

Grajales, Lucas Ezequiel

Identificación de Ophiosphaerella spp. Causante de Spring Dead Spot en canchas de golf en la provincia de Buenos Aires y zonas aledañas

**Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria
Facultad de Ciencias Agrarias**

Este documento está disponible en la Biblioteca Digital de la Universidad Católica Argentina, repositorio institucional desarrollado por la Biblioteca Central "San Benito Abad". Su objetivo es difundir y preservar la producción intelectual de la Institución.

La Biblioteca posee la autorización del autor para su divulgación en línea.

Cómo citar el documento:

Grajales, L. E. 2015. Identificación de Ophiosphaerella spp. Causante de Spring Dead Spot en canchas de golf en la provincia de Buenos Aires y zonas aledañas [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en:
<http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/identificacion-ophiosphaerella-causante-spring.pdf> [Fecha de consulta:.....]

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA

Facultad de Ciencias Agrarias

Ingeniería en Producción Agropecuaria

*Identificación de Ophiosphaerella spp. causante de Spring
Dead Spot en canchas de golf en la provincia de Buenos
Aires y zonas aledañas*

**Trabajo Final de Graduación para optar por el título de:
Ingeniero en Producción Agropecuaria**

Autor: Grajales, Lucas Ezequiel

Director: Dr. Canegallo, Alejandro Luis

Co-Directora: Dra. Cantoro, Renata

Fecha: 23 de Noviembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Gracias a mi familia por éstos 23 años de esfuerzo perseverante para que hoy, su hijo pueda recibirse de ingeniero; porque si hoy estoy acá, es gracias a ellos. Mi esfuerzo fue secundario.

Gracias a mis abuelos, por regalarme los padres que todo hijo quiere tener.

Gracias a mi novia, por el simple hecho de estar al lado mío.

Gracias a mis amigos, que han estado al lado mío ya sea estudiando o simplemente, haciéndome compañía cuando lo necesitaba.

Gracias a mis maestros con o sin título, por enseñarme sobre fisiología vegetal o sobre cómo limpiar un tanque de agua.

Gracias a mis directores de tesina, por brindarme su tiempo.

Simplemente, gracias a todos mis seres queridos.

RESUMEN

Resumen

El golf es un deporte cada vez más difundido y su historia se remonta a la edad antigua en los países bajos (www.welcomeargentina.com/golf Septiembre, 2015). Hoy se puede mencionar a Estados Unidos como el país con mayor superficie designada a clubes de golf con más de 18.000 canchas. La Argentina, lejos de ocupar uno de los primeros lugares en el ranking mundial, tiene poco más de 300 clubes aunque, a nivel sudamericano, tiene más de la mitad de clubes del todo el subcontinente.

El césped utilizado en las canchas de golf tiene un papel estético y funcional, y entre las principales especies utilizadas, se encuentran *Cynodon dactylon* y sus híbridos interespecíficos (*C. dactylon* × *C. transvaalensis*) conocidos como pasto bermuda. Estas especies son altamente susceptibles a Spring Dead Spot (SDS), una enfermedad de alta severidad por producir la pudrición de raíces, rizomas y estolones, produciendo grandes pérdidas económicas directas e indirectas debido al costo del control químico (fungicidas) y pérdida de la capacidad funcional del césped, respectivamente. La particularidad de SDS es que la inoculación del patógeno se produce en otoño y los síntomas se manifiestan en primavera temprana, cuando la pudrición ya se encuentra avanzada.

Los tres patógenos causantes de SDS son *Ophiosphaerella herpotricha*, *O. narmari* y *O. korrae*, siendo muy difícil su identificación en cultivos in vitro, en parte, porque la producción de ascosporas es difícil de lograr siendo de carácter esencial su identificación para la realización de un manejo agronómico diferencial de acuerdo a la especie causante de SDS. En éste contexto, las técnicas de biología molecular resultan esenciales para una correcta diferenciación específica, y numerosos ensayos en hongos llevan al estudio de la región ITS (Internal Transcribed Spacer), que es un pequeño fragmento de ADN altamente variable. La región ITS puede estudiarse mediante la técnica denominada PCR (Polymerase Chain Reaction) que es de fácil adopción, teniendo en cuenta que los primers para *Ophiosphaerella* spp. se encuentran disponibles, y son de alta especificidad.

El objetivo general de éste trabajo fue determinar la variabilidad genética en las tres especies de hongos causantes de SDS, ya que para cada patógenos existe un manejo agronómico particular. Para la realización del trabajo, se procedió a la toma de muestras de pasto bermuda en aquellas regiones que presentaban síntomas de la enfermedad, se

estudiaron 21 clubes de golf ubicados en Buenos Aires y zonas aledañas. El procedimiento se basó en el aislamiento del agente causal, en la extracción ADN de los hongos y en la utilización de tres pares de primers específicos para estudiar la región ITS mediante la técnica PCR. Los resultados fueron contundentes, en 20 de los 21 clubes se encontró a *O. herpotricha* como causante de SDS, no encontrándose ningunas de las tres especies de *Ophiosphaerella* en las muestras extraídas en la localidad de Cayafate, provincia de Salta.

Palabras Clave: Pasto bermuda, Spring Dead Spot (SDS), Polymerase Chain Reaction (PCR), Internal Transcribed Spacer (ITS).

INDICE

Índice general

Agradecimientos	3
Resumen	5
Índice general	8
Índice de tablas	9
Índice de figuras	10
Introducción	12
Objetivo principal	16
Objetivos específicos	16
Hipótesis	16
Materiales y Métodos	18
Muestreo	18
Aislamiento del patógeno	18
Extracción de ADN	19
Amplificación por PCR	20
Gel y Electroforesis	20
Análisis estadístico	21
Resultados y discusión	23
Muestreo y aislamiento del patógeno	23
Extracción de ADN	27
PCR	31
Análisis estadístico	34
Conclusiones	36
Anexos	38

Bibliografía.....	42
-------------------	----

Índice de tablas

Tabla 1. Ubicación de los clubes de golf con sus respectivos cultivares, de donde se han extraído las muestras para la realización de la identificación del patógeno productivo de SDS.....	23
Tabla 2. Número de muestras en cada procedimiento del ensayo, distribuido por club de golf en estudio	26
Tabla 3. Cuantificación de ADN en NanoDrop 2000 en ng/ul. Además de la concentración, se indica la absorbancia a 260 nm, 280 nm, la relación 260/280 y 260/230.....	28
Tabla 4. Resumen de los resultados al par de primers de <i>O. herpotricha</i> , indicándose como “+” a las muestras que dieron positivo para ésta especie, “-“a aquellas muestras que no amplificaron con éstos primers y como “cont.” a aquellas muestras que resultaron contaminadas en el proceso de purificación.....	32
Tabla 5. Análisis estadístico (chi-cuadrado). El valor "observado" corresponde a las muestras que dieron positivo a cada especie, y el valor "esperado" a la cantidad de muestras que debieron dar positivo bajo la hipótesis nula.....	34
Tabla 6. Resumen de resultados obtenidos a partir del análisis de los geles de agarosa correspondientes a la figuras 10 y 11. Para las muestras 36, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 49, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 63, 65 y 69 no se cuenta con la imagen del gel de agarosa.	40

Índice de figuras

Figura 1. Síntomas de Spring Dead Spot, imagen extraída del trabajo de Dobrowolski y O'Brien, 1993.....	24
Figura 2. Muestras candidatas a poseer <i>Ophiosphaerella sp.</i> (Canegallo, 2007).....	24
Figura 3. Cultivos puros sospechosos de poseer <i>Ophiosphaerella sp.</i>	25
Figura 4. Preparación del caldo de hígado.	25
Figura 5. Instrumentos para la extracción de ADN.....	27
Figura 6. Confirmación de presencia de ADN en las muestras a través de electroforesis en gel de agarosa. El número en cada calle corresponde al identificador de la muestra.....	27
Figura 7. Productos de PCR evaluados a través de electroforesis en gel de agarosa para 7 de las muestras evaluadas. Los nombres de las calles identifican a las distintas muestras. La columna MK corresponde al marcador de peso molecular utilizado y el tamaño de las bandas (en pb) se indica al costado derecho de las mismas.	31
Figura 8. Productos de PCR amplificados con primers para <i>O. korrae</i> , evaluados a través de electroforesis en gel de agarosa. La columna Mk corresponde al marcador de peso molecular utilizado.	33
Figura 9. Productos de PCR amplificados con primers para <i>O. narmari</i> , evaluados a través de electroforesis en gel de agarosa. La columna Mk corresponde al marcador de peso molecular utilizado.	33
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR obtenidos con primers para <i>O. herpotricha</i> . Los números de muestras de indican en cada posición del gel y Mk corresponde al marcador de peso molecular utilizado. Los tamaños (en pb) de las bandas del marcador se indican a la derecha de las mismas.....	38
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR obtenidos con primers para <i>O. herpotricha</i> . Los números de muestras de indican en cada posición del gel y Mk corresponde al marcador de peso molecular utilizado. Los tamaños (en pb) de las bandas del marcador se indican a la derecha de las mismas.....	39

INTRODUCCIÓN

Introducción

Estados Unidos es el país con mayor superficie destinada a la construcción de campos de golf, representando el 54% de la superficie mundial asignada a tal fin, con sus casi 18.000 canchas. El segundo lugar lo ocupa Japón con casi 3.000 campos de golf que inciden en el 8% del total. Por su parte, Argentina se encuentra lejos de los primeros puestos, con un total de 300 campos de golf, pero dentro de Sudamérica, tiene casi la misma cantidad que la sumatoria de todos los países que la componen (www.golfdigest.com/america Julio, 2014). Más allá de su función estética o de esparcimiento, el uso de césped en estos establecimientos deportivos ha mostrado un gran desarrollo en los últimos años, lo que desencadenó aumentos significativos en la demanda de servicios y mantenimiento de éstos tapices (Lacasa *et al.*, 2006). En ese sentido, la relación entre cancha de golf y ciencias agrarias adquiere gran relevancia, como bien definió García y Jiménez (1997) “una cancha de golf es una finca agrícola de regadío en la que se cultiva una pradera y el ingreso económico que genera no es por la venta de los productos obtenidos, sino por el desarrollo del propio juego en sí”.

Dentro de los céspedes utilizados en canchas de golf en zonas de clima cálido y de transición, se destaca el pasto bermuda común (*Cynodon dactylon*) y los híbridos interespecíficos *C. dactylon* × *C. transvaalensis* (Villouta, 1996). En su trabajo, Calderón (1981) resalta la gran resistencia al calor y tolerancia a sequía y salinidad que posee el pasto bermuda así como también la particularidad que tiene esta especie de entrar en latencia en el período invernal y rebrotar a partir de los órganos de reserva comenzada la primavera. Además, el pasto bermuda requiere de su multiplicación vegetativa debido a los híbridos utilizados en los campos de golf no producen semillas viables. En la actualidad, los cultivares más utilizados de pasto bermuda son Tiflawn, Tifway, Tifgreen (Walker *et al.*, 2006).

Butler (2005) menciona que, Spring Dead Spot (SDS) es la enfermedad más importante y severa en pasto bermuda y es causada por tres especies diferentes del género *Ophiosphaerella*: *O. korrae* (J. C. Walker and A. M. Smith) Shoemaker y Babcock (sinónimo: *Leptosphaeria korrae* Walker y Smith), *O. herpotricha* (Fr.:Fr.) J. C. Walker, y *O. narmari* (J. C. Walker y A. M. Smith) Wetzell, Hulbert y Tisserat (sinónimo: *L. narmari*

Walker y Smith). La clasificación taxonómica de estas especies es la siguiente: Reino Eumycota, Phylum Ascomycota, Clase Dothidiomycetes, Subclase Pleosporomycete, Orden Pleosporales, Familia Phaenosphaeriaceae, y Genero *Ophiosphaerella*. (Tredway *et al.*, 2009). Spring Dead Spot fue reportada por primera vez en 1954 en el estado de Oklahoma, Estados Unidos (Wadsworth y Young, 1960). Hoy en día tiene amplia distribución, y se la ha observado, también en Argentina (Luc *et al.*, 2005).

La distribución de las tres especies de *Ophiosphaerella* fue reportada por Wetzel *et al.* (1999) en Kansas y Oklahoma (USA) donde encontró las tres especies que causan SDS siendo *O. herpotricha* la especie aislada con mayor frecuencia (Tisserat *et al.*, 2004; Wetzel *et al.*, 1999). En Georgia y Maryland *O. korrae* fue la única especie encontrada (Tisserat *et al.*, 1994a), así como en Carolina del Sur, Alabama, Virginia, West Virginia, Tennessee (Iriarte 2004) y Mississippi (Perry 2006). Por otro lado, en otros estudios en Carolina del Norte, dos de las tres especies, *O. korrae* y *O. herpotricha*, fueron identificadas (Butler 2005), siendo la primera la que se aisló con mayor frecuencia. En Argentina no se conoce la distribución del hongo y hay una necesidad de identificar las especies presentes del hongo.

Baird *et al.* (1998) y Caasi *et al.* (2010) indicaron la alta susceptibilidad de pasto bermuda a SDS en toda la vida del material vegetal, aunque no se observen en los primeros estadios de vida. La justificación de esta afirmación radica en que el período de colonización e infección es prolongado, por lo tanto, los síntomas son evidentes luego de varios meses de ocurrida la inoculación.

La fitopatología explica que la ocurrencia de una enfermedad requiere de 3 factores: patógeno infectivo, ambiente predisponente y organismo susceptible. La ecología de las tres especies de *Ophiosphaerella* causantes de SDS, indica que la infección ocurre cuando la temperatura del suelo ronda entre 10 y 20°C. Por lo tanto, con estas condiciones reinantes, sumadas a la presencia del patógeno en el suelo y el material vegetal sometido a bajas temperaturas, que provoca un estado de susceptibilidad debido a las pocas reservas de carbohidratos, se produce la enfermedad. La estación del año en donde conviven estos tres factores de la tríada ecológica es el otoño (McCarty y Lucas, 1989; Tredway *et al.*, 2009). Con el rebrote primaveral se producen áreas circulares de césped necrótico, de diámetro variable, dependiendo de la severidad de la enfermedad (Wadsworth y Young, 1960; Baird *et al.*, 1998; Caasi *et al.*, 2010). A nivel planta, Endo *et al.* (1985) observaron una

coloración oscura en raíces como consecuencia de la necrosis en tales órganos y Butler (2005) también halló necrosis en estolones y rizomas. Un estudio con *O. herpotricha* muestra que el hongo coloniza la raíz, crece radialmente alrededor del eje longitudinal con ramificaciones transversales (Caasi *et al.*, 2010). Las ramificaciones transversales del hongo, forman una red de hifas oscuras que penetran directamente en la epidermis, creciendo entre las células corticales tanto de raíces primarias como secundarias, produciendo una sustancia que ocluye las células xilemáticas (Crahay *et al.*, 1988). Baird *et al.* (1998) mencionaron que las prácticas agronómicas para disminuir la incidencia de esta enfermedad, se basan en evitar una fertilización excesiva con nitrógeno en la salida del verano, pero sí brindar una buena provisión de potasio, ya que el potasio aumenta la tolerancia al frío en pasto bermuda disminuyendo el desarrollo de *Ophiosphaerella* sp. (Tredway *et al.*, 2009). Por otra parte, se debe asegurar un buen drenaje y disminución de la compactación del suelo. En el caso de que la enfermedad esté presente en el sistema, Tredway *et al.* (2009), recomiendan la utilización de fungicidas como el tebuconazole (triazol) y fenarimol.

En lo referido a la identificación de la especie causante de SDS, estas especies son difíciles de diferenciar en cultivos *in vitro* en parte porque la producción de ascosporas (frutos sexuales) útiles para la identificación de todo Ascomycete (Tisserat *et al.*, 1994a) en dichos cultivos es muy difícil de lograr. Debido a la dificultad que presenta el diagnóstico certero de SDS a campo, las técnicas de biología molecular resultan esenciales para la detección de la enfermedad (Kaminski *et al.*, 2005). La identificación a través de técnicas de biología molecular se ha vuelto muy popular en los últimos años y muchos de los análisis llevados a cabo en hongos se enfocan en la región ITS (Internal Transcribed Spacer por su denominación en inglés) del ADN. La región ITS es un pequeño fragmento del ADN altamente variable, usado en muchos estudios filogenéticos porque es fácil de amplificar usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y porque muestra diferencias entre taxones muy cercanos (O'Donnell 1992). Esta región está delimitada por el gen 18S que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma y el gen 28S que codifica para la subunidad grande del ribosoma, siendo ambas regiones altamente conservadas y por ello utilizadas comúnmente para identificar taxones más altos.

En 1994a, Tisserat *et al.* en un estudio realizado en Kansas y Oklahoma (USA), desarrollaron los primers especie-específicos OKITS1, OKITS2 , OHITS1, y OHITS2 para amplificar la región ITS, a través de PCR y lograr así la identificación de *O. korrae* y *O. herpotricha*, respectivamente. En 1999b, Wetzel *et al.* reportaron la presencia de *O. narmari* en Norte America, desarrollando los primers específicos OnITS1 y OnITS2. Las características de los cultivos aislados eran similares a las encontradas en Australia, a partir de lo cual se desarrollaron primers específicos para identificar esta especie.

La importancia de éste trabajo se centra en identificar al patógeno que produce SDS en pasto bermuda en Argentina y Uruguay, para tomar las medidas agronómicas pertinentes a cada patógeno (Tisserat y Fry, 1997) y disminuir las pérdidas económicas en los campos de golf (Walker, 2009).

Objetivo principal

El objetivo principal de éste trabajo fue utilizar de técnicas de biología molecular para determinar cuál es la especie predominante que produce Spring Dead Spot de pasto bermuda en canchas de golf en la provincia de Buenos Aires y otras regiones de Argentina y de la República Oriental del Uruguay.

Objetivos específicos

Los Objetivos específicos del correspondiente trabajo fueron:

1. Aislar el patógeno causante de SDS, en pasto bermuda común (*Cynodon dactylon*) e híbridos interespecíficos (*C. dactylon* x *C. transvaalensis*) en canchas de golf, de la provincia de Buenos Aires (Argentina) y de otras regiones del país y de la República Oriental del Uruguay.

2. Identificar, a través de técnicas de biología molecular, la o las especies del género *Ophiosphaerella* causantes de SDS presentes en las distintas canchas en las que se logró aislar el patógeno.

Hipótesis

En base a lo que se conoce en el mundo sobre de la distribución y frecuencia con la que se encuentran las tres especies de *Ophiosphaerella* causantes de SDS en pasto bermuda (*O. herpotricha*, *O. korrae*, *O. narmari*). Se planteó como hipótesis de trabajo, que la frecuencia en que aparecen las 3 especies, se distribuye equitativamente (33:33:33) en Buenos Aires, zonas aledañas en Argentina y República Oriental del Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

Muestreo

Para la toma de muestras se siguió la estrategia de investigaciones anteriores sobre el mismo patógeno (*Ophiosphaerella sp.*) realizadas en Kansas, Estados Unidos (Wetzel *et al.*, 1999a). Se seleccionaron clubes de golf de 21 localidades de Argentina y Uruguay de acuerdo a la aparición de síntomas de la enfermedad. En cada localidad se tomaron muestras de suelo al azar de manchas que presentaban síntomas característicos de SDS. Las muestras fueron de 12 cm de diámetro y 7 - 10 cm de profundidad.

Aislamiento del patógeno

Características del medio de cultivo: se utilizó un medio de cultivo especial para aislamiento de hongos del género *Ophiosphaerella* compuesto por 10 g L⁻¹ de agar papa glucosado (PDA), 11 g L⁻¹ de agar agar, y 100 ppm de cloranfenicol. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 1 atm por 20 minutos, lo que determinó una temperatura de 121°C aproximadamente. Luego de la esterilización en autoclave, cuando la temperatura del medio de cultivo descendió a menos de 50°C, se adicionó la de estreptomycin a 100 ppm, ya que es un antibiótico sensible al calor.

Preparación de material de estudio: Las muestras obtenidas en las distintas localidades fueron lavadas y se removió todo el suelo, seleccionando raíces con síntomas necróticos producto de la infección del patógeno. Luego se esterilizó la superficie de las raíces con una solución de cloro al 20 % por 5 minutos para eliminar los patógenos presentes en la superficie, se dejó secar en papel y se realizó la siembra en placa de Petri, con el medio de cultivo previamente descrito.

Teniendo en cuenta que el crecimiento del hongo es lento (Tredway *et al.*, 2009), luego de una semana se procedió a la purificación del cultivo, extrayendo el micelio de aquellos hongos que por su apariencia externa fueran sospechosos de pertenecer al género *Ophiosphaerella*. La purificación se realizó en un medio idéntico al descrito anteriormente. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente (22-26°C) por 7 días, las características morfológicas fotografiadas.

Para promover el crecimiento miceliar y así tener material suficiente para la extracción de ADN, se preparó una solución de caldo de hígado (35 g L^{-1}) sin adición de antibióticos. Éste medio de cultivo fue fraccionado en tubos de ensayo (50 ml) y posteriormente esterilizado en autoclave por 20 minutos. Luego se introdujo cuatro a cinco pequeñas porciones de cada muestra dentro de cada tubo de ensayo y se los dejó incubar a temperatura ambiente por 7 días.

Una pequeña esfera de micelio fue extraída de cada tubo usando una pipeta de 1 ml con la punta cortada para poder succionar el micelio fúngico, colocándolo en tubos de 1,5 ml. Luego el caldo arrastrado por la pipeta hacía el tubo de 1,5 ml, fue eliminado para que no interfiera en el proceso de extracción de ADN.

Extracción de ADN

La Extracción de ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Pontificia Universidad Católica Argentina. Se utilizó el protocolo propuesto por Tredway (2009), mediante la utilización del Easy DNA Kit, Invitrogen Corp., K1800-01. La única modificación al método fue que por ausencia de un “BeadBeater”, se realizó la ruptura manual del tejido con ayuda de un mortero. Luego de la extracción, se sembró una alícuota de 10 μL de ADN con 1,5 μL de ADN “loading dye” 6X en gel de agarosa al 1,2% preparado con 5 μL de Gel Red, en buffer TBE 0,5X, utilizando como marcador de peso molecular 5 μL de GeneRuler Ladder Mix, para corroborar la presencia de ADN en todas las muestras. Se cuantificó la concentración de ADN con un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) y a continuación se realizaron las diluciones necesarias para igualar las concentraciones de todas las muestras de ADN en 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Amplificación por PCR

Para la reacción de PCR se utilizaron primers específicos para cada especie: para *O. korrae* se utilizaron los primers OKITS1 y OKITS2 amplificando un fragmento de ADN con 454 pares de bases (Tisserat *et al.*, 1994a); para *O. herpotricha* se utilizaron los primers OHITS1 y OHITS2 que amplifican un fragmento de entre 400 y 500 pares de bases (Tisserat *et al.*, 1994a) y por último, para *O. narmari* se utilizó el par OnITS1 y OnITS2 cuyo producto es un fragmento de 468 pares de bases (Wetzel *et al.*, 1999). Se utilizó un volumen final de reacción de 15 μL , constituido por; 3 μL de Q Solution 5X, 1,5 μL de Buffer CL (Coral Load) 10X, 0,3 μL dNTP's (desoxinucleótidos trifosfato) 10 μM , 0,3 μL de cada "primer" (forward y reverse) 10 μM , 0,25 μL de enzima Taq polimerasa (Quiagen) 5 U/ μL y 1 μL de ADN.

El programa de PCR utilizado dependió de los "primers" utilizados. Para *O. korrae* y *O. herpotricha*, según Tisserat *et al.* (1994a) consistió en 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 5 minutos y 26 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, "annealing" a 58°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 1,5 minutos. En cambio para los "primers" de *O. narmari*, se utilizó el protocolo sugerido por Wetzel *et al.* (1999a): 1 ciclo de desnaturalización a 94° por 2 minutos, 16 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, "annealing" a 62°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 30 segundos, 15 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, "annealing" a 60°C por 25 segundos y elongación a 72°C por 1 minuto y por último 1 ciclo de elongación final a 72°C por 7 minutos.

Gel y Electroforesis

Una vez amplificados los fragmentos de ADN por PCR, se sembró una alícuota de 8 μL de producto de PCR con 1.5 μL de ADN "loading dye" (colorante de carga) 6X en gel de agarosa al 1,2% preparado con 5 μL de Gel Red, en buffer TBE (Tris, ácido bórico y EDTA) 0,5X, utilizando como marcador de peso molecular 5 μL de GeneRuler Ladder Mix (Fermentas). La electroforesis se realizó a 100 Volts durante 60 a 90 minutos en cuba para electroforesis Power pac basic, de Biorad.

La visualización de los geles se realizó en un transmisor de luz ultravioleta Foto/convertible (Fotodyne® Inc.), vinculado al software FOTO/Analyst® PC Image

(Fotodyne® Inc.), presente en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular, FCA; UCA.

Análisis estadístico

El estudio de la variabilidad genética se llevó a cabo mediante una prueba de bondad de ajuste por chi-cuadrado (χ^2) para la hipótesis planteada, de las bandas obtenidas con los tres pares de primers para las 115 muestras provenientes de 21 clubes de golf. Para el rechazo de la hipótesis nula (H_0), se consideró un p-valor menor a 0,05 con 2 grados de libertad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados y discusión

Muestreo y aislamiento del patógeno

El ensayo se realizó a partir de 225 recolecciones que dieron un total de 145 muestras extraídas de los 21 clubes en estudio. En la tabla 1 se observa la ubicación y cultivar de los clubes de donde se obtuvieron las muestras. Las muestras se tomaron de regiones de las canchas que presentaban síntomas característicos de SDS (Figura 1). El número de muestras tomadas por club se detalla en la tabla 2.

Tabla 1. Ubicación de los clubes de golf con sus respectivos cultivares, de donde se han extraído las muestras para la realización de la identificación del patógeno producente de SDS.

Club	Ubicación	Cultivar
Pilará	Pilar, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
Martindale Golf Club	Pilar, provincia de Buenos Aires	Tifdwarf - Tifway 419
Campo Chico Golf	Pilar, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
El Cantón Golf Country	Escobar, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
Club Náutico de San Isidro	San Isidro, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
Nordelta Golf Club	Tigre, provincia de Buenos Aires	TifSport
San Diego Country Club	Moreno, provincia de Buenos Aires	TifEagle
Estancia San Francisco	Lobos, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
Estancia San Eugenio	Lobos, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
Estancia Velay	Lobos, provincia de Buenos Aires	Sundevil
EDIN	General Rodríguez, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
El Relincho Golf Country	General Rodríguez, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
La Herradura	General Rodríguez, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
Everlinks Golf	Luján, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
La Colina Villa de Campo	ruta 6 y Río Luján, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
Costa Esmeralda Golf Club	Partido de la costa, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
Hurlingham Club	Hurlingham, provincia de Buenos Aires	Tifway 419
Jockey Club Córdoba	Ciudad de Córdoba, provincia de Córdoba	Tifway 419
Jockey Club Rosario Golf	Rosario, Provincia de Santa Fe	Tifway 419
Estancia Cafayate Golf Course	Ciudad de Salta, provincia de Salta	Tifway 419
Hotel Sheraton	Colonia del Sacramento, en la República Oriental del Uruguay	Tifway 419



Figura 1. Síntomas de Spring Dead Spot, imagen extraída del trabajo de Dobrowolski y O'Brien, 1993.

Con las muestras de raíces y estolones limpias (Figura 2) se procedió a la realización de los cultivos *in vitro*. Los cultivos puros se obtuvieron a partir de muestras miceliares provenientes de órganos infectados como estolones y raíces (Wetzel *et al.* 1999b).



Figura 2. Muestras candidatas a poseer *Ophiosphaerella* (Canegallo, 2007).

Debido a la ausencia de un flujo laminar, aun teniendo todos los recaudos de asepsia correspondientes, 15 muestras resultaron contaminadas en la etapa de cultivo de los hongos. Como resultado, de las 145 muestras iniciales sólo 130 muestras alcanzaron la etapa de extracción de ADN, Figura 3.



Figura 3. Cultivos puros sospechosos de poseer *Ophiosphaerella* sp.

A partir de los cultivos puros, se extrajo parte del crecimiento miceliar para su fortificación previo a la extracción de ADN, donde se incubó al hongo en un caldo de hígado a temperatura ambiente por 6 días. La ausencia de flujo laminar también dificultó este paso, habiéndose contaminado 15 muestras, por lo que la cantidad de muestras final disponibles para extracción de ADN fue de 115 (Figura 4).



Figura 4. Preparación del caldo de hígado.

El total de muestras para estudio molecular después de las pérdidas en cada etapa se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Número de muestras en cada procedimiento del ensayo, distribuido por club de golf en estudio.

<i>Club</i>	<i>Número de muestras total extraídas</i>	<i>Número de cultivos In Vitro</i>	<i>Número de muestras a extracción de ADN</i>
Pilará	25	22	20
Martindale Golf Club	10	7	5
Campo Chico Golf	10	9	9
El Cantón Golf Country	10	6	4
Club Náutico de San Isidro	10	3	1
Nordelta Golf Club	10	9	8
San Diego Country Club	10	9	8
Estancia San Francisco	10	5	2
Estancia San Eugenio	10	6	4
Estancia Velay	10	7	6
EDIN	10	6	4
El Relincho Golf Country	10	9	8
La Herradura	10	4	4
Everlinks Golf	10	5	3
La Colina Villa de Campo	10	6	5
Costa Esmeralda Golf Club	10	6	6
Hurlingham Club	10	5	3
Jockey Club Córdoba	10	2	1
Jockey Club Rosario Golf	10	7	5
Estancia Cafayate Golf Course	10	4	2
Hotel Sheraton	10	8	7
Total	225	145	115

Extracción de ADN

Se extrajo ADN de las 115 muestras resultantes de los cultivos en el Laboratorio de Biología Molecular de FCA, UCA (Figura 5).



Figura 5. Instrumentos para la extracción de ADN.

Mediante una corrida en gel de agarosa se confirmó la presencia de ADN en las 115 muestras. En la figura 6 se muestra parte del gel de agarosa visualizada en el transmisor de luz ultravioleta con el FOTO/Analyst ®.

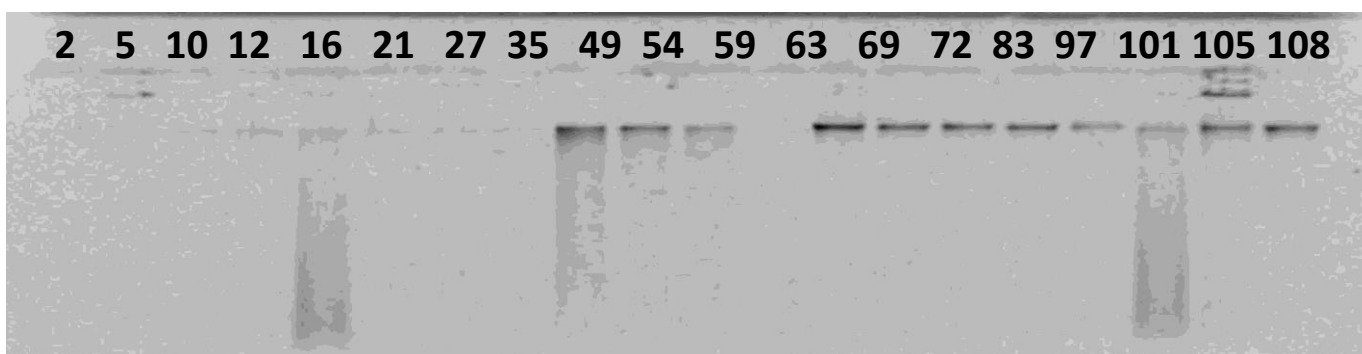


Figura 6. Confirmación de presencia de ADN en las muestras a través de electroforesis en gel de agarosa. El número en cada calle corresponde al identificador de la muestra.

Las concentraciones y calidad de ADN obtenido se muestran en la tabla 3. Usando estas concentraciones como base se realizaron las diluciones necesarias para igualar las concentraciones de todas las muestras de ADN en 40 ng/μL.

Tabla 3. Cuantificación de ADN en NanoDrop 2000 en ng/μl. Además de la concentración, se indica la absorbancia a 260 nm, 280 nm, la relación 260/280 y 260/230.

# Muestra	Concentración Ácido nucleico	Unidades	A260	A280	260/280	260/230
1	108,7	ng/μl	2,17	1,31	1,66	1,03
2	63,4	ng/μl	1,27	0,68	1,86	1,75
3	257,7	ng/μl	5,15	2,61	1,97	1,56
4	70,4	ng/μl	1,41	0,8	1,76	1,6
5	107	ng/μl	2,14	1,22	1,75	1,38
6	117,2	ng/μl	2,34	1,2	1,95	1,65
7	100,6	ng/μl	2,01	1,13	1,78	1,74
8	96,2	ng/μl	1,93	1,1	1,75	1,42
9	70,6	ng/μl	1,41	0,85	1,66	1,1
10	23,7	ng/μl	0,47	0,26	1,83	1,13
11	137	ng/μl	2,74	1,52	1,8	1,68
13	97,9	ng/μl	1,96	1,11	1,77	1,75
14	53,9	ng/μl	1,08	0,61	1,76	1,68
15	169,8	ng/μl	3,4	1,87	1,81	1,89
16	176,4	ng/μl	3,53	1,89	1,87	1,99
17	101,9	ng/μl	2,04	1,48	1,38	0,97
18	146,2	ng/μl	2,92	1,58	1,85	1,82
21	195,3	ng/μl	3,91	2,11	1,85	1,9
22	75,8	ng/μl	1,52	0,82	1,85	1,69
23	77,1	ng/μl	1,54	0,84	1,83	2,24
24	48,4	ng/μl	0,97	0,54	1,8	1,97
25	100,5	ng/μl	2,01	1,18	1,7	1,5
27	246,9	ng/μl	4,94	2,56	1,93	1,68
30	126,9	ng/μl	2,54	1,35	1,88	1,8
31	172,3	ng/μl	3,45	1,92	1,79	1,47
33	185,1	ng/μl	3,7	2,09	1,77	1,62
34	22,7	ng/μl	0,45	0,25	1,85	2,41
35	180,9	ng/μl	3,62	1,95	1,85	1,71
36	286,8	ng/μl	5,74	3,49	1,64	1,29
39	190,8	ng/μl	3,82	2,11	1,81	1,94
40	170,3	ng/μl	3,41	1,87	1,83	1,49
43	84,9	ng/μl	1,7	0,95	1,79	1,77
44	155,4	ng/μl	3,11	1,71	1,82	1,71
45	127,2	ng/μl	2,55	1,38	1,84	1,62
49	273,1	ng/μl	5,46	3,53	1,55	1,28
54	157,5	ng/μl	3,15	1,67	1,89	1,9
55	96,6	ng/μl	1,93	1,05	1,84	1,68

Tabla 3. Cuantificación de ADN en NanoDrop 2000 en ng/μl. Además de la concentración, se indica la absorbancia a 260 nm, 280 nm, la relación 260/280 y 260/230 (Continuación).

# Muestra	Concentración Ácido nucleico	Unidades	A260	A280	260/280	260/230
58	30,6	ng/μl	0,61	0,3	2,07	1,94
59	150,6	ng/μl	3,01	1,62	1,85	1,93
60	53,4	ng/μl	1,07	0,56	1,9	1,4
63	110,5	ng/μl	2,21	1,24	1,78	1,55
65	56,8	ng/μl	1,14	0,52	2,17	1,66
69	53,2	ng/μl	1,06	0,59	1,8	1,71
71	167,6	ng/μl	3,35	1,78	1,88	1,97
72	167	ng/μl	3,34	1,79	1,87	1,94
74	194,2	ng/μl	3,88	2,15	1,81	1,54
75	184,2	ng/μl	3,68	1,97	1,87	1,66
76	120,8	ng/μl	2,42	1,33	1,82	1,68
78	119,3	ng/μl	2,39	1,41	1,69	1,41
79	192,5	ng/μl	3,85	2,17	1,77	1,54
83	60,8	ng/μl	1,22	0,68	1,79	1,52
84	221,4	ng/μl	4,43	2,75	1,61	1,3
85	88,8	ng/μl	1,78	0,91	1,95	2,16
86	176,5	ng/μl	3,53	1,87	1,88	2,07
88	147,2	ng/μl	2,94	1,57	1,88	1,76
90	128	ng/μl	2,56	1,39	1,85	1,87
91	133,7	ng/μl	2,68	1,44	1,86	1,93
92	53,2	ng/μl	1,06	0,54	1,96	1,94
94	115,2	ng/μl	2,3	1,28	1,81	1,91
96	106,2	ng/μl	2,13	1,1	1,94	2,23
97	170,3	ng/μl	3,41	1,82	1,87	1,92
98	98,1	ng/μl	1,96	1,06	1,86	1,95
99	141,6	ng/μl	2,83	1,48	1,92	1,84
101	130,2	ng/μl	2,6	1,37	1,9	2,28
103	54,5	ng/μl	1,09	0,51	2,16	1,56
104	55,9	ng/μl	1,12	0,58	1,92	1,88
105	58,1	ng/μl	1,16	0,62	1,88	2,31
106	80,3	ng/μl	1,61	0,89	1,82	1,86
107	109,5	ng/μl	2,19	1,19	1,84	1,84
108	85	ng/μl	1,7	0,95	1,79	1,89
111	45	ng/μl	0,9	0,51	1,76	1,42
112	155,7	ng/μl	3,12	1,72	1,81	1,73
113	160,1	ng/μl	3,2	1,79	1,79	1,78
114	84,8	ng/μl	1,7	0,92	1,84	1,8
115	107,9	ng/μl	2,16	1,2	1,8	1,79
116	111,2	ng/μl	2,22	1,21	1,83	1,89
117	94,3	ng/μl	1,89	1,04	1,82	1,86
119	96,6	ng/μl	1,93	1,08	1,79	2,1

Tabla 3. Cuantificación de ADN en NanoDrop 2000 en ng/ul. Además de la concentración, se indica la absorbancia a 260 nm, 280 nm, la relación 260/280 y 260/230 (Continuación).

# Muestra	Concentración Ácido nucleico	Unidades	A260	A280	260/280	260/230
120	241,6	ng/μl	4,83	2,48	1,95	1,65
121	174,4	ng/μl	3,49	1,89	1,84	1,93
122	29,2	ng/μl	0,58	0,32	1,85	2,27
123	33,7	ng/μl	0,67	0,36	1,89	2,14
124	100,3	ng/μl	2,01	1,12	1,79	1,7
125	102,5	ng/μl	2,05	1,13	1,81	2,08
126	109,7	ng/μl	2,19	1,19	1,84	1,47
127	74,4	ng/μl	1,49	0,83	1,8	1,84
128	90	ng/μl	1,8	1,03	1,75	1,78
129	180,6	ng/μl	3,61	2,26	1,6	1,27
131	68	ng/μl	1,36	0,84	1,63	1,27
133	84,5	ng/μl	1,69	0,92	1,85	1,78
135	125,6	ng/μl	2,51	1,37	1,83	2,03
137	121,2	ng/μl	2,42	1,35	1,8	1,66
138	100,4	ng/μl	2,01	1,11	1,81	1,76
139	118,6	ng/μl	2,37	1,31	1,82	1,88
140	138,1	ng/μl	2,76	1,53	1,81	1,46
141	77,4	ng/μl	1,55	0,88	1,76	1,46
143	51,1	ng/μl	1,02	0,54	1,89	1,03
145	69,3	ng/μl	1,39	0,76	1,84	0,84

PCR

Las 115 muestras de ADN provenientes de los 21 clubes de golf fueron evaluadas con los tres pares de primers correspondientes a las tres especies de *Ophiosphaerella*. El resultado global fue que en 90 de las 115 muestras, los primers de *Ophiosphaerella herpotricha* dieron positivo. El resto de las muestras (25) que no mostraron amplificación, tampoco dieron positivo al *O. korrae* ni *O. narmari*. En la figura 7, se muestran a modo de ejemplo, algunas muestras que dieron positivo *herpotricha* tales primers. Para el estudio de la variación genética entre las poblaciones aisladas de *Ophiosphaerella herpotricha* es necesario abordar estudios más complejos que involucren la secuenciación de la región ITS (Tisserat *et al.*, 1994a).

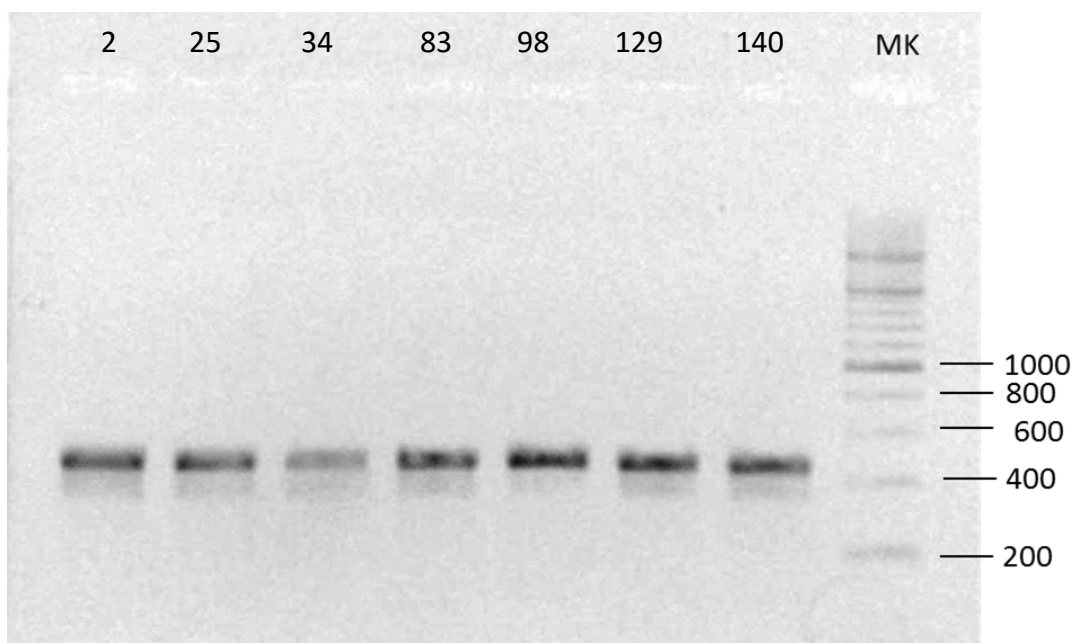


Figura 7. Productos de PCR evaluados a través de electroforesis en gel de agarosa para 7 de las muestras evaluadas. Los nombres de las calles identifican a las distintas muestras. La columna MK corresponde al marcador de peso molecular utilizado y el tamaño de las bandas (en pb) se indica al costado derecho de las

La tabla 4 muestra el resumen con la totalidad de las muestras evaluadas, observándose presencia de *O. herpotricha* en todas las localidades excepto en Cafayate, provincia de Salta. La foto del gel con la totalidad de las muestras que resultaron positivas para *O. herpotricha* se muestran en el Anexo.

Tabla 4. Resumen de los resultados al par de primers de *O. herpotricha*, indicándose como “+” a las muestras que dieron positivo para ésta especie, “-” a aquellas muestras que no amplificaron con éstos primers y como “cont.” a aquellas muestras que resultaron contaminadas en el proceso de purificación.

Pilará in	+/-	Pilará out	+/-	San Eugenio	+/-	Cafayate	+/-	La Colina	+/-	San Francisco	+/-	JCC	+/-	Nautico San Isidro	+/-	La Herradura	+/-	Everlinks	+/-	Martindale Fairfluys	+/-	Martindale greens	+/-
11	+	2	+	32	+	36	-	40	-	8	+	1	+	51	Cont.	54	+	58	-	3	+	4	+
12	+	18	+	33	+	37	Cont.	41	-	46	Cont.	50	Cont.	52	Cont.	55	-	59	+	63	+	68	Cont.
13	+	19	-	34	+	38	Cont.	42	Cont.	47	Cont.			53	+	56	-	60	-	64	Cont.	69	+
14	+	20	-	35	+	39	-	43	+	48	Cont.					57	-	61	Cont.	65	+	70	Cont.
15	+	21	+					44	-	49	+							62	Cont.	66	Cont.		
16	+	22	+					45	+											67	Cont.		
17	+	23	+																				
		24	+																				
		25	+																				
		26	Cont.																				
		27	+																				
		28	+																				
		29	Cont.																				
		30	+																				
		31	+																				
+	7	+	11	+	4	+	0	+	2	+	2	+	1	+	1	+	1	+	1	+	3	+	2
-	0	-	2	-	0	-	2	-	3	-	0	-	0	-	0	-	3	-	2	-	0	-	0
Cont.	0	Cont.	2	Cont.	0	Cont.	2	Cont.	1	Cont.	3	Cont.	1	Cont.	2	Cont.	0	Cont.	2	Cont.	3	Cont.	2
Nordelta	+/-	Sheraton	+/-	Costa Esmeralda	+/-	Campo Chico	+/-	Conf. CCH-CE	+/-	Hurlingham	+/-	EDIN	+/-	El Relincho	+/-	San Diego	+/-	Velay in	+/-	El Cantón	+/-	JCR	+/-
7	+	9	+	85	+	91	+	100	-	102	Cont.	106	+	5	+	10	-	6	+	133	+	139	+
71	+	78	-	86	+	92	+	101	+	103	+	107	+	112	+	119	+	126	-	134	Cont.	140	+
72	+	79	+	87	-	93	-			104	+	108	+	113	+	120	+	127	+	135	+	141	-
73	-	80	+	88	+	94	+			105	+	109	Cont.	114	+	121	+	128	+	136	Cont.	142	Cont.
74	-	81	-	89	Cont.	95	Cont.			110	Cont.			115	+	122	+	129	+	137	+	143	-
75	-	82	Cont.	90	+	96	+			111	+			116	+	123	+	130	Cont.	138	+	144	Cont.
76	+	83	+			97	+							117	+	124	+	131	+			145	+
77	+	84	+			98	+							118	+	125	+	132	Cont.				
						99	-																
+	5		5	4	6	1	3	4	8	7	5	4	3										
-	3		2	1	2	1	0	0	0	1	1	0	0										
Cont.	0		1	1	1	0	1	2	0	1	2	0	0										

Las 115 muestras resultaron negativas para las bandas de *O. korrae* y *O. narmari*. En la figura 8 y 9, se observan a modo de ejemplo algunas de las muestras negativas a *O. korrae* y *O. narmari*, respectivamente, faltando en ambos casos la presencia de un testigo positivo para descartar fallas en el proceso de PCR. Los resultados han sido tomados como negativos, apoyándose auxiliarmente en la comparación morfológica de los cultivos puros (Luc *et al.*, 2005).



Figura 8. Productos de PCR amplificados con primers para *O. korrae*, evaluados a través de electroforesis en gel de agarosa. La columna Mk corresponde al marcador de peso molecular utilizado.

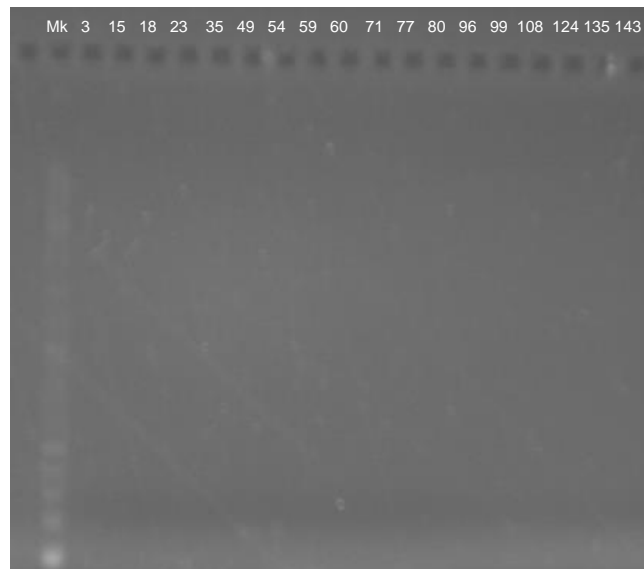


Figura 9. Productos de PCR amplificados con primers para *O. narmari*, evaluados a través de electroforesis en gel de agarosa. La columna Mk corresponde al marcador de peso molecular utilizado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de bondad de ajuste (χ^2) para la hipótesis 33:33:33. Se obtuvo un valor estadísticamente significativo (p-valor<0,0001) para rechazar la hipótesis nula (Tabla 5). Este resultado indica que la frecuencia de aparición de cada una de las especies causantes de SDS es distinta a la esperada en base a conocimientos de otras regiones, encontrándose sólo la especie *O. herpotricha* en las muestras radiculares de pasto bermuda extraídas de los campos de golf estudiados.

Tabla 5. Análisis estadístico (chi-cuadrado). El valor "observado" corresponde a las muestras que dieron positivo a cada especie, y el valor "esperado" a la cantidad de muestras que debieron dar positivo bajo la hipótesis nula.

	<i>O. herpotricha</i>	<i>O. korrae</i>	<i>O. narmari</i>
Observado	90	0	0
Esperado	38	38	38
(O_i-E_i)²	2704	1444	1444
[(O_i-E_i)²/E_i]	71,16	38	38
χ^2	147		
χ^2 crítico	5,99		

CONCLUSIONES

Conclusiones

En este trabajo se identificó a la especie *Ophiosphaerella herpotricha* como causante de SDS en *Cynodon dactylon* y sus híbridos específicos en 20 de los 21 clubes de golf evaluados en Buenos Aires, zonas aledañas y en el único club estudiado en Colonia del Sacramento, República Oriental del Uruguay. La distribución de este patógeno en Argentina es más simple que la reportada por Wetzell *et al.* (1999) en Kansas y Oklahoma (USA); por Tisserat *et al.* (1994a) en Georgia y Maryland; por Iriarte *et al.* (2004) en Carolina del Sur, Alabama, Virginia, West Virginia, Tennessee; por Perry *et al.* (2006) en Mississippi (Perry *et al.*, 2006); y por Butler (2005) en Carolina del Norte.

Estudios más avanzados mediante la secuenciación de la región ITS y comparación de las mismas son necesarios para inferir las similitudes o diferencias entre las aislaciones dentro de la población de *Ophiosphaerella herpotricha* aislada en Argentina.

ANEXOS

Anexos

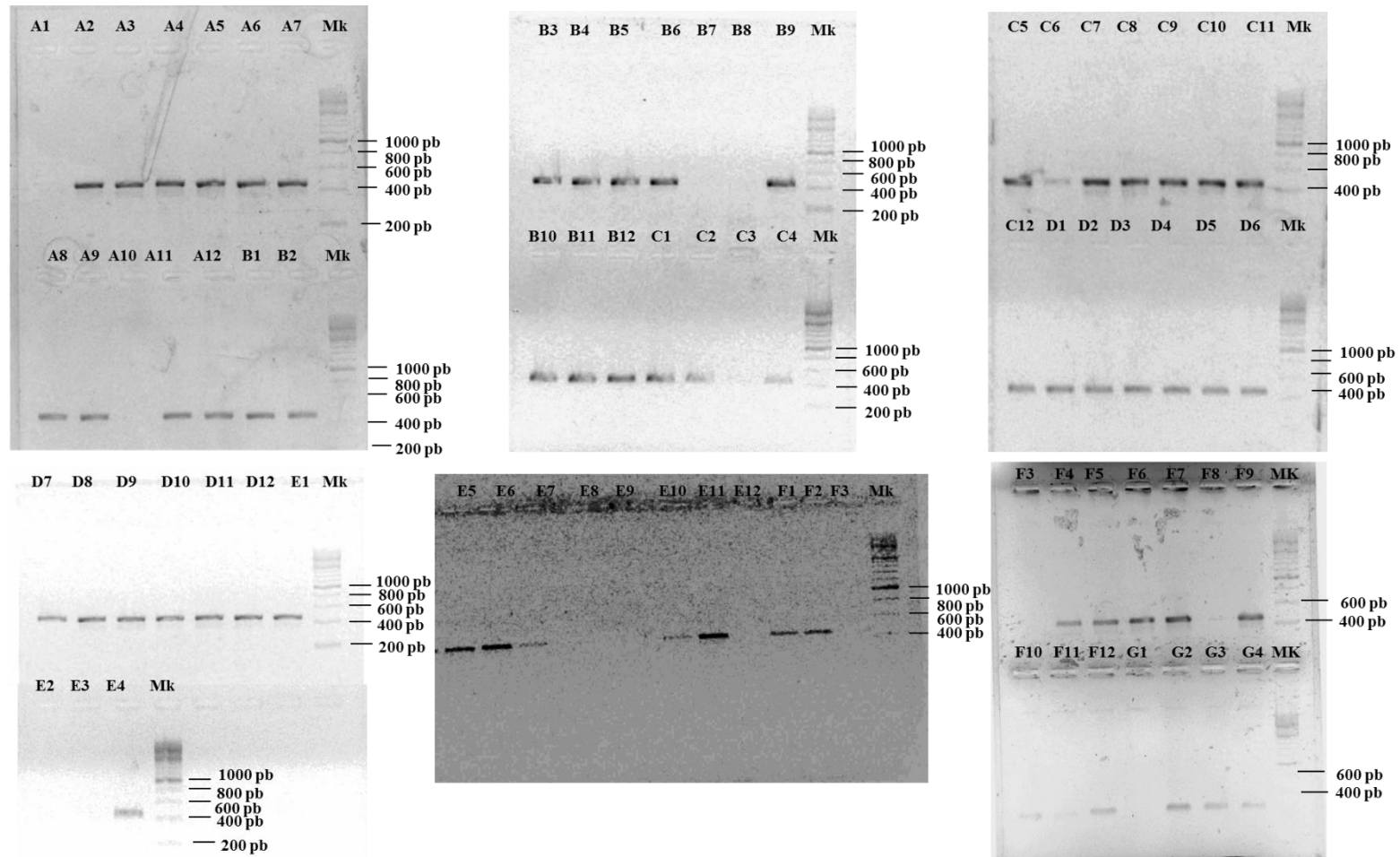


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR obtenidos con primers para *O. herpotricha*. Los números de muestras de indican en cada posición del gel y Mk corresponde al marcador de peso molecular utilizado. Los tamaños (en pb) de las bandas del marcador se indican a la derecha de las mismas.

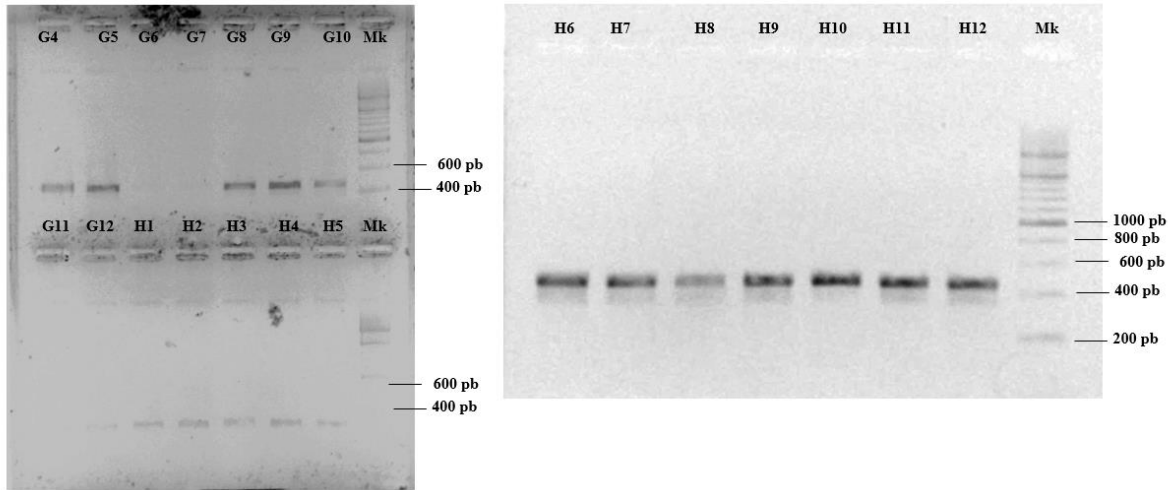


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR obtenidos con primers para *O. herpotricha*. Los números de muestras de indican en cada posición del gel y Mk corresponde al marcador de peso molecular utilizado. Los tamaños (en pb) de las bandas del marcador se indican a la derecha de las mismas.

Tabla 6. Resumen de resultados obtenidos a partir del análisis de los geles de agarosa correspondientes a la figuras 10 y 11. Para las muestras 36, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 49, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 63, 65 y 69 no se cuenta con la imagen del gel de agarosa.

	A	Resultado	B	Resultado	C	Resultado	D	Resultado	E	Resultado	F	Resultado	G	Resultado	H	Resultado
1	1		13	+	25	+	124	+	140	+	79	+	93		107	+
2	2	+	14	+	27	+	125	+	141		80	+	94	+	108	+
3	3	+	15	+	28	+	126	+	143		81		96	+	111	+
4	4	+	16	+	30	+	127	+	145	+	83	+	97	+	112	+
5	5	+	17	+	31	+	128	+	71	+	84	+	98	+	113	+
6	6	+	18	+	32	+	129	+	72	+	85	+	99		114	+
7	7	+	19		33	+	131	+	73		86	+	100		115	+
8	8	+	20		34	+	133	+	74		87		101	+	116	+
9	9	+	21	+	35	+	135	+	75		88	+	103	+	117	+
10	10		22	+	121	+	137	+	76	+	90	+	104	+	118	+
11	11	+	23	+	122	+	138	+	77	+	91	+	105	+	119	+
12	12	+	24	+	123	+	139	+	78		92	+	106	+	120	+

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Baird, J. H., Martin, D. L., Taliaferro, C. M., Payton, M. E., & Tisserat, N. A. (1998). Bermudagrass resistance to spring dead spot caused by *Ophiosphaerella herpotricha*. *Plant disease*, 82(7), 771-774.

Butler, E. L. (2005). Development of Novel Strategies for Control of Spring Dead Spot in Bermudagrass.

Caasi, O. C., Walker, N. R., Marek, S. M., Enis, J. N., & Mitchell, T. K. (2010). Infection and colonization of turf-type bermudagrass by *Ophiosphaerella herpotricha* expressing green or red fluorescent proteins. *Phytopathology*, 100(5), 415-423.

Calderón, J. M. (1981). Los céspedes deportivos. *Informes de la Construcción*, 33(333-334-335-336), 91-99.

Crahay, J. N., Dernoeden, P. H., & O'Neill, N. R. (1988). Growth and pathogenicity of *Leptosphaeria korrae* in bermudagrass. *Plant disease (USA)*.

Dobrowolski, M. P., & O'Brien, P. A. (1993). Use of RAPD-PCR to isolate a species specific DNA probe for *Phytophthora cinnamomi*. *FEMS microbiology letters*, 113(1), 43-47.

Endo, R. M., Ohr, H. D., & Krausman, E. M. (1985). *Leptosphaeria korrae*, a cause of the spring dead spot disease of bermudagrass in California. *Plant disease*, 69, 235-237.

García-Verdugo Rodríguez, J. C., & Monje Jiménez, R. J. (1997). Céspedes en campos de golf. Su mantenimiento y otras consideraciones. *Colección Informaciones Técnicas*, 47, 97.

Iriarte, F. B., Wetzel III, H. C., Fry, J. D., Martin, D. L., & Tisserat, N. A. (2004). Genetic diversity and aggressiveness of *Ophiosphaerella korrae*, a cause of spring dead spot of bermudagrass. *Plant disease*, 88(12), 1341-1346.

Kaminski, J. E., Dernoeden, P. H., Mischke, S., & O'Neill, N. R. (2006). Genetic diversity among *Ophiosphaerella agrostis* strains causing dead spot in creeping bentgrass. *Plant disease*, 90(2), 146-154.

Kaminski, J. E., Dernoeden, P. H., O'Neill, N. R., & Wetzel III, H. C. (2005). A PCR-based method for the detection of *Ophiosphaerella agrostis* in creeping bentgrass. *Plant disease*, 89(9), 980-985.

Lacasa, M., Benva, M., Clement, J., & Wright, E. R. (2006). Enfermedades de los céspedes en la Argentina. In Congreso Argentino de Floricultura. 3. Jornadas Nacionales de Floricultura. 8. 2006 11 07-10, 7-10 de noviembre de 2006. La Plata, Buenos Aires. AR.

Luc, J. E., Canegallo, A., & Martin, B. (2005). Spring dead spot in bermudagrass greens in Argentina and South Carolina. *Golf Course Management*, 73, 92-95.

Martin, S. B., Jeffers, S. N., & Rogers, A. (2001). Isolation frequency and pathogenicity of *Rhizoctonia* species from tall fescue crown and leaf tissues from two locations in South Carolina. *International Turfgrass Society Research Journal*, 9, 689-694.

McCarty, L. B., & Lucas, L. T. (1989). *Gaeumannomyces graminis* associated with spring dead spot of bermudagrass in the southeastern United States. *Plant disease*, 73(8), 659-661.

O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current genetics*, 22(3), 213-220.

Perry, D. H., Tomaso-Peterson, M., & Munshaw, G. (2006). Frequency of occurrence of *Ophiosphaerella korrae* on 'Tifway' bermudagrass roots in Mississippi. In *Phytopathology* (Vol. 96, No. 6, pp. S92-S92).

Tisserat, N. A., & Fry, J. (1997). Cultural practices to reduce spring dead spot (*Ophiosphaerella herpotricha*) severity in *Cynodon dactylon*. *Int. Turf. Soc. Res. J*, 8, 931-936.

Tisserat, N. A., Hulbert, S. H., & Sauer, K. M. (1994). Selective amplification of rDNA internal transcribed spacer regions to detect *Ophiosphaerella korrae* and *O. herpotricha*. *Phytopathology* 84, 478-482.

Tredway, L. P., Tomaso-Peterson, M., Perry, H., & Walker, N. R. (2009). Spring dead spot of bermudagrass: A challenge for researchers and turfgrass managers. *Plant Health Progress, Online. APSnet Features. doi, 10.*

Villouta, B. (1996). Chemical control of Paspalum (*Paspalum dilatatum*) on bermudagrass.

Wadsworth, D. F., & Young Jr, H. C. (1960). Spring Dead Spots of Bermudagrass. *USGA Journal and Turf Management*. November, 25-27.

Walker, N. R. (2009). Influence of fungicide application timings on the management of bermudagrass spring dead spot caused by *Ophiosphaerella herpotricha*. *Plant Disease*, 93(12), 1341-1345.

Walker, N. R., Mitchell, T. K., Morton, A. N., & Marek, S. M. (2006). Influence of temperature and time of year on colonization of bermudagrass roots by *Ophiosphaerella herpotricha*. *Plant disease*, 90(10), 1326-1330.

Wetzel III, H. C., Hulbert, S. H., & Tisserat, N. A. (1999a). Molecular evidence for the presence of *Ophiosphaerella narmari*, a cause of spring dead spot of Bermuda grass, in North America. *Mycological research*, 103(8), 981-989.

Wetzel, H. C., III, Skinner, D. Z., and Tisserat, N. A. (1999b). Geographic distribution and genetic diversity of three *Ophiosphaerella* species that cause spring dead spot of bermudagrass.

www.welcomeargentina.com/golf

www.golfdigest.com/america