-oliváceo más oscuros que los conidios, de $47,8 \mu\text{m}$ de largo (Fig. 17 I).

La colonia es de color gris oliváceo, con poco desarrollo aéreo, pero con abundante micelio que tiñe el sustrato de oscuro (Fig. 17 L). Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden a *A. alternata* (Fig. 17).

Las características morfológicas y culturales de las Cepas N° 1-6 se ilustran en la Fig. 17.

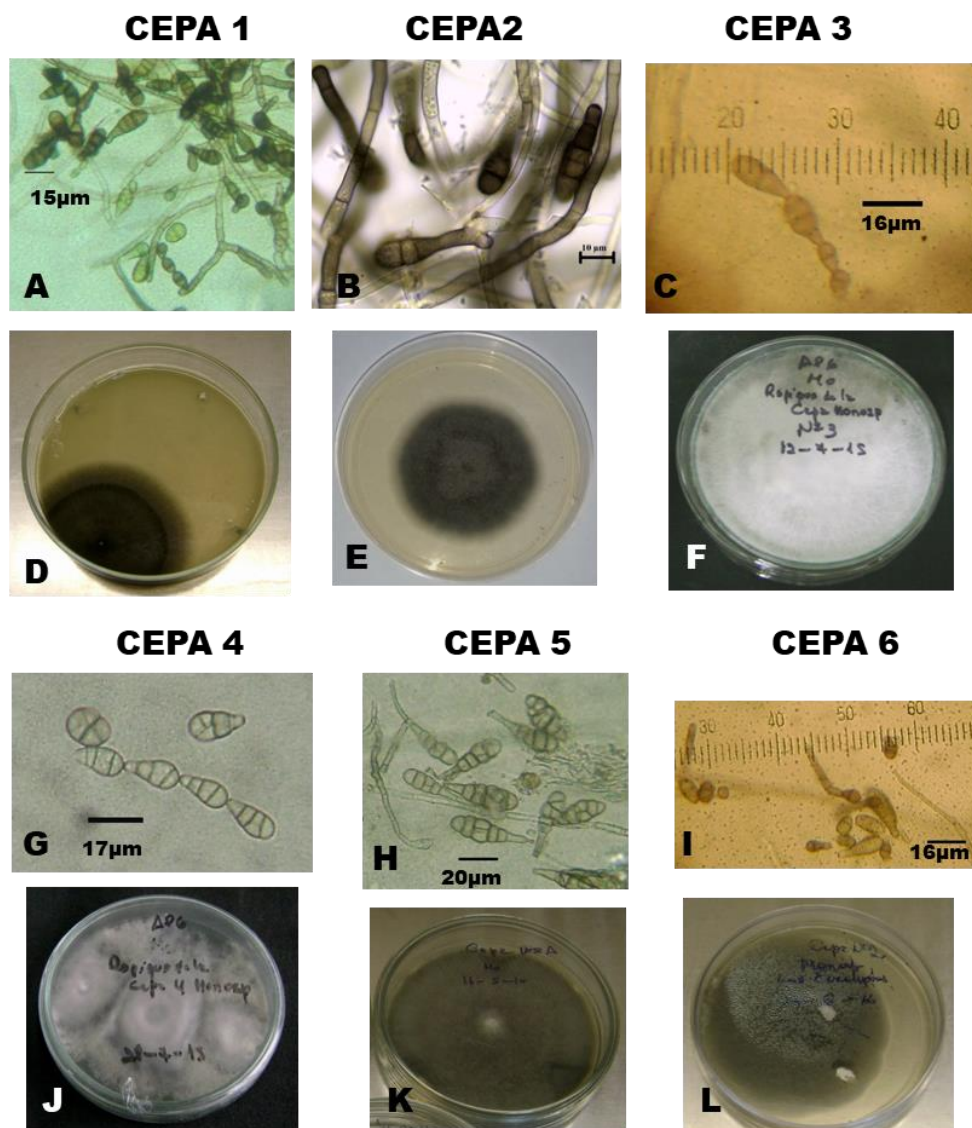


Figura 17. Fotografías que muestran en forma consecutiva características de conidios y colonias de cepas 1- 6.

Cepa Monospórica N° 7. Conidios castaños medio, en cadenas cortas, miden $26, 4 \mu\text{m}$ de largo y $7,5 \mu$ de ancho, obpiriformes, con tabiques transversales, longitudinales y oblicuos, con picos cortos, notorios en conidios jóvenes los cuales se presentan a veces inclinados hacia un costado. Son constreñidos en los septos. Los tabiques transversales son gruesos, bien marcados y más oscuros que el resto del conidio. Las hifas son de color castaño-oliváceo, tabicadas. Conidióforos sinuosos, con tabiques,

geniculados, con cicatrices hilares oscuras en los codos. El promedio del largo de conidióforos es de 53,4 μm (Fig. 18 A).

La colonia de color gris oscuro, espesa, de crecimiento micelial medio, tiñe el medio de negro (Fig. 18 D). Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden a *A. alternata*.

Cepa Monospórica N° 8. Conidios castaño amarillento, de paredes lisas, más o menos cilíndricos, con pocos tabiques longitudinales y oblicuos, con ligeras constricciones a nivel de los tabiques, con material citoplasmático granuloso, refringente. Pico o rostro generalmente unicelular, levemente ensanchado en la base, con cicatriz hilar marcada. El promedio del largo total del conidio es de 28, 2 μm y del ancho es de 8,4 μm . Las hifas son tabicadas, hialinas, citoplasma granuloso y refringente. Los conidióforos son tabicados, color castaño amarillento, más bien cortos, casi rectos, poco flexuosos. El promedio del largo de conidióforos es de 33 μm (Fig.18 B). La colonia es de color castaño grisáceo, de poco desarrollo aéreo, poco denso y no tiñe de negro el medio (Fig.18 E). Las características morfométricas de esta cepa corresponden a *A. alternata*.

Cepa Monospórica N° 9. Conidios castaño oscuros, elipsoidales, generalmente con pico corto, en algunos casos con hilo bien marcado. No se observan tabiques longitudinales y si escasos septos oblicuos. Conidios en cadenas cortas. Algunos conidios desarrollan pico más largo, con tabiques trasversales. El promedio del largo total de los conidios es 16,91 μm y el del ancho es 5,16 μm . Conidióforos más o menos rectos, algo sinuosos, con tabiques, de longitud variable. El promedio del largo de conidióforos es de 44,24 μm (Fig. 18 C).

La colonia es gris oscura, con crecimiento denso, con escaso micelio aéreo. Tiñe el sustrato de color negro (Fig. 18 F). Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden a *A. alternata*.

Cepa Monospórica N° 10. Conidios color castaño oscuro, algunos son obpiriformes a clavulados, con 4 a 6 tabiques trasversales, otros piriformes, que presentan de 1 a 3 tabiques trasversales y escasos tabiques oblicuos, paredes lisas. En general, los conidios más pequeños, tienen un pico muy reducido y cicatriz hilar bien marcada. Cuando el conidio es elipsoide no posee pico. Los tabiques trasversales son gruesos como si fueran dobles. El promedio del largo de esporas es de 18,19 μm y del ancho es de 5,85 μm . Conidióforos tabicados, color castaño oscuro, rectos a algo sinuosos, con cicatrices hilares laterales y apicales, miden en promedio 47,81 μm ; cadenas de 5-6 conidios. Las hifas son tabicadas, de color castaño más claro (Fig. 18 G). Colonia castaño oscura, con mediana elevación, centro más condensado, y rodea a este centro, un halo de color castaño más oscuro. A los 8 días, el desarrollo es de caja casi completa, y tiñe el medio de color negro (Fig. 18 K). Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden con las de *A. alternata*.

Cepa Monospórica N° 11. Conidios color castaño medio, en forma de clava, con 2 a 6 tabiques trasversales, con escasos tabiques longitudinales y oblicuos, constreñidos en los septos. Pico bien definido, si bien algunos conidios presentan picos con tabiques. Miden en promedio 19,22 μm de largo y 7,79 μm de ancho. Hifas de color castaño claro, con tabiques. Conidióforos casi rectos, algunos flexuosos de color castaño medio, tabicados, de 41,72 μm de largo en promedio (Fig. 18 H-I).

La colonia es de color castaño-grisáceo, elevación media, densa, de aspecto algodonoso, casi polvoriento. Tiñe el medio de negro (Fig. 18 L). Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden con las de *A. alternata*.

Cepa Monospórica N° 12. Conidios castaño medio a oscuro, jóvenes globosos, más claros, con un tabique trasversal y longitudinal. Algunos conidios son piriformes y otros elipsoidales, con pico corto, los más jóvenes sin pico, con 2-4 tabiques trasversales,

algunos septos son oblicuos, otros longitudinales y otros conidios sólo con tabiques transversales. Son y poseen cicatriz hilar bien marcada. El promedio del largo total de los conidios es de 20,07 μm y el ancho de 7,2 μm . Los conidióforos tienen 1-2 cicatrices conidiales, generalmente una. Son tabicados y su color es castaño medio (Fig.18 J). El promedio del largo de conidióforos es de 51,8 μm . Esta cepa presenta cadenas cortas de 4-6 conidios. Las hifas son más claras y tabicadas.

La colonia es de color castaño-grisáceo, con sectores más claros, poco elevada, micelio muy denso, de crecimiento rápido. A los siete días de desarrollo el micelio llena casi totalmente la caja (Fig.18 M). Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden con las de *A. alternata*.

Las características morfológicas y culturales de las cepas N°7 a 12 se ilustran en la figura 18.

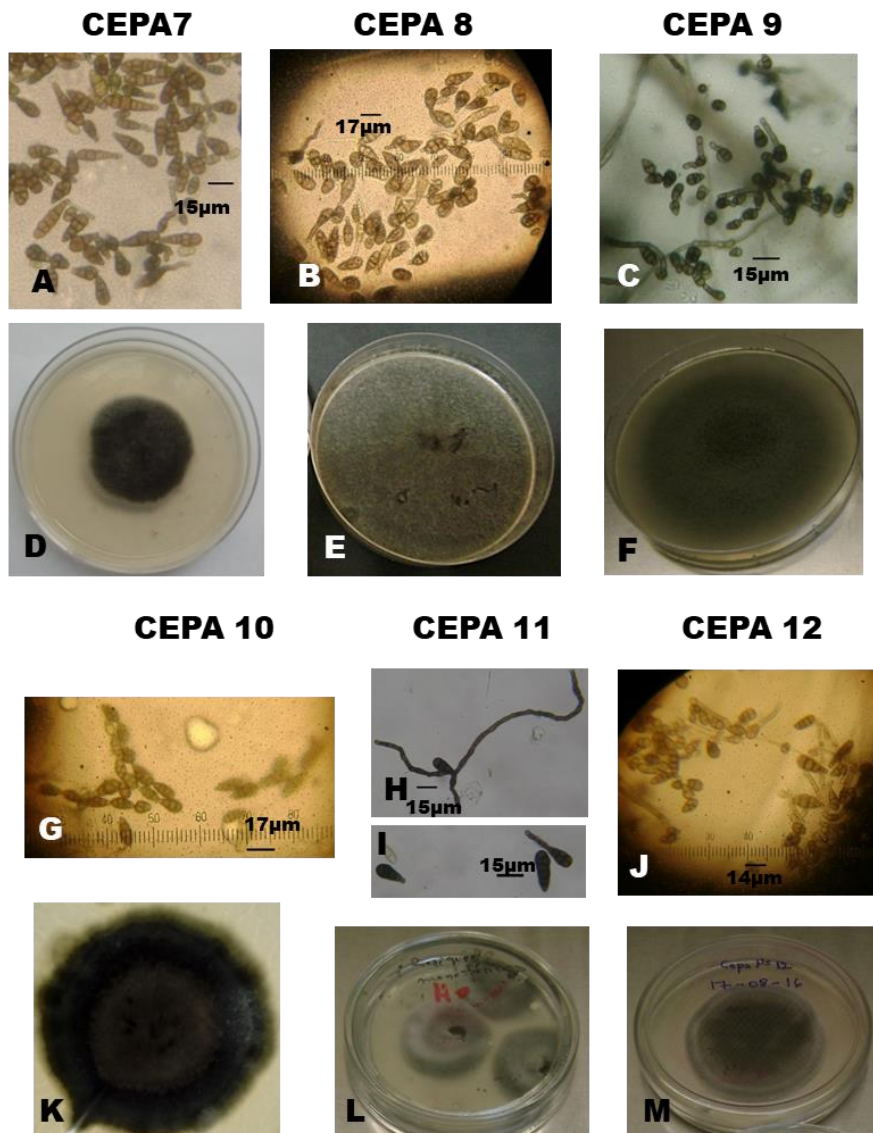


Figura 18. Fotografías que muestran las características de conidios y colonias correspondientes a las cepas 7 -12.

Cepa Monospórica N° 13. Conidios castaño-oliváceo pequeños, obpiriformes o en forma de clava, con picos cortos, la mayoría con 1 a 3 tabiques transversales, muy escasos longitudinales, constreñidos en los septos, sin tabiques oblicuos. Los picos o rostros presentan cicatriz hilar visible. Hay formación de cadenas cortas de esporas. El promedio del largo total de los conidios es de 14,59 μm y el ancho de 6,65 μm . Las hifas

son más claras, tabicadas. Conidióforos rectos y tabicados. El promedio del largo de conidióforos es de 37,8 μm (Fig. 21 A).

La colonia es de color gris oscuro, tiene aspecto algodonoso. El desarrollo micelial es de bajo a medio. Tiñe el medio de negro. Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden a *A. alternata* (Fig. 21 D).

Cepa Monospórica N° 14. Conidios castaño amarillento con picos definidos. Tienen de 3-8 tabiques transversales, algunos longitudinales y oblicuos, la mayor parte solo transversales, con constricciones en los septos, y abundante citoplasma gutulado, algo refringente. El pico en algunos conidios muy breve y en otros largos y tabicados. El promedio del largo total de los conidios es de 27,04 μm y el ancho de 7,57 μm . (Fig. 21 B) Los conidióforos de igual color que el conidio, son rectos algunos y otros presentan sinuosidades, o prominencias (torulosos). El promedio del largo de conidióforos es de 45,36 μm Forman cadenas cortas de 3-6 conidios. Algunos conidios con largos tubos de germinación. Las hifas son verdosas y tabicadas (Fig. 21 B).

La colonia es de color gris oliváceo, con mediana elevación micelial y tiñe de oscuro el medio (Fig. 21 E). Estas características corresponderían a *A. alternata*.

Cepa Monospórica N°15. Conidios de color castaño oscuro, piriformes o en forma de clava, con varios tabiques marcados. El pico es corto, bien marcado. Algunos tienen constricciones bien notorias, paredes lisas con gruesos tabiques, transversales, algunos conidios poseen tabiques oblicuos y longitudinales. Forman cadenas cortas de 2-5 conidios. Sus medidas en promedio son 17,36 μm de largo y 7,46 μm de ancho (Fig. 21 C) Las hifas son más claras y tabicadas. Conidióforos rectos, cortos, tabicados, sinuosos, de similar color al conidio. El promedio del largo de conidióforos es de 30,8 μm . La colonia es castaño grisáceo oscuro, de elevación media, densa y no tiñe de negro el medio (Fig. 21 F). Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden a *A. alternata*.

Cepa Monospórica N° 16. Conidios castaños medio y los más maduros de un color castaño oscuro. Son cortos, con picos o rostros bien marcados, de 2-7 tabiques transversales, con pocos tabiques longitudinales y oblicuos, de forma elipsoidal o piriforme. Poseen cicatriz hilar bien marcada. Las esporas más jóvenes se asemejan a los conidios de *Ulocladium*. El promedio del largo total de los conidios es de 19,94 μm y el ancho de 8,22 μm (Fig.19 A y B). Las hifas son más claras que los conidios. Los conidióforos son flexuosos y tabicados, de color castaño-oscuro, midiendo 47,5 μm de largo (Fig.21 G). Colonia de color gris, de crecimiento micelial denso, que tiñe el medio de negro. Sus características se condicen con las de *A. radicina* (Fig.21 J).

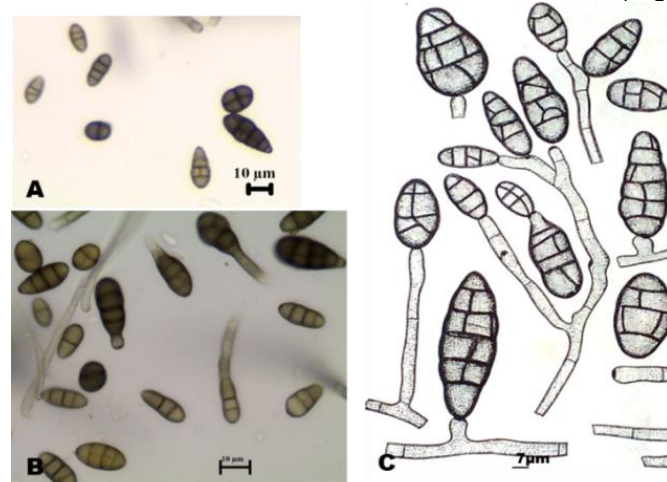


Figura 19. Conidios. A, B. Conidios e hifas de *A. radicina* de este trabajo; C. Fotografías de estructuras de esta especie según Ellis (1971).

Cepa Monospórica N° 17. Conidios cuando jóvenes, de color castaño dorado, en tanto al madurar, adquieren color castaño medio-oliváceo a castaño oscuro; son pequeños, globosos, obpiriformes, con picos cortos y tabiques transversales, algunos con escasos septos longitudinales y oblicuos (Fig. 21 H). El promedio del largo total de los conidios es de 15,59 μm y el ancho de 6,78 μm . Los conidióforos son cortos, de color castaño medio, tabicados, 4-6 tabiques, algunos bastantes rectos. El promedio del largo de conidióforos es de 36,4 μm (Fig. 20 A).

La colonia es de color gris verdoso, micelio denso, con crecimiento aéreo algodonoso. Tiñe el reverso de la colonia de un color castaño oliváceo (Fig 21 K). Las características morfométricas de esta cepa, se corresponden a las de *A. alternata*.

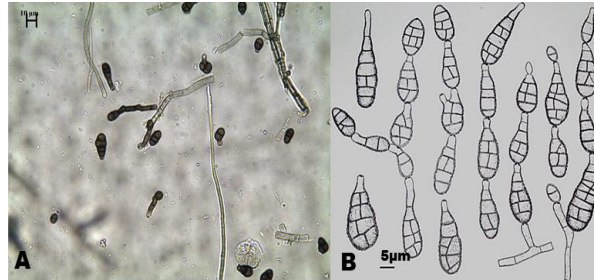


Figura 20. A. Estructuras de *A. alternata* (cepa 17); B. Fotografías de conidios, y conidióforos de *A. alternata* (Ellis, 1971).

Cepa Monospórica N° 18. Conidios de color castaño, obpiriformes, elipsoides o en forma de clava, 2 a 5 tabiques transversales, escasos septos longitudinales y oblicuos, constreñidos en los septos. Algunos conidios no tienen pico y aquéllos que lo tienen presentan cicatriz hilar bien marcada. Los conidios forman cadenas cortas. El promedio del largo total de los conidios es de 22,05 μm y el ancho de 8,12 μm , en tanto los conidióforos miden 48,22 μm . Los conidióforos son tabicados, de color castaño, bastante rectos. Algunos con bifurcaciones (Fig.21 I). Colonia con micelio aéreo algodonoso, de gris blanquecino, tiñe de oscuro el medio (Fig.21 L). Sus características morfométricas se corresponden con las de *Alternaria alternata*.

Las características morfológicas y culturales de las cepas N° 13 a 18 se ilustran en la Figura 21.

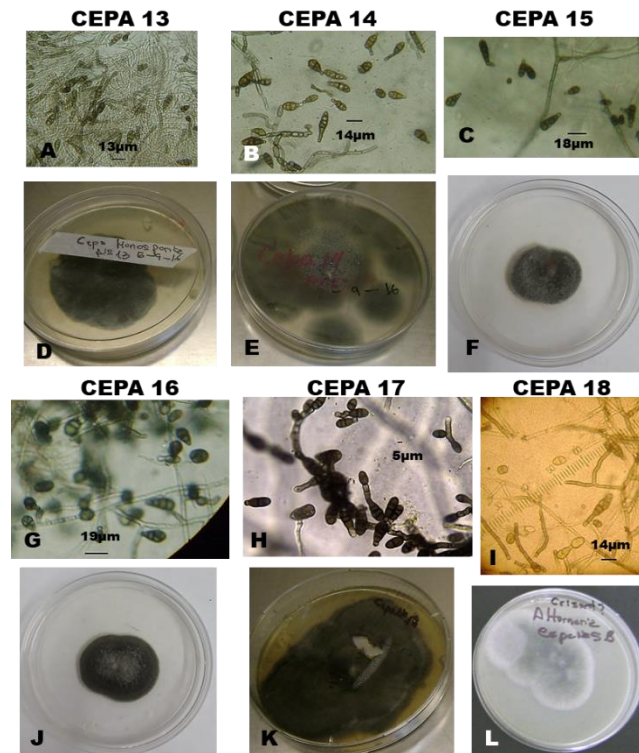


Figura 21. Fotografías que muestran las características de conidios y colonias correspondientes, en forma consecutiva a las cepas 13- 18.

Si bien se analizaron 18 cepas monospóricas, todas causantes del tizón foliar, también se obtuvieron otros aislados comunes (no monospóricos) asociadas a la enfermedad, con características del género *Alternaria* y muy semejantes a la especie *chrysanthemi*. Al ser observados bajo microscopio óptico, se detectaron conidios de color castaño-oliva, de tamaño variable, de forma cilíndrica, con 8 a 10 septos transversales y escaso a nulo número de tabiques longitudinales y/u oblicuos, cuyas medidas varían entre 25-125 μm (promedio 70 μm) de longitud x 9,5-20 μm (promedio de 19 μm), las cuales corresponderían a la especie *A. chrysanthemi* sin. *Teretispora leucanthemi* (Fig. 22).

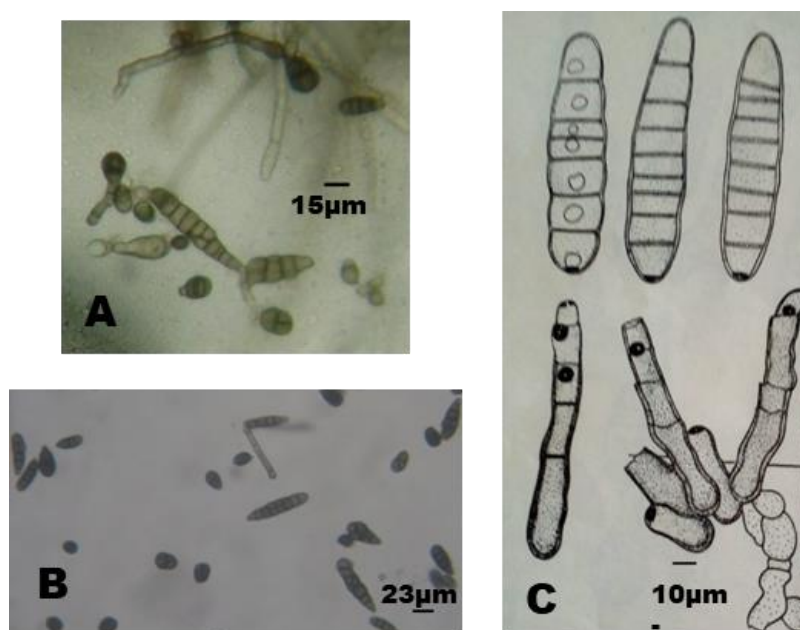


Figura 22. A; B y C Estructuras de *Teretispora leucanthemi*;

C. Fotografía de *A. chrysanthemi* (Ellis, 1971).

.2.4-Análisis de componentes principales de las cepas monospóricas.

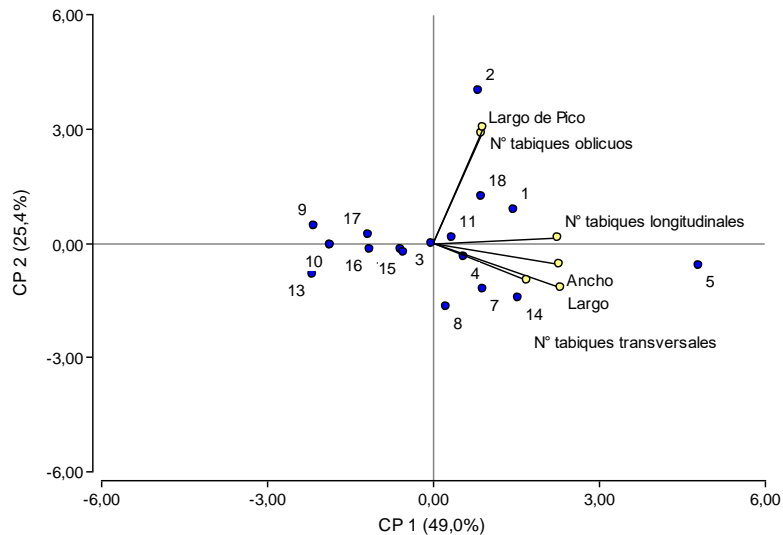


Figura 23. Gráfico de biplots o de componentes principales.

Este tipo de análisis permitió comprobar la variabilidad morfométrica y cultural existente en las diferentes cepas aisladas, lo cual queda reflejado en la Figura 23, cuyos componentes principales 1 y 2 explican el 74,4% de variabilidad total, permitiendo detectar cuál o cuáles de ellas, son las de mayor peso.

En el eje 1 (componente 1-CP1), las variables largo, ancho y número de tabiques longitudinales de los conidios son las de mayor importancia; el ángulo de estas 3 variables es agudo, demostrando que las mismas están correlacionadas.

En el eje 2 (CP2) el número de tabiques oblicuos y largo del pico, también son variables que tienen mayor valor y están altamente correlacionadas. Por otro lado, la cepa 5 se diferencia del resto, por presentar mayor medida de largo y ancho.

En el gráfico biplot se visualiza que las cepas 3, 9, 10, 13, 15, 16 y 17 presentan menores valores de las variables largo, ancho y número de tabiques longitudinales.

2.5 - Análisis de Conglomerados.

Esta agrupación entre las diferentes cepas, estaría relacionada con la identificación realizada en base a características morfométricas y culturales que permitió separar a las diferentes especies.

Del análisis surgieron 5 grupos de conglomerados, que comparten ciertas características y que entre ellos son similares en relación con las variables estudiadas. El grupo 1 está formado por 12 cepas; el grupo 2, 3 y 4 están formados sólo por una cepa y el grupo 5 por 3 cepas. El grupo N° 1 (rojo) está conformado por el mayor número de cepas (1, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17 y 18); el grupo 2 (azul) por la cepa 16; el grupo 3 (amarillo) por la cepa 2, el grupo 4 (verde) por la cepa N° 5 y el 5 (gris) por las cepas N° 7, 8 y 14. Ver Anexos. El grupo 1 posee ancho y número de tabiques transversales de conidios que se encuentran en rangos cercanos. El grupo 2 se diferencia del resto porque sus conidios presentan el menor número de tabiques transversales y oblicuos. Además el promedio del ancho supera a las otras cepas, a excepción de la cepa N° 5. El grupo 3 (correspondiente al aislado N° 2) muestra como

característica distintiva que la longitud de los picos conidiales cuando estos están presentes, supera al resto de cepas. El grupo 4 se distingue de los restantes, debido a que las variables longitud, ancho, número de tabiques transversales y longitudinales son superiores a los otros 17 aislamientos. El grupo 5 tiene cepas con promedios de longitud total de conidios y de tabiques transversales muy similares (Fig. 24). Ver Anexos.

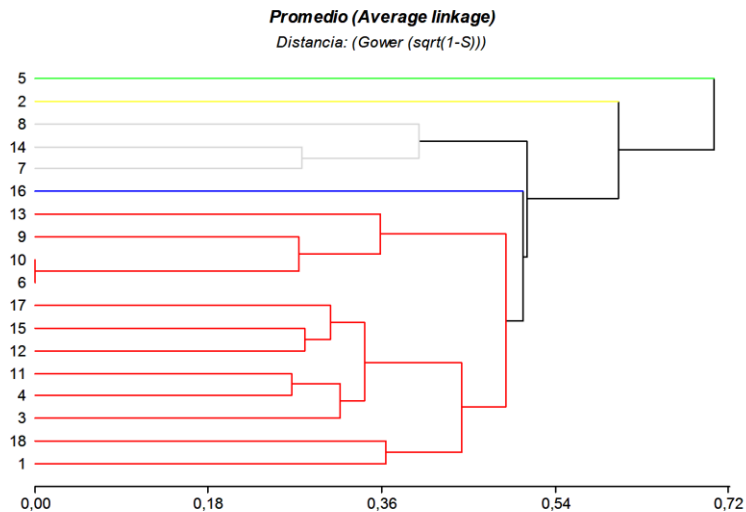


Figura 24. Gráfico de Conglomerados o Dendrograma con los datos de este trabajo.

3- Pruebas de Patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad cumplidas con las 18 cepas, tanto en el método de ojas sueltas como en plantas, bajo mini-invernadero dieron resultados positivos. Las primeras reacciones se observaron entre los 3 y 4 días, en los tratamientos con heridas y a los 4- 5 días en los tratamientos sin heridas, reproduciéndose los síntomas con las características observadas en ataques naturales. A los siete días, se observaron sobre las lesiones abundantes conidios y conidióforos del hongo inoculado. Esta velocidad de infección en los órganos inoculados, demuestra un alto grado de agresividad del agente causal. Además, el desarrollo de síntomas en ambos tratamientos (con y sin herida), indicaría que el patógeno no necesita de una puerta de entrada previa para infectar la planta (Fig. 25). El hongo fue reaislado a partir de las hojas con reacción positiva en todas las cepas completándose así, los Postulados de Koch.

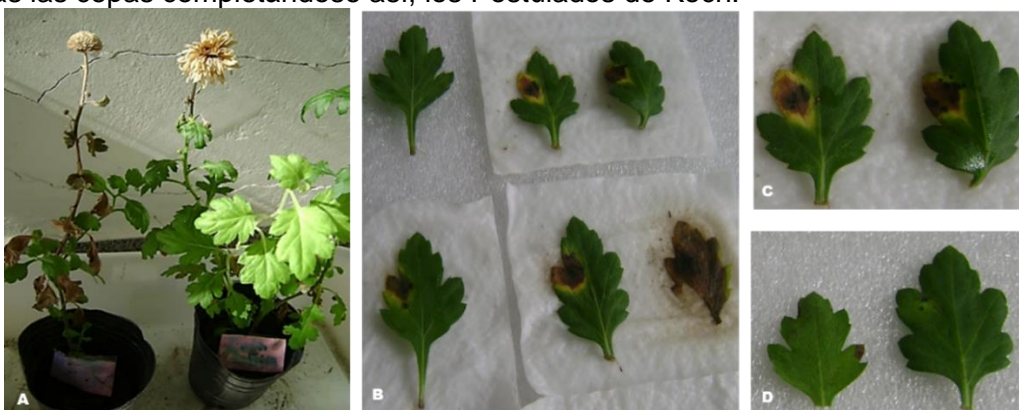


Figura 25. Pruebas de Patogenicidad: A. Síntomas del tizón en plantas inoculadas; B., C. y D. Síntomas de tizón en hojas sueltas (B y C, tratamiento con heridas; D. tratamiento sin heridas respectivamente).

4 - Análisis Molecular de las Cepas- Laboratorio de Biotecnología Molecular (Inbiomis).

Una vez obtenido los ácidos nucleicos de cada aislamiento, se logró amplificar la región ITS1-5,8S-ITS2 del ADN ribosómico. En los productos de amplificación por PCR a partir del ADN extraído, se observa un amplicón de aproximadamente 600 pb correspondiente a la región analizada (Kordalewska, *et al* 2015). Los productos de amplificación por PCR fueron enviados a purificar y secuenciar a Seoul (Korea) por los servicios de Macrogen. Al contrastarse las secuencias de ambos aislamientos fúngicos con la base de datos moleculares curada del Fungal Barcoding se observaron porcentajes de similitud mayores del 99% con secuencias de *A. alternata*. En la Tabla 1 se muestran los resultados finales obtenidos luego del contraste en las bases de datos: NCBI y Fungal Barcoding. Cabe destacar, que la región ITS1–5,8S–ITS2 del ADN ribosómico es recomendada como código de barras genético para hongos, sin embargo se observó que en el caso de aislamientos de *Alternaria* esa región genética exhibe baja variabilidad genética. De acuerdo a la metodología empleada fue posible extraer ácidos nucleicos de los aislamientos codificados como 9 y 17.

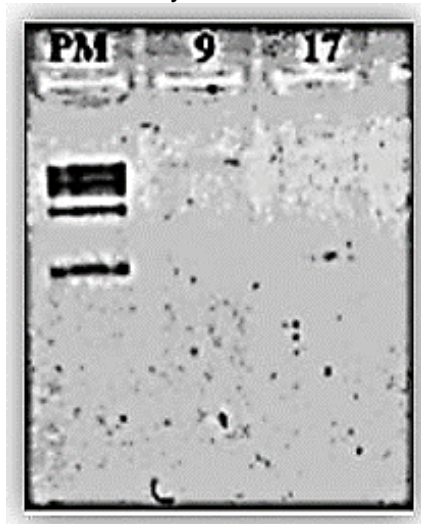


Figura 26. Gel de agarosa al 1 % para corroborar la extracción de ADN= peso molecular

Una vez obtenidos los ácidos nucleicos de cada aislamiento, se logró amplificar la región ITS1-5,8S-ITS2 del ADN ribosómico. En la Figura N° 26 se presentan los productos de amplificación por PCR a partir del ADN extraído. Se observan un amplicón de aproximadamente 600 pb correspondiente a la región analizada.



Figura 27. Gel de agarosa al 2% para visualización de los productos de PCR. PM: peso molecular.

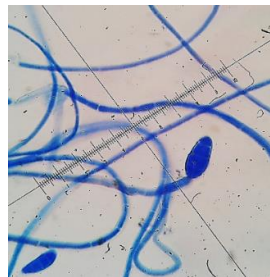


Figura 28. Conidios e hifas de *Alternaria alternata* teñidos con azul de metileno (Cepa N° 9) fotografiados en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (Inbiomis).

Luego de su procesamiento y evaluación, las secuencias obtenidas de los aislamientos fúngicos 9 y 17 presentaron elevados índices de identidad, mayores al 99%, con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI para diferentes aislamientos de las especies *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *A. japónica*, *A. arborescens*, *A. vitícola* y *A. brassicae*. Se adjuntan las secuencias obtenidas, editadas y analizadas empleadas en la identificación de los aislamientos fúngicos 9 y 17.

Tabla N° 12. Análisis molecular y bioinformático de las Cepas 9 y 17.

Aislamiento	Resultados del análisis mediante PCR – Secuenciación			Nombre científico final
	Secuencia en Análisis	Mediante base de datos primaria NCBI	Mediante base de datos curada Fungal Barcoding	
9	ITS 1	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. japonica</i> y <i>A. arborescens</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
	ITS 4	<i>Alternaria alternata</i> y <i>A. viticola</i>	<i>Alternaria alternata</i>	
	Cóntigo Consenso	<i>Alternaria brassicae</i> y <i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	
17	ITS 1	<i>Alternaria alternata</i> y <i>A. tenuissima</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
	ITS 4	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	
	Cóntigo Consenso	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	

El análisis de identificación molecular de la región ITS (Schoch, *et al* 2012; Sun, X. & T.Y. Zhang. 2008) y el análisis bioinformático de porcentaje de identidad en referencia a las secuencias depositadas en las bases de datos moleculares permitieron designar a los aislamientos de *Alternaria* 9 y 17 como pertenecientes a la especie *Alternaria alternata*.

4- Prueba de sensibilidad in vitro de *Alternaria* a distintos fungicidas.

Análisis Estadístico

Los datos correspondientes a las mediciones de los radios de las colonias en las tres experiencias con fungicidas, se sometieron a análisis de varianza y la comparación de las dosis de fungicidas se efectuó mediante la prueba de Tukey.

a- Evaluación del Porcentaje de Inhibición (%) del fungicida Carbendazim correspondientes a la dosis 0, 10, 50 y 100 ppm.

Del cuadro de ANOVA, se establece que existe diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre las concentraciones ppm. Para ello se recurre a una prueba post-ANOVA (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 13 Prueba post-ANOVA Tratamiento con Carbendazim.

Prueba: Tukey $\alpha=0,05$

Concentración ppm	Medias	n	E.E.	
0	0,00	42	1,56	A
50	9,67	42	1,56	B
10	10,66	42	1,56	B
100	14,79	42	1,56	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

De la prueba de Tukey, se establece que para el tratamiento con Carbendazim, todas las concentraciones difieren del testigo, y a su vez que **no** existen diferencias significativas entre las concentraciones de 50, 10 y 100 ppm.

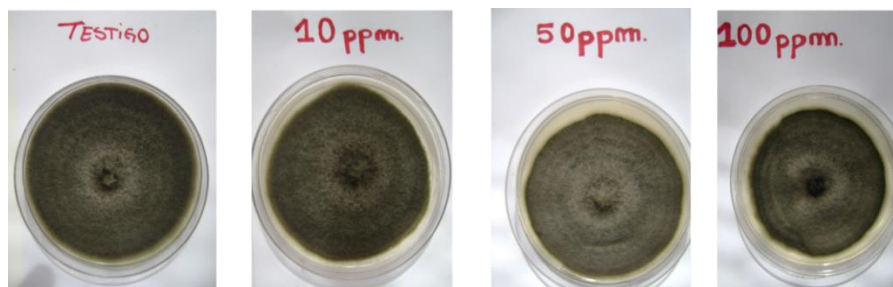


Figura 29. Efecto de aplicación de Carbendazim sobre colonia de *Alternaria alternata*

b- Evaluación del Porcentaje de Inhibición (%) del fungicida Azoxistrobina correspondientes a la dosis 0, 10, 50 y 100 ppm.

Del cuadro de ANOVA, se establece que existe diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre las concentraciones ppm. Para ello se recurre a una prueba post-ANOVA. (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 14. Prueba post-ANOVA Tratamiento con Azoxistrobina.

Prueba: Tukey, $\alpha=0,05$				
Concentración ppm	Medias	n	E.E.	
0	0,00	36	0,89	A
10	0,55	36	0,89	A
100	7,29	36	0,89	B
50	10,18	36	0,89	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

De la prueba de Tukey, se establece que existen diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas. Las concentraciones 10 ppm y el testigo estadísticamente son iguales y difieren de las concentraciones de **50** y **100** ppm, y estas últimas son estadísticamente iguales.

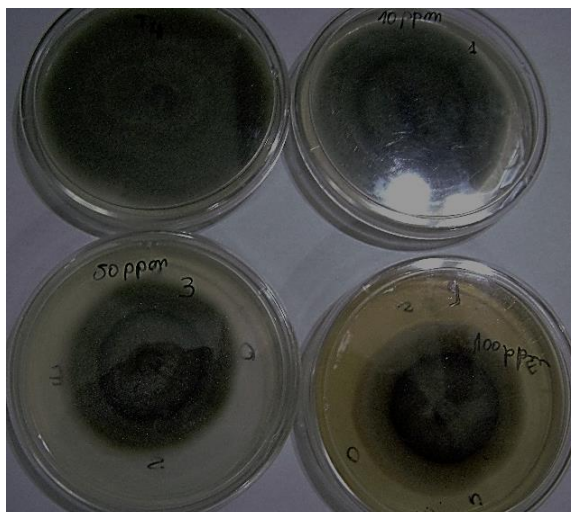


Figura 30. Efecto de aplicación de Azoxistrobina sobre colonia de *Alternaria alternata*.

c- Evaluación del Porcentaje de Inhibición (%) del fungicida Mancozeb correspondientes a la dosis 0, 10, 50 y 100 ppm.

Del cuadro de ANOVA, se establece que existe diferencias significativas ($\alpha=0,05$) entre las concentraciones ppm. Para ello se recurre a una prueba post-ANOVA. (Tukey, $\alpha=0,05$).

Tabla 15. Prueba post-ANOVA Tratamiento con Mancozeb.
Prueba: Tukey $\alpha =0,05$

Concentración ppm	Medias	n	E.E.	
0	0,00	36	0,04	A
50	0,05	36	0,04	A
10	0,10	36	0,04	A
100	0,27	36	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

De la prueba de Tukey, se establece que existen diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas. Las concentraciones 10 y 50 ppm, y el testigo estadísticamente son iguales y difieren de la concentración de **100 ppm**, es decir que **con esta concentración se detecta el mayor porcentaje de inhibición del hongo**. Sin embargo el control del crecimiento micelial del patógeno es bajo.

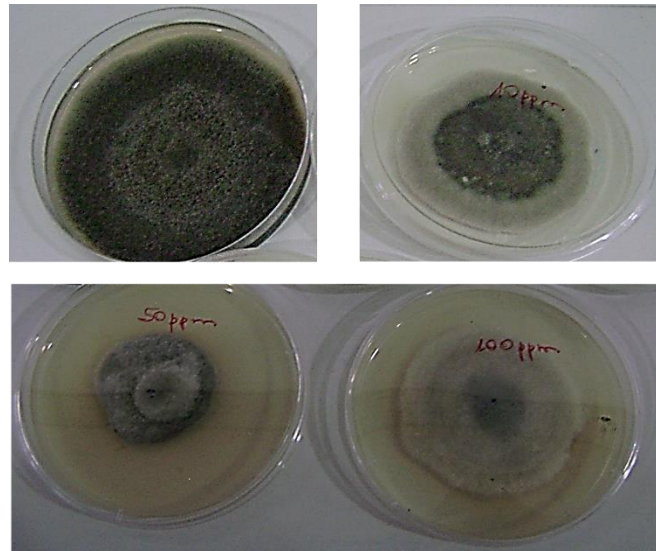


Figura 31. Efecto de la aplicación de Mancozeb sobre la colonia de *Alternaria alternata*.

Cálculo de CI_{50}

Para determinar la CI_{50} , se modeló la relación entre el Porcentaje de Inhibición (%) y las concentraciones evaluadas (0, 10, 50 y 100 ppm). Se ajustaron modelos polinómicos de 2° orden en función de los 3 fungicidas evaluados.

Polinomio de 2° orden	$Y = \alpha + \beta D + \xi$
-----------------------	------------------------------

Donde:

Y : es la variable respuesta: Porcentaje de Inhibición (%)

α : es la ordenada de origen

β es la pendiente: porcentaje de inhibición a medida que aumenta la dosis.

ξ : es el término del error aleatorio

Tabla N° 16. Valores de los parámetros del modelo

Fungicida	α	β	β^2
Mancozeb	0,0239	0,0124	-0,0001
Azoxistrobina	-1,1011	0,3995	-0,0021
Carbendazim	22,198	-0,1829	0,002

D : concentración en ppm

Tabla N° 17. Valores de la CI_{50}

Fungicida	CI_{50}
Mancozeb	687 ppm
Azoxistrobina	118 ppm
Carbendazim	150 ppm

Tabla N°18. Escalas de sensibilidad en base a la CI₅₀, Edginton, *et al.* (1971).

ppm	Grado de sensibilidad
<1	Muy sensible
1 a 10	Moderadamente sensible
>50	Resistente

Los resultados de la CI₅₀ obtenidos de las experiencias con Carbendazim y Azoxistrobina nos indican que ambos principios activos, resultan ineficientes para inhibir el crecimiento micelial del patógeno según la escala de sensibilidad de Edginton, *et al.*, (1971), puesto que 150 y 118 ppm son dosis altamente superiores a las 50 ppm según la escala propuesta por este autor, e indican que la cepa es resistente a ambos fungicidas. En el caso del Mancozeb, (ditiocarbamatos), se utiliza la escala de sensibilidad de Lim (1980), para que los resultados sean comparables (Lovato (Echeverría, *et al.* 2014). En este caso se necesitan 687 ppm, para alcanzar la CI₅₀, quedando demostrado que el producto es poco eficiente para el control del agente causal del tizón foliar del crisantemo, puesto que al ser analizado por la escala de Lim, correspondería a la franja de producto poco tóxico para el patógeno, casi en el límite de la siguiente franja siguiente, en donde la cepa utilizada sería resistente al Mancozeb.

Tabla N° 19. Escala de Lim (1980).

ppm	Grado de sensibilidad
<10	Altamente tóxico
10-100	Tóxico
100-400	Moderadamente tóxico
400-700	Poco tóxico
> 700	Resistente

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

En los campos de producción de flores para corte sitios en Santa Rosa, y en las muestras obtenidas en el Departamento Capital, Corrientes se observaron síntomas de tizón foliar y de flores en *C. morifolium* que fueron coincidentes con los descritos por Rao (1964) quien ha reportado *Alternaria tenuis* Auct. (*Alternaria alternata* (P.) Keissler.), causando el tizón de las hojas y el tizón de la flores de *Chrysanthemum indicum*, L. de Maharashtra (India). Este autor describió que las manchas eran ovales a irregulares o angulares, de color marrón oscuro a negro, induciendo el tizón de las hojas y de las flores y consecuente defoliación, síntomas totalmente coincidentes con los observados y reproducidos en laboratorio durante este trabajo. Por otro lado, según Camargo *et al.*, (2000), *Alternaria* sp. produce necrosis de los tejidos provocando manchas en las hojas; al principio son pequeñas y de color púrpura, que rápidamente crecen adoptando una forma circular, el centro se destaca por su color café grisáceo, necrótico, hundido y ornamentado con anillos concéntricos. En los tallos, las lesiones son al principio superficiales, pero después, penetran profundamente causando necrosis, del mismo modo que lo ocurrido en los cultivos de Santa Rosa. También Domínguez-Serrano (2016), observó que los síntomas de la enfermedad aparecieron inicialmente como lesiones pequeñas de color pardo con halo amarillento. A medida que la enfermedad avanzaba, las manchas confluyeron hasta formar grandes áreas irregulares necrosadas. En otros casos, hojas enteras se tornan amarillentas. La enfermedad fue avanzando desde la parte inferior de la planta hacia el ápice, desarrollando un cancro que estrangula las plantas, causando la muerte de la planta (Fig. 32).

Los resultados del estudio fueron coincidentes en cuanto a síntomas foliares, observándose además el efecto de daño en flores no sólo en relación al deterioro del aspecto externo sino además en la reducción del tamaño de las mismas, características observadas en los monitoreos y en el laboratorio.



Figura 32. A y B. Avance de la enfermedad desde la base hacia el ápice.

Finalmente, de acuerdo con lo informado por Cabrera, *et al.*, (2004), en el examen macro y microscópico, se observaron manchas de forma irregular, de color negro a castaño-oscuro, que se encontraban, en su mayoría, en el borde de las hojas. En flores, el tejido de los pétalos apareció totalmente necrosado, afectándolos casi en un 30 % del total, lo cual asevera las observaciones y resultados logrados en la ejecución de este trabajo. El tizón foliar es una enfermedad que ocasiona pérdidas económicas en los campos de producción, como así también en las condiciones de mercado. Como síntoma de esta patología, en las flores se observa oscurecimiento y podredumbre de capítulos, por lo que se vuelve inviable la comercialización de estas flores (Freitas-Astúa *et al.*, 2005).

Con respecto a la medición de la enfermedad, ésta fue cuantificada en el estadio de floración por ser éste el momento de mayor susceptibilidad. El tizón foliar causada por el complejo *Alternaria*, fue incrementada por el manejo inadecuado del cultivo, particularmente en el establecimiento Las Margaritas. En éste se observaron plantaciones continuas de crisantemo, año tras año, sin rotación y sin eliminación de plantas enfermas, con el agravante de utilización del rastrojo de crisantemo como abono de las plantaciones; esta situación aumenta progresivamente el porcentaje de inóculo del tizón (conidios y micelio) en el entorno de las nuevas plantas. Las especies fitopatógenas de *Alternaria* invernan como micelio en los restos de plantas infectadas y en forma de esporas o micelios en las semillas. Sin embargo, es más frecuente que las esporas que forma el hongo en gran abundancia (especialmente cuando las lluvias son frecuentes y hay un rocío abundante) sean desprendidas del micelio para desarrollarse sobre restos vegetales, malezas o plantas cultivadas infectadas. Las esporas que han germinado penetran a los tejidos susceptibles directamente o a través de herida, y en poco tiempo, producen nuevos conidios que son diseminados por el viento, la lluvia, las herramientas, etc. Con pocas excepciones, las enfermedades producidas por *Alternaria*, aparecen con mayor frecuencia sobre tejidos senescentes y particularmente en plantas con poco vigor, nutrición deficiente, o en plantas que crecen bajo algún tipo de adversidad debido a condiciones ambientales desfavorables, insectos, otras enfermedades, etc. (Agrios, 1998). El agente causal es favorecido por temperaturas elevadas, entre 20° y 28°C, pero es capaz de desarrollarse en un amplio espectro de temperaturas, siempre que la humedad relativa esté por encima del 80% (Freitas-Astúa *et al.*, 2005). Así mismo, si consideramos la humedad, según Culp & Thomas (1964), informaron que la humedad del suelo es uno de los factores que predispone a las enfermedades por *Alternaria*, tanto exceso como deficiencia, ya que producen tensiones en las plantas. Esto explicaría los bajos a moderados índices de incidencia y severidad registrados durante el período de monitoreo de la enfermedad, en un área que soportó una fuerte sequía, con un valor de precipitaciones durante otoño-invierno y principios de primavera de apenas 98,55 mm (Registros Meteorológicos INTA Santa Rosa, Corrientes 2015).

Según Rotem (1998), las especies patógenas de *Alternaria* perduran en el suelo varios años, en los restos vegetales y en semillas. En el caso de *A. alternata*, sobrevive en los tejidos enfermos en hojas, tallos y yemas, como micelios y conidios. Por tal razón, Vázquez Guadamarrá (2016), recomienda destruir los residuos de cosecha, realizar rotación de cultivos para reducir el inóculo del suelo y utilizar variedades resistentes o tolerantes.

La predisposición de la planta a las enfermedades es definida como el incremento de la susceptibilidad del hospedante resultante de la influencia de factores externos actuando sobre la planta. La susceptibilidad de la planta debida a la edad, se manifiesta cuando la planta se aproxima a la edad de floración con un número mayor de infecciones, con lesiones más grandes, más rápida expansión de estas lesiones y períodos de latencia más cortos, para el caso de infecciones de *Alternaria* (Populer, 1978). Al respecto, Rotem (1998) también señaló que en muchos casos el incremento de la susceptibilidad resulta directamente del tipo de agente que produce la enfermedad, mientras en otros casos puede haber interacción de varios factores.

Del mismo modo, se observó que el complejo *Alternaria* se caracteriza por infectar a la planta en dos momentos de su desarrollo: en estado juvenil (plantinera) y en floración. Esto explicaría el hecho que en los cultivos estudiados fueron mayores las infecciones en plantinera y en estadio de floración de la planta, que son los períodos más susceptibles de éstas a la enfermedad.

Además, de acuerdo a Rotem (1998), las plantas que crecen vigorosamente son más resistentes a las infecciones por *Alternaria* que aquellas pobremente desarrolladas. En ciertos casos la asociación entre vigor y susceptibilidad resulta de varios efectos culturales. Esto también se aplicaría a lo observado en los cultivos de crisantemo en los

invernaderos visitados, donde la presencia de malezas y cuscuta, en la zona central fue manifiesta e influyó en el incremento del número de plantas con síntomas.



Figura 33. A-D. Invernaderos en producción con presencia de malezas y plantas con síntomas de tizón foliar. A y C. Establecimiento Gadiersa S. A.; B y D. Establecimiento Las Margaritas.

A su vez, Cumes Mantanico (2008), informó que en los invernaderos se crean sistemas en los que no existe un balance natural de las poblaciones vegetales, debido a que sólo se siembra una especie vegetal (monocultivo), coincidente con lo registrado en el Establecimiento Las Margaritas. En tanto, el porcentaje de incidencia fue mayor en éste, debido en parte, al desconocimiento del comportamiento biológico del agente causal. Los fungicidas se aplicaron en forma preventiva, sin conocimientos precisos de dosis y momento. En tanto la severidad de la enfermedad en ambos establecimientos promedió el 5 %, que se correspondería a los grados 2 y 3 de la escala de Villanueva-Couoh *et al.*, (2005), mientras la incidencia osciló entre el 5,5 y 18,17% en los Establecimientos Gadiersa S.A. y Las Margaritas, respectivamente. Ante esta situación, es muy probable que el manejo agronómico aplicado y las condiciones ambientales, podrían estar determinando la intensidad de la misma en el período en el cual fue realizado este estudio, motivo por el cual es necesario intensificar el monitoreo de la enfermedad, a fin de precisar los valores de incidencia y severidad.

La enfermedad se manifestó desde plantas jóvenes en primera plantación y la severidad se acentuó a medida que se alcanzara floración y más aún al avanzar las estaciones del año, con pérdida de órganos enfermos. Este hecho se registró en los galpones de los establecimientos, donde se debió disponer de personal extra, destinado a la limpieza, clasificación y embalaje del material destinado a la comercialización, lo cual coincide con lo informado por Rotem (1998), cuando asevera que el incremento en la intensidad de la enfermedad a menudo ocurre después que algunas pérdidas ya se han producido, como es el caso de muerte de plantas jóvenes en plantineras. Así mismo, Boote *et al.*, (1983), reportó que las enfermedades por *Alternaria* incrementan las pérdidas en campo porque la fotosíntesis es afectada en el follaje, o por la invasión del patógeno en flores, lo que va en detrimento de la calidad del producto o por la combinación de todos estos mecanismos.

Por otro lado, la identificación y clasificación de las especies del género *Alternaria* se han basado primariamente sobre la morfología de los conidios y patrones de encadenamiento de los mismos sobre el conidióforo (Simmons, 2007). Sin embargo la identificación de éste género, continúa ofreciendo muchas dificultades, particularmente por la alta variabilidad y diversidad. Algunos autores proponen agrupar las especies con subgrupos a su vez. Para resolver lo propuesto en la hipótesis en este trabajo se ha seguido la propuesta de Woudenberg (2013), Simmons (2007), Rotem (1998) y Ellis (1971, 1976).

El principal enfoque del estudio fue la caracterización e identificación de cepas de *Alternaria* aisladas de plantas de crisantemo, que fueron afectadas por tizón (de hojas y de flores), en base a la morfología y morfometría de conidios y caracterización de colonias desarrolladas en APG. Además, fue imprescindible la ejecución de pruebas de patogenicidad (de todas las cepas aisladas), y el estudio de identificación molecular de algunas de esas cepas, para confirmar la identificación morfológica realizada. Estos trabajos se debieron realizar debido a la variabilidad que se observó en las características morfo-fisiológicas de las especies que componen el género *Alternaria* aisladas de crisantemos de cultivos correntinos.

En este punto la situación fue similar al planteo por el cual Woudenberg *et al.*, (2013), trabajaron y encontraron que el género *Alternaria* es muy variable. Ellos comprobaron que el género se compone de 24 secciones (Sec. Alternata, Sec. Alternantherae, Sec. Porri, Sec. Gypsophylae, Sec. Radicina, Sec. Sonchi, Sec. Brassisicola, Sec. Infectoriae, Sec. Dianthicola, Sec. Cheiranthus, Sec. Japonicae, Sec. Eureka, Sec. Embellisoides, Sec. Nymbya, Sec. Panax, Sec. Phtagmosporae, Sec. Chalastospora, Sec. Embellisia, Sec. Pseudoulocladium, Sec. Teretispora, Sec. Ulocladioides, Sec. Ulocladium, Sec. Undifilum, Sec. Crivellia), casi siempre con una a varias especies por sección.

Observando esta publicación y comparando con el trabajo de tesis desarrollado, se comprobó que la mayor parte de los aislados obtenidos de las plantas enfermas de crisantemo, se ubicaron en la Sección Alternata, incluidas las especies *Alternaria alternata*, *A. tenuissima* y *A. longipes* que sin embargo, presentaron características morfométricas ciertamente diferentes a otras cepas que se ubicaron en esta sección.

Por otro lado, la cepa N° 16, sindicada como *A. radicina*, no frecuente sobre crisantemos, se ubicaría en la Sección Radicina, lo cual en parte explicaría su ubicación solitaria en el análisis estadístico de conglomerados.

Así mismo, en cepas no monospóricas examinadas con microscopio óptico, se observaron conidios y conidióforos consistentes con la descripción de *A. chrysanthemi* (Ellis, 1971), que fuera renombrada taxonómicamente por Simmons (2007) como *Teretispora leucanthemi* (Nelen). E.G. Simmons, y ubicada en la Sección Teretispora por Woudenberg *et al.*, (2013), como una especie monotípica (Tabla de autores, en Anexos).

En definitiva, los agentes causales determinados fueron: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire, *A. longipes* (Ellis & Everh.) E. W. Mason, *Alternaria radicina* Meier, Drechsler & E.D. Eddy, y *Teretispora leucanthemi* (Nelen). E. G. Simmons (= *A. chrysanthemi* E.G. Simmons & Crosier), lo que afirma lo planteado como hipótesis sobre la existencia de un complejo causal de tizón, en plantas de crisantemo en Corrientes.

Estos resultados demuestran la existencia de variabilidad morfológica y cultural considerable entre las diferentes cepas obtenidas en este trabajo, lo cual fue complementado mediante el análisis de conglomerados de todas las cepas analizadas, permitiendo el agrupamiento de las mismas; no obstante, la amplificación de la región ITS de dos de los aislados (N°9 y 17) del género, corroboró la identificación de las mismas como *A. alternata*. La región ITS es actualmente la región del ADN más ampliamente secuenciada y empleada en la identificación molecular fúngica.

Típicamente este marcador molecular es útil para investigaciones en sistemática molecular a nivel de especie e incluso a nivel intraespecífico (Schoch *et al.*, 2012; Bich *et al.*, 2015).

Los resultados de sensibilidad detallados en la Tabla N° 17, en el Capítulo III., señalan que Carbendazim (150 ppm) y Azoxistrobina (118ppm), la CI_{50} determinada superan las 50 ppm, por lo que la cepa utilizada se clasifica como resistente a estos productos, según la escala de Edginton *et al.*, (1971); de igual modo, *A. alternata* también se muestra como resistente a Mancozeb según Edginton *et al.*, (1971), pero esta escala está destinada para ser aplicada en aquellos fungicidas que actúan en un solo sitio de acción, motivo por el cual Mancozeb (de múltiple sitio de acción según la FRAC), debió ser analizada utilizando la escala propuesta por Lim (1980) (específica para ditiocarbamatos); éste autor considera que un patógeno se comporta de manera resistente cuando la CI_{50} supera las 700 ppm. En este trabajo, CI_{50} determinada fue de 687 ppm, con lo cual fue clasificado como poco “tóxico” a este producto.

Según la FRAC (2013), la especie *Alternaria alternata* es considerada muy agresiva y versátil al mismo tiempo, al momento de desarrollar resistencia en períodos cortos de tiempo, lo que representa una seria amenaza para el éxito comercial de nuevas moléculas con acción fungicida.

Según Odenapur (2011), para inhibir el crecimiento micelial de *A. alternata* en un 90%, se debería utilizar una dosis mayor a 2000 ppm de Mancozeb. A su vez, Arun-kumar (2008) logró controlar el crecimiento micelial del hongo *A. alternata* en un 75,81% con fungicidas de la familia de los Ditiocarbamatos en concentraciones superiores a 1.000, 2.000 y 3.000 ppm. Estos resultados son coincidentes a los obtenidos en este trabajo, demostrando que la utilización de estos principios activos está generando una selección de cepas resistentes a estos principios activos.

El complejo de especies del género *Alternaria* estudiadas en este trabajo son patógenos con alta capacidad de esporulación, lo cual combinado con principios activos de las familias de los benzimidazoles (Carbendazim) y estrobilurinas (Azoxistrobina) presentan un valor de riesgo nueve, según la matriz de riesgo propuesta por la FRAC (2018) (Tabla 20).

Tabla N° 20. Matriz de riesgo de resistencia (Frac, 2018).

Benzimidazoles	A l t o (3)	3	6	9	
Dicarbimidas		M e d i o (2)	2	4	6
Phenylamidas			B a j o (1)	1	2
Estrobilurinas					
Carboxanilidas					
DMIs					
Fosforothioates					
Anilino pirimidinas					
Fenilpirroles					
Cobres y azufres					
Ditiocarbamatos					
Inhibidores melan					
Phtalamidas					
SAR-inductores					
Riesgo Fungicida		Bajo (1)	Medio (2)	Alto (3)	
Riesgo Básico Enfermedad	Hongos de semilla Pyrenopeziza Ustilago Hongos sueto Roya cereales Antracnose	Cebada Rynchosporium	Roya manzano Sigatoka negra Cenicilla cereales Tizon tardío papa Mildiu, Botrytis Pyculanía arroz		

Si bien el patógeno tolera altas concentraciones de los principios activos utilizados, se observó alteraciones morfológicas en las hifas, conidios y conidióforos, ocasionando estructuras amorfas y anormales (deformaciones y pérdidas de tabiques en esporas, adelgazamiento de hifas). Eso se observa especialmente ante el efecto de Carbendazim que actúa sobre la división celular del patógeno, lo cual ocasiona un costo energético importante en el individuo que deriva en la viabilidad del patógeno (Fig. 34).

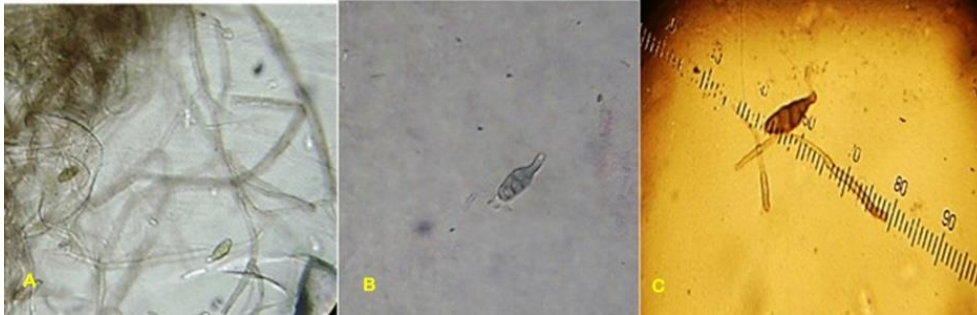


Figura 34. A. Deformaciones de conidios y adelgazamiento de hifas; B. Pérdida de los tabique; C. Deformación de la espora.

Por lo expuesto, los resultados obtenidos en el presente trabajo, demuestran la necesidad de un monitoreo constante de la sensibilidad de la población patógena a estos principios activos, lo que plantea la necesidad de reformular el actual manejo de enfermedades. Sin duda, un enfoque integral en el manejo contribuirá en el uso eficiente de otros fungicidas en el control del tizón. Así mismo, el monitoreo de variables ambientales es una herramienta importante para el productor que lo ayudará en la implementación de resultados a nivel comercial (Gastélum & Gálvez- Figueroa, 2002).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES.

Los dieciocho aislados del género *Alternaria* obtenidos en este trabajo, permiten concluir que el tizón foliar del crisantemo en la Provincia de Corrientes, es causado por un complejo de especies de dicho género, confirmando lo planteado en la primera hipótesis.

Todos los aislados (cepas monospóricas) demostraron su patogenicidad en los dos métodos de inoculación utilizados.

El progreso del tizón foliar en cultivos de crisantemo, demuestra tendencia a aumentar en sitios en los cuales las plantas reciben un manejo inadecuado y/o deficiente del cultivo.

Los tres principios activos evaluados in vitro no fueron efectivos sobre la cepa de *Alternaria* estudiada.

Es necesario profundizar tales estudios de sensibilidad in vitro con otros principios activos fungicidas.

Se propone un cambio de manejo que contemple los resultados obtenidos, a fin de mejorar la calidad de la producción.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, G.N. 1986. Fitopatología. Ed. Limusa. Méjico. 838 p.

2. Agrios, G.N. 1998. Fitopatología. Segunda edición. Editorial Limusa. México. 530 pp.
3. Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Editorial Elsevier Academic Press. 922 pp.
4. Arquero, S. 2000. Patologías de especies de *Chrysanthemum* (Asteraceae), cultivadas como ornamentales en las provincias de Corrientes y Chaco, Argentina. Trabajo Final de Graduación, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.
5. Arun Kumar, G.S. 2008. Studies on leaf blight of *Chrysanthemum* caused by *Alternaria alternata* (fr.) Keissler. Plant Pathology. Thesis for the Degree of Master of Science (Agriculture) in Plant Pathology.
6. Arun Kumar, G.S.; Kamanna, B.C.; Benagi, V.I. 2018. Management of *Chrysanthemum* leaf blight caused by *Alternaria alternata* (fr.) Keissler under field condition. Plant Archives 11(1):553-555.
7. Avila, A. de L.; Bobone; A.E., Quiroga; N.; Tuma Borgonovo, M.A. 2013. Floricultura. Cátedra de Floricultura. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 203 p. <http://www.agro.unc.edu.ar/~cultivosintesisivos/wp-content/uploads/2013/08/Floricultura-1.pdf> (consultado 10 de marzo de 2016).
8. Bañuelos-Balandrán, J.J.; & N. Mayek-Pérez. 2008. Evaluación no destructiva de la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Revista Mexicana de Fitopatología 26(1):71-75. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61226111>.
9. Barnett, H.L. & B.B., Hunter. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Edition, Burgess Publishing Co. Minneapolis. 241 pp.
10. Bich, G.A.; Castrillo, M.L.; Villalba, L.L.; P.D. Zapata. 2015. Isolation and phylogeny of *Leucoagaricus gongylophorus* (Moller) Singer from leaf-cutting ants in Misiones, Argentina. CREAM Journal.
11. Bigre J.P.; Morand J.C.; & M. Tharaud. 1990. Patología de los cultivos florales y ornamentales. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 233 pp.
12. Bornas, G. & Urcullo, D. 1953. Floricultura. 1ª Ed. Salvat Editores S.A. 512 p.
13. Boote, K.J.; Jones, J.W.; Mishoe, J.W. & R.D. Berger. 1983. Coupling pests to crop growth simulator stopped it yield reductions. Phytopathology 73:1581-1587.
14. Cabrera, M.G.; Álvarez, R.E.; Sosa de Castro, N.T. & A. Sosa López. 2004. Patógenos de *Chrysanthemum* sp. en cultivos de las provincias de Corrientes y Chaco, Argentina. En: Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas SGCYT, UNNE. A-028.
15. Camargo Ricalde, S.L.; García García, V. & R.M. Muciño Mares. 2000. ¿Qué es la Fitopatología? Hongos fitopatógenos del crisantemo [*Dendhrathema morifolium* (Ramat) Tzvelev. ContactoS 37 : 9-22.
16. Carbone, F. 2007. Brotes de exportación. www.lanacion.com.ar. Diario La Nación. Buenos Aires, Argentina. (Consultado: febrero de 2017).
17. Cavallini, G; D'Ercole, N. & G. Passerini. 1992, *Alternaria* and *Fusarium*: two adverse diseases of chrysanthemum (*Chrysanthemum indicum*). Informato Agrario 48(31): 48-50.
18. Chase, A.R. 1997. Foliage Plant Disease: Diagnosis and Control. The American Phytopathological Society. APS Press, St. Paul, MN, USA.
19. Commonwealth Mycological Institute. 1986. Manual para patólogos vegetales. Trad. de la 2a. ed. inglesa, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Santiago, Chile. Pedro G. Aguilar F. 438 pp.
20. Cório Da Luz, W. & C.A. Inácio. 2009. Micología Avanzada. Volume IIA. Taxonomía de Ascomicetos. RAPP. Revisão Anual de Patología de Plantas. Passo Fundo, R S. Brasil. 400 pp.
21. Cório Da Luz, W. 2010. Micología Avanzada. Volume II B. Taxonomía de Ascomicetos. RAPP. Revisão Anual de Patología de Plantas. Passo Fundo, R S. Brasil. 400 pp.

22. Cório, Da Luz, W. 2011. Micología Avanzada. Volume III A. Taxonomía de Hongos Anamórficos-I. Hifomicetos. RAPP. Revisão Anual de Patología de Plantas. Passo Fundo, R S. Brasil. 400 pp.
23. Coteró, G.H.M. 2015. Comunicación personal. Asesor y representante comercial y legal de Preesman Roses Breeding Co. En: Problemas fitosanitarios del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzevelev) var. polaris en el Municipio de Villa Guerrero, estado de México.
24. Culp, T.W. & C.A. Thomas. 1964. *Alternaria* and *Corynespora* blights of sesame in Mississippi. Plant Disease Report. 48:608-609.
25. Cumes Mantanico, S.Y. 2008. Etiología, incidencia, severidad y distribución del tizón de crisantemo, en San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Tesis.
26. Divyajyothi, U.; Suresh D.E.; Narayanswamy H.; Arayanaswamy P; Ravindra, H. & K.M. Satish. 2018. Evaluation of new fungicides molecules against leaf blight of *Chrysanthemum* caused by *Alternaria* spp. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 7(7):3884-3890.
27. Domínguez García-Tejero, F. 1993. Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. 9ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 821 pp.
28. Domínguez-Serrano, R.E. 2016. Primer informe de la mancha foliar por *Chrysanthemum morifolium* causada por especies de *Alternaria* en México. Plant disease. 100(3).
29. Dube J.P.; Truter, M. & J.E. Van der Waals. 2014. First report of resistance to QoI Fungicides in *Alternaria alternata* isolates from potato in South Africa. Plant Disease Notes 98(10):1431.
30. Edgington, L.V.; Khewn, K.L. & G.L. Barron. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. Phytopathology 61:42-44.
31. Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 608 p.
32. Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute Cab, Kew, Surrey, England. 507 p.
33. Ellis, M.B. & Everh. 1982. *Macrosporium longipes*. J. Mycol. 7: 134.
34. Ellis, M.B. 1998. *Alternaria chrysanthemi*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria (17): Sheet 164.
35. Fernández Valiela, M.V. 1978. Introducción a la Fitopatología. Tomo III. Volumen III. Hongos. INTA. 779 p.
36. FRAC CodeList ©*2013. Disponible en <http://www.frac.info>
37. FRAC CodeList ©*2018: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering) Fungicide Resistance Action Comité (FRAC). Code List [OnLine] Disponible en <http://www.frac.info/docs/default-souce/publications/frac-code-list/frac-code-list-2018-Consultado el 10 de noviembre de 2018>.
38. Freitas-Astúa, J.; Caldari Jr. P.; & R. Giorria. 2005. Doenças das plantas ornamentais. Capítulo 60:523-539. En: Kimati, H., Amorin, L., Rezende, J. A., Benjamin Filho, A., Camargo, L.E.A. eds. Doenças das plantas cultivadas. 4ta. ed.
39. French, E.R. & T.T. Hebert. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. ICA, San José. Costa Rica. 289 p.
40. García Filgueira, S. & D. Di Stefano. 2002. Producción florícola. Panorama del Sector-Consejo Federal de Inversiones. <http://www.cfired.org.ar/Default.aspx?nId> (Consultado 13 de marzo de 2015).
41. Gastélum, R.F. & C.A. Gálvez-Figueroa. 2002. Control del Moho Negro, *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) en el fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) considerando unidades calor y variables ambientales para la aplicación de azoxystrobin en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 20(1):72-76.

42. Gherbawy, Y.A.M.H. 2005. Genetic variation among isolates of *Alternaria* spp. from select Egyptian crops. Archives of Phytopathology and Plant Protection 38 (2): 77-89.
43. Granitto, G. M. 2013. Manejo y Producción del crisantemo. Curso Producción de cultivos florícolas. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP 8p.http://datateca.unad.edu.co/contenidos/302568/Material_didactico_definitivo/lección_12.
44. Gullino, M.L. & A. Garibaldi. 1994. *Chrysanthemy* malatties. Colture Protette. Núm. 9.
45. Gunta Smith, B.; R. Rinaldi, & R. Noguera. 1992. Roya blanca del crisantemo en Venezuela. Fitopatología. Asociación Latinoamericana de Fitopatología. 27 (2): 90.
46. Guo, L.D.; Xu, L.; Zheng W. H. & K.D. Hyde 2004. Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS). Fungal Diversity 16: 53.
47. Hanlin, R.T. 1992. *Illustrated genera of Ascomycetes*. APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. vol.1. 263 p.
48. Horsfall, J.G. & B.E. Cowling. 1978. How plants suffer from disease. Plant Diseases. An Advanced Treatise. Academic Press. Nueva York. Inc. Vol. 3: 1-18.
49. Horsfall, J.G. & A.E. Dimond. 1959. Plant Pathology An Advanced Treatise. New Haven, Connecticut. USA. V. 1. The Diseased Plant. 674 pp.
50. Horst, K. & Nelson, P.E. 1997. Compendium of *Chrysanthemum* Diseases. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Mn, USA. 62 pp.
51. Hubballi, M; Sevugapperumal, N.; Thiruvengadam R.; Theerthagir A. & S. Samiyappan. 2010. Effect of environmental conditions on growth of *Alternaria alternata* causing leaf blight of noni. World Journal of Agricultural Sciences 6 (2): 171-177.
52. Infostat 2017. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
53. INTA-Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. 2012. Productos sanitarios útiles para viveristas. 2p.
54. INTEA (Innovaciones Tecnológicas Agropecuarias S.A.). 2003. Estudio sobre la caracterización de la producción florícola en la República Argentina. JICA (Agencia de Cooperación Internacional del Japón)-INTA. 87 pp.
55. Jarvis, W.R. 1992. Managing Diseases in Greenhouse Crops. APS. St. Paul, Minnesota. USA. 228 pp.
56. Kathe, L., Kramer, R, Budahn, H., Pillen, K, Rabenstein, F. & T. Nothanage. 2017. Characterisation of *Alternaria radicina* isolates and assessment of resistance in carrot (*Daucus carota* L.). Journal Für Kulturflanzen, 69 (9): 277-290.
57. Kopacki, M. & A. Wagner. 2003. Health status of garden mums (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) in Lublin Region. Sodininkyste-ir-Darzininkyste. 22(3): 83-90.
58. Kopacki, M.; Parafiniuk, S. & B. Skwarylo-Bednarz. 2018. Fungi colonizing chrysanthemums plants cultivated in the field in different protection systems. Fresenius Environmental Bulletin. 27(5): 2751-2760.
59. Kordalewska, M.; Brillowska-Dąbrowska, A.; Jagielski, T., & Dworecka-Kaszak, B. 2015. PCR and real-time PCR assays to detect fungi of *Alternaria alternata* species. Acta Biochimica Polonica 62(4):707-712.
60. Kranz, J.; Schmitterer, H. & W. Koch. 1982. Enfermedades, Plagas y Malezas de los cultivos tropicales. Ed. Verlag Paul Parey. Berlín. 722 p.
61. Lawrence, D.P.; Gannibal, P.B.; Peever, T.L. & B.M. Pryor. 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. The Mycological Society of America. Mycologia, 105(3):530–546.

62. Lim, T.K. 1980. Chemical control of mango anthracnose in Malaysia *in vitro* fungitoxicity of selected chemicals. *Pertanika* 3:5-9
63. Linares, O.H. 2005. El cultivo del crisantemo. Curso teórico-práctico. Disponible en [http:// es.scribd.com/doc/39832192/ Cultivo del Crisantemo](http://es.scribd.com/doc/39832192/Cultivo-del-Crisantemo).
64. Lovato Echeverría, A.D; Carmona M.A. & S.A. Gutiérrez. 2017. Sensibilidad *in vitro* de *Trichoconiella padwickii* a diversos principios activos usados como fungicidas en el cultivo del arroz. *Revista Argentina de Microbiología*. 49(1):70-74.
65. March G.J; Oddino, C. & A.D. Marinelli. 2010. Manejo de enfermedades de los cultivos según parámetros epidemiológicos. INTA-UNRC. 193 p.
66. Marchionatto, J.B. 1948. Tratado de fitopatología. Ediciones Librería del Colegio. Ed. Sudamericana. Buenos Aires. 537 pp.
67. Milholland, R.D. 1973. A leaf spot disease of highbush blueberry caused by *Alternaria tenuissima*. *Phytopathology* 63: 1395-1397.
68. Morisigue, D.E; Mata, D.A.; Facciuto, G.; & L. Bullrich. 2012. Floricultura. Pasado y presente de la Floricultura Argentina. Ed. INTA. 36 p.
69. Neergaard, P. 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Einar. Munksgaard, Publishers. Copenhagen. 560 pp.
70. Nees, 1816. *Syst. Pilze (Würzburg)* 72.
71. Odenapur, D. 2011. Investigations on *Chrysanthemum* leaf blight caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. Thesis for the Degree of Master of science (Agriculture) in Plant Pathology. Dharwad. India.
72. Palau, H. & M.I. Jatib. 2003. Restricciones institucionales, organizacionales y tecnológicas en la floricultura argentina y su impacto en el escenario comercial. En: L. Mascarini; F. Vilella; E. Wright. *Floricultura en la Argentina. Investigación y Tecnología de Producción*. Ed. Facultad Agronomía. UBA. 468 pp.
73. Palmucci, H.E. & Wright E.R. 1982. La roya blanca del crisantemo (*Puccinia horiana* Henn.). En: 2º Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Resúmenes. Buenos Aires. p. 5.
74. Pattanamahakul, P.S. 1999. Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent of dark leaf spot disease of *Brassica* species grown in Thailand. *Plant Pathology* 48:749-755.
75. Pérez Bocourt, Y.; Gómez Izaguirre, G.; González García, M.; Vaillant Flores D.; Ramos Ramos, E.; Palacios, A.; Pérez Miranda M. & J.E. Almandoz Parrado. 2011. Hongos patógenos en plantas ornamentales de importancia para Cuba. *Fitosanidad* 15(4):205-214.
76. Populer, C. 1978. Changes in host susceptibility with time. *Plant disease And Advance Treatise*. Vol 2. J: G. Horsfall and E. B Cowling, eds. Academic Press, New York: p 239-262.
77. Rao, V.G. 1964. The Fungus Genus *Alternaria* Nees. *In Bombay-Maharashtra-I*. Part of thesis submitted for the Ph. D. Degree (Agriculture) of the Poona University, India.
78. Rodríguez Navarro, J.A.; Zavaleta Mejía, E. & R. Alatorre Rosas. 1996. Epidemiología y manejo de la roya blanca *Puccinia horiana* en crisantemo. *Fitopatología*. 31(2):122 -132.
79. Rotem, J. 1998. The *genus Alternaria*: Biology, epidemiology and pathogenicity. 2nd ed. St. Paul: APS Press, 326 p.
80. Schmidt, 1958. A fungal leaf spot disease of *Chrysanthemum* caused by *Alternaria chrysanthemi* sp. nov. *Pflanzenchutz*. 21:13-20.
81. Schoch, C.; Keith, A.S; Huhndorfc, V.; Spougea, J. L.C.; Levesqueb, A.; Chenb, W. & Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Biodiversity (Mycology and Microbiology)*, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, 6241-6246.

82. Sen, S. & N. S. Pathania. 1997. Evaluation of *Chrysanthemum* cultivars against leaf spot disease. *Plant Disease Res.* 12(2):149-150.
83. Shamala G. & G.R. Janardhana. 2015. Prevalence and severity of leaf blight disease of *Chrysanthemum* in Southern regions of Karnataka and *in-vitro* fungicidal effect on *Alternaria alternata*. *International Journal of Life Sciences* 9(3):38-45.
84. Shimura, Y. & N.L. De Souza. 1993. Marchitez provocada por *Verticillium* en crisantemos variedad "Sheena". *Summa Phytopathologica* 23(3):25-29.
85. Simmons, E.G. 1992. *Alternaria* taxonomy: Current status, view-point, challenge. (In: J. Chelkowski, & A. Visconti (eds), *Alternaria* Biology. Plant Diseases and Metabolites Amsterdam: Elsevier Science Publishers) pp. 1-35
86. Simmons, E.G. 2007. *Alternaria*: An identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp. 84. Sobers, E.K. 1965. *Alternaria chrysanthemi* in Florida. *Florida State Horticultural Society*. 419-422.
87. Sobers, E. K. 1965. *Alternaria chrysanthemi*. In *Florida State Horticultural Society*, 78: 419-422.
88. Srinath, K.V. & M. Sarwar. 1965. *Alternaria* blight of pyrethrum. *Curr. Sci.*, 34:295.
89. Sun, X. & T.Y. Zhang. 2008. Morphological and molecular characterization of *Alternaria* isolates on fruits of *Pyrus bretschneideri* Rehd. "Ya Li". *Mycosystema* 27(1):105-117.
90. Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes Fungi imperfecti with perithecia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute. Kew. England, 696 p.
91. Taffarel, O. 2012. El cultivo del crisantemo. 5 p. (Comunicaciones secundarias). Thomma, B.P.H.J. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology* 4:225-236.
92. Tweedy, B.G. & D. Powell. 1963. The taxonomy of *Alternaria* and species of this genus reported on apples. *Bot. Rev.* 29(3):405-412.
93. Vázquez Guadamarrá, J.G.G. 2016. Problemas fitosanitarios del crisantemo (*Dendrathera grandiflora* Tzevelev), var. Polaris en el Municipio de Villa Guerrero, estado de México. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista.
94. Villanueva-Couoh, E.; Sánchez Briceño; M.A., Alejo, J.C.; Ruiz Sánchez, E.; & J.M. Tún Suárez. 2005. Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizón foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmons y Croisier) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) Kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(1):49-56.
95. Wolcan, S.; Lori, G. & C. Mónaco. 1999. *Fusarium moniliforme* en los cultivos de crisantemo y de fresa. *Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Resúmenes*. Jujuy. p. 20.
96. Wolcan, S.; Palmucci, H.; Cúndom, M.A. & P. Grego. 2012. Enfermedades de *Dendrathera x morifolium* (Ramat.) Tzevelev (crisantemo). En: *Atlas Fitopatológico Argentino*. Vol. 4 (4). Eds: Norne, S.F.; Docampo, D.M., Conci, L.R. y Wolcan, S. ISSN 1855-8974. Córdoba S. ISSN 1855-8974. Córdoba. Argentina. URL: <http://rian.inta.gov.ar/atlas/inicio.aspx#/ConsultaGeneral?Id=287>.
97. Woudenberg, J.H.C.; Groenewald, J.Z.; Binder, M. & P.W. Crous. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75:171-212.

Visitas a páginas web:

<http://www.infoagro.com/flores/flores/crisantemo.htm>

MycoBank 2015,

IndexFungorum 2015

(<http://www.ecuadorexporta.org>).

(<http://www.fungalbarcoding.org>)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

www.datateca.unad.edu.co Lección 12).

http://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/16537/mod_resource/content/4/GUIA/FORICULTURA/ARGENTINA/2013.pdf].

ANEXOS

Analisis estadísticos

Valores medios de conglomerados

<u>Conglomerado</u>	<u>Cepas</u>	<u>Largo</u>	<u>Ancho</u>	<u>Largo</u>	<u>N° Tabiques</u>	<u>N° Tabiques</u>	<u>N° Tabiques</u>
				<u>de Pico</u>	<u>Transversales</u>	<u>Longitudinales</u>	<u>Oblicuos</u>

1	1	25,44	8,02	5,28	3,74	0,65	0,68
1	3	19,50	7,60	2,20	3,43	0,43	0,50
1	4	18,89	8,26	2,45	3,25	0,85	0,35
1	6	13,83	5,86	4,38	3,06	0,19	0,13
1	9	13,56	5,71	4,05	2,80	0,00	0,30
1	10	13,83	5,86	4,38	3,06	0,19	0,13
1	11	16,52	7,79	2,71	3,50	0,83	0,47
1	12	17,29	7,21	2,78	3,35	0,35	0,35
1	13	12,39	6,65	2,17	2,50	0,15	0,00
1	15	14,56	7,47	2,80	3,20	0,60	0,27
1	17	13,27	6,78	2,33	2,67	0,52	0,38
1	18	16,27	7,73	4,73	3,67	1,00	0,67
2	16	16,98	8,23	2,98	0,06	0,63	0,13
3	2	15,84	7,20	13,10	3,00	0,71	0,85
4	5	33,47	10,92	6,67	4,97	1,53	0,33
5	7	23,63	7,50	2,80	4,60	0,77	0,17
5	8	24,92	7,98	3,31	4,47	0,10	0,00
5	14	24,18	7,57	2,86	4,86	1,18	0,09

Conidios

Análisis de componentes principales

Datos estandarizados

Casos leídos 401

Casos omitidos 1

Variables de clasificación

Cepas

Autovalores

Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum
1	3,09	0,62	0,62
2	0,88	0,18	0,80
3	0,70	0,14	0,93
4	0,24	0,05	0,98
5	0,08	0,02	1,00

Autovectores

Variables	e1	e2
largo total	0,52	-0,02
Ancho	0,50	-0,09
Nº tab Transv	0,38	-0,29
Nº tab long,	0,53	-0,13
Nº tab, Oblicuos	0,25	0,94

Medias de los grupos de conglomerados

Conglomerado	Largo	Ancho	Largo de Pico	N° tabiques transversales	N° tabiques longitudinales	N° tabiques oblicuos
1	19,16	7,61	3,18	3,66	0,73	0,38
2	16,98	8,23	2,98	0,06	0,63	0,13
3	15,84	7,20	13,10	3,00	0,71	0,85
4	33,47	10,92	6,67	4,97	1,53	0,33
5	13,17	5,83	3,68	2,78	0,09	0,16

Descripción morfológica de especies de *Alternaria* según diversos autores.

Autores	Especie de <i>Alternaria</i> - Características generales	N° de septos transversales	N° de septos longitudinales	N° de septos oblicuos	Largo x ancho de cuerpo
Ellis, 1971	<p><i>Alternaria alternata</i> Colonia usualmente negra o negra olivácea. Conidióforos solitarios o en pequeños grupos, simples o ramificados, algunas veces geniculados, pálido a medio oliváceo o marrón dorado, liso, arriba de 50µm de largo y de 3 a 6 µm de ancho. El conidio formado a lo largo, a menudo ramificado en cadenas, obclavados, obpiriformes, ovoides o elipsoides, a menudo con un corto, cónico o cilíndrico pico, liso o verrugoso.</p>	Más de 8	Varios	Varios	Largo: 20 a 63 µm (37 µm) x 9 a 18 µ (13 µm) Pico pálido de 2 a 5 µm
Arunkumar, 2008	<p>La colonia fue inicialmente blanco, algodonosa, con profuso micelio aéreo, el cual se va tornándose gris verdoso. Cuando la colonia envejece, se torna negra, sin micelio aéreo. Conidióforos cortos o largos, simples o ramificados de 76,2 a 227,6 µm de largo a 9,6 a 22,3 µm de ancho. Los conidióforos eran hialinos a castaño - dorado con 2 a 11 septos. Conidios típicamente muriformes, castaño oscuro, en largas cadenas. La mayoría de los conidios carecen de picos, pocos con pico corto y rudimentario de color castaño oscuro.</p>	6 a 7	0 a 3	-----	11,06--55,13 µm X 2,45 -6,53 µm
Odenapur, 2011	Idem Arunkumar 2008	Idem Arunkumar 2008	Idem Arunkumar 2008	Idem Arunkumar 2008.	Idem Arunkumar 2008
Ellis 1971	<p><i>Alternaria chrysanthemi = Teretispora leucanthemi</i> Colonia efusiva, vellosa, gris a castaña negruzca oscura, micelio sumergido en el sustrato Hifas ramificadas, hialinas, ramificadas, septadas, que van a un castaño- oliváceo pálido, de 4 -8 µm de diam. Conidióforos naciendo solitarios o en fascículos. De más de 6, derechos o flexuosos, cilíndricos, septados, de color oliváceo pálido a medio, o castaño dorado, liso, arriba de 100 µm de largo, de 6 a 11 de ancho. Conidios solitarios, naciendo a través de pequeños poros en las paredes de los conidióforos, rectos o muy ligeramente curvos, a menudo cilíndricos, algunas veces obclavados, constreñidos en los septos, hialinos a oliváceo-castaño o castaño dorado, liso.</p>	Con más de 9 a menudo constreñidos.	1 o más	-----	25 a 130 µm (70 µm) x 10 -26 (17) µm de ancho
Villanueva Couch, et al. 2005	<p><i>Alternaria chrysanthemi</i> Conidióforos y conidios oscuros, ovoides en cadenas cortas. El largo del conidióforo es de 25 a 84µm</p>	< 12 µm.	-----	-----	70 µm x 17 µm
Rotem, 1998	Largo del conidióforo de 25 a 84 µm. Largo del pico: 0.	< 12 µm.	-----	-----	25 -130 µm x 10-26 µm.

Sobers, 1965	Los conidióforos nacen simples o en fascículos de 2 a 5. Ellos son pálidos a castaño – oliváceo medio, erectos, multiseptados, raramente ramificado, de 0-3 geniculado con prominentes cicatrices en los poros, con ápices redondeados. Sus medidas son: 12-76 x 5.2-9.0. Los conidios son lisos, muy pálidos a castaño oliváceo medio principalmente cilíndrico a ligeramente obovado, derecho, ocasionalmente ligeramente curvo, con base redondeada y con prominente cicatriz en el poro, constreñidos en los septos, ápices redondeados y sin picos	5 a 17	0 a 6	-----	52-148 μm x 10 a 36 μm
Ellis, 1971	<i>Alternaria longipes</i> Colonia anfitigena. Conidióforos naciendo solitarios o en grupos, erectos, simples o ramificados, rectos o flexuosos, cilíndricos, septados de color castaño-oliváceo pálido, con más de 80 μm de largo, de 3 a 5 μm de ancho, con 1 a varias cicatrices conidiales. Conidios algunas veces solitarios, pero usualmente en cadenas, obclavados, rostrados, de color castaño pálido a medio, lisos o verrugosos. El pico es castaño pálido y es usualmente la tercera o la mitad del largo total del cuerpo del conidio, de 2 a 5 μm de ancho. y a menudo hinchado en el extremo.	3 a 7 usualmente 5 a 6	1 a varios	1 a varios	35 a 110 μm (69 μm) x 11 a 21 μm (14 μm). Largo del pico es un tercio o un medio de la longitud total del cuerpo
Simmons, 1992	Comprobó que las características observadas ocurren consistentemente en diferentes aislamientos de esta <i>Alternaria</i> en tabaco.	-----	-----	-----	-----
Rotem, 1998	Esta especie esporula más rápido que <i>Alternaria alternata</i> . Además el pico es morfológicamente diferente y produciendo conidios más pequeños en cultivos que en sustrato natural y tiene las paredes de los conidios un grosor diferente. Considera que <i>Alternaria longipes</i> es un patotipo de <i>A. alternata</i> en tabaco.	-----	-----	-----	-----
Woudenberg et al., 2013	Idem Ellis, (1971). Estos autores establecieron 24 secciones para el género <i>Alternaria</i> , y la especie <i>A. longipes</i> se ubica también a la sección <i>alternata</i>	Idem Ellis, 1971	Idem Ellis, 1971	Idem Ellis, 1971	Idem Ellis, 1971
Ellis 1971	<i>Alternaria tenuissima</i> Colonias grises, de micelio abundante, más elevado. Conidióforos: solitarios, simples o ramificados, rectos o flexuosos. Conidios: solitarios o en cortas cadenas, rectos o curvados, obclavados o con el cuerpo del conidio elipsoidal, adelgazándose gradualmente hacia el pico. El pico es usualmente es mas corto. Los conidios son ligeramente o no constreñidos en los septos. El pico, a veces septado asimétrico, Esa disposición da una ligera curvatura al conidio. El color de los conidios es castaño dorado, pálido a medio, lisos o verrugosos.	4 a 7	Varios	Varios	22 a 95 μm (54 μm) x 8-19 (13) μm . Elpico cuando está presente puede superar la mitad del largo del cuerpo del conidio

Milholland, 1973	Conidióforos castaño- amarillento, solitarios, lisos de 3-5 septos, con el ápice ligeramente hinchado, de 30 - 50 μm por 4-5 de ancho. Conidio ovoide, obclavado, o piriforme, muriformemente dividido	1 a 7	1 a 3	-----	15 a 55 μm (35) x 7 a 15 μm (10) μm . Los picos miden más de 15 μm x de 2-3) μm
Ellis 1971	<i>Alternaria radicina</i> Conidióforos simples o ramificados, rectos o flexuosos, cilíndricos, septados de color castaño pálido a medio o castaño oliváceo, liso, con una o varias cicatrices. Conidios solitarios o en cadenas, de forma muy variable, elipsoides, obclavados u obpiriformes, castaño oscuro, castaño medio o castaño oliváceo. Algunos con constricciones en los septos. Especie ubicua. Generalmente en Lamiaceae. Recordada desde Argentina y otros países por Simmons.	2 a 5	1 a varios	1 a varios	27-57 (38) μm x 9 a 27 (19) μm
Rotem, 1998	-----	3 a 7	-----	-----	15 a 51 μm x 9 - 27 μm (19) μm Largo total del conidio de 27 a 57 (38) μm
Kathe et al, 2017	La colonia en PDA, tiene color castaño, a verde oscuro oliváceo, chatas, de escaso crecimiento aéreos con márgenes irregulares que tiñe el medio de color amarillo oscuro tornándose rojizo en medio V 8. Los conidióforos erguidos, solitarios producen conidios apicales y solitarios por lo general. Los conidios son elipsoides u ovoides.	2 a 5	-----	-----	De 30 a 85 μm

Secuencias nucleotídicas en formato FASTA. (INBIOMIS)

>9-ITS 1

GGCTGGACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCG
TACT
TCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTA
TTGC
AATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCA
GTG
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGC
CTGT
TCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAG
CTTT
GCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCA
GCA
CAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAAC
TTTT GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAA

>9-ITS 4

GTTGAAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACTTG
TGC
TGCCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGC
AAA
GCTAGAGACAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCT
CGAA
CAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATG
ATTC
ACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATG
CCAG
AACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGAT
TGC
AATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACA
AGA
AGTACGCAAAAGACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGT
TCCA GCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTA

>9-Cóntigo consenso

TACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGG
GTTA
CAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGG
GTTT
GCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAAC
AAAT
TAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
CAG
CGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACG
CACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTAC
CCTC
AAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTA
AAG
TAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTAT

CAGC
 AAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAG
 GGAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAA

>17-ITS 1

GGACCTCTCGGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
 TTCT
 TGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGT AATTG
 CAAT
 CAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
 GGC
 ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGT
 GAA
 TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTG
 TTC
 GAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCT
 TTGC
 TGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTTCGGAGCGCAGC
 ACA
 AGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTT
 GAC CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAA

>17-ITS 4

GCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCA
 GCA
 AAGCTAGAGACAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACG
 CTCG
 AACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATT CGA
 TGA
 TTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGA
 TGCC
 AGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTG
 ATT
 GCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAA
 CAA
 GAAGTACGCAAAAAGACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGA
 GGTT
 CCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCCTACGGAA
 GA

>17-Cóntigo consenso

TCTTCGTAGGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCT
 GGA
 ACCTCTCGGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTACTT
 CTTG
 TTTCTTGGTGGGTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGT AATTGCA
 ATCA
 GCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGG
 CATC
 GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
 ATCA
 TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTC
 GAG
 CGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTG
 CTGG

**AGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACA
AGT
CGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGA
CCTC GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAA**