

Trabajo completo

Ensayos *in vitro* de fungicidas frente a aislamientos regionales de los hongos fitopatógenos *Cercospora kikuchii* y *Cercospora sojina*

RECIBIDO: 25/07/2012

ACEPTADO: 18/09/2012

Peretti, L.* • Bracho, G.* • Argaraña, MF.* • González, AM.* • Vaira, S.** • Pioli, R.*** • Lurá, MC.*¹

*Cátedra de Microbiología General

**Dpto. de Matemática

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo, Santa Fe, Argentina

***Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Zavalla, Argentina.

¹María Cristina Lurá, Domingo Silva 1980 (3000) Santa Fe, Argentina
Teléfono.: (0342)-4537227. E-mail: mclura@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: La soja constituye una de las principales fuentes de ingreso en Argentina. *Cercospora kikuchii* y *Cercospora sojina* son dos fitopatógenos que afectan su cultivo y disminuyen su rendimiento. La aplicación de fungicidas es una de las estrategias para evitar estas pérdidas económicas. En Argentina, se ha estudiado la sensibilidad a los antifúngicos "a campo", pero no se encuentran reportes de estudios *in vitro*, por lo que se consideró importante monitorear la evolución de la sensibilidad a los fungicidas de estos hongos, determinando la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Se trabajó con diez aislamientos regionales (5 de cada especie) y las cepas de referencia *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 y *Cercospora sojina* NBRC 6715. Se ensayaron 5 productos de origen comercial. Para la

CIM se aplicó la técnica de macrodilución en caldo. Al evaluar los resultados se detectaron sensibilidades diferentes entre los aislamientos de ambas especies de *Cercospora* para todos los aislamientos estudiados. **PALABRAS**

CLAVES: *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, Compuestos fungicidas, Susceptibilidad *in vitro*.

SUMMARY: *In vitro activity of fungicides against regional phytopathogenic fungi Cercospora kikuchii and Cercospora sojina isolates.*

Soya is one of the main sources of income in Argentina. *Cercospora kikuchii* and *C. sojina* are two plant pathogens that affect cultivation decreasing performance. The application of fungicides is one of the strategies to avoid these

economic losses. In Argentina, antifungal sensitivity has been studied but there are no reports of *in vitro* studies. Therefore, we considered it important to monitor the evolution of the fungicide sensitivity of these fungi, by determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Ten regional isolates (5 of each species) and reference strains *Cercospora kikuchii* NBRC 6711

and *Cercospora sojina* NBRC 6715 were studied. Five commercial products were assayed. The macrodilution in broth technique was applied. Results showed different sensitivities among both *Cercospora* species for almost all the isolates studied.

KEYWORDS: *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, Fungicide compounds, *in vitro* Susceptibility.

Introducción

La provincia de Santa Fe es una de las principales productoras de soja (*Glycine max* L. Merr.) del país. Su siembra se ha incrementado año tras año y ha desplazado a cultivos tradicionales característicos de la zona. Las condiciones climáticas de la región no sólo permiten el desarrollo de esta leguminosa, sino también la aparición de enfermedades, entre las que se encuentran la Mancha Ojo de Rana (producida por *Cercospora sojina* Hara) y el Tizón de la Hoja y la Mancha Púrpura de la semilla [ocasionada por *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) M. W. Gardner], siendo esta última una de las que se conocen como Enfermedades de Fin de Ciclo (EFC) (1, 2). Estas enfermedades afectan la producción del cultivo al reducir el área fotosintética, provocan senescencia foliar prematura, pérdida de fotoasimilados, destrucción de tejidos, reducción de la turgencia y pérdida de la calidad en las semillas, lo cual ocasiona la maduración precoz de la planta y una importante disminución en el valor nutricional de las mismas (3 - 5).

Debido a las condiciones climáticas imperantes en la zona centro de la provincia de Santa Fe (25-28°C de temperatura, humedad relativa alta y precipitaciones abundantes), *C. kikuchii* fue la especie prevalente en la soja hasta hace muy pocos años. Por el

contrario, los hallazgos de *C. sojina* eran esporádicos, debido a que requiere para su desarrollo temperaturas más elevadas (28-30°C). Sin embargo, durante la campaña 2008/09 se registraron incidencias del 100% de este fitopatógeno, principalmente en Córdoba y Santa Fe, y a partir del ciclo 2009/10 se diseminó por todas las regiones sojeras de Argentina, incluyendo a las provincias de La Pampa y San Luis (6).

Ambos fitopatógenos sobreviven en los restos de plantas afectadas y en las semillas, lo que favorece su propagación y ha motivado que se ensayen e intensifiquen diferentes medidas para prevenir y/o controlar las patologías que producen. No obstante, diferentes autores han reportado el aumento en la severidad de ambas enfermedades (7 - 10).

El control químico es una de las medidas a adoptar para combatir enfermedades en las plantas (2, 3, 11). Existe en el mercado una gran diversidad de agroquímicos efectivos. Sin embargo, los efectos nocivos sobre el medio ambiente y la salud humana son inevitables, y se hace necesario analizar el balance riesgo-beneficio.

Los agroquímicos degradan el suelo y contaminan el aire, los cursos de agua superficiales y las napas subterráneas (1). Además, pueden dañar a los seres vivos,

entre los que se incluye el hombre (11 - 13), al punto tal que se responsabiliza al uso inadecuado de los plaguicidas de millones de casos de intoxicación aguda por año, de los que al menos un millón requiere hospitalización. La División de Productos Químicos de la UNEP (United Nations Environment Programme) considera "importante" el número de niños involucrados en estas situaciones (13). Pero más preocupantes aún son los efectos crónicos a bajas dosis, ya que muchas veces los contaminantes se van acumulando en el organismo. Esto dificulta establecer una relación directa causa-efecto; sin embargo, los datos muestran una mayor prevalencia de ciertas enfermedades en zonas donde se practica la agricultura y se aplican agroquímicos (1). Esta situación se ve agravada por el hecho de que en la gran mayoría de los casos los agroquímicos están constituidos por una combinación de varios compuestos (principio/s activo/s + aditivos + inertes, etc.). A su vez, dichas sustancias se encuentran en constantes interacciones a través del tiempo, por efecto de la temperatura o de la luz, y se van transformando en nuevas sustancias, distintas de las originales. Por otro lado, la aplicación de estos productos en ambientes previamente contaminados (fondo de contaminación) genera otro nuevo "cóctel" de sustancias químicas de composición indescifrable, lo que generalmente no es considerado por las autoridades encargadas del control y cumplimiento de la normativa vigente, los profesionales actuantes, ni por los productores (11, 14, 15).

Los fungicidas se utilizan para prevenir enfermedades vegetales. Si bien en principio se consideró que eran menos nocivos que otros agroquímicos, en la actualidad algunos de ellos, como por ejemplo los

carbamatos, se encuentran prohibidos en muchos países (1).

En el caso de las EFC algunos de los productos utilizados son benzimidazoles, imidazoles, triazoles y estrobirulinas (16). Los triazoles, solos o en combinación con estrobirulinas, han resultado efectivos para el control de las enfermedades foliares (4).

Frente al impacto que representa este complejo de hongos, se recomienda la aplicación combinada de un producto con acción curativa y uno con acción preventiva y buena residualidad.

Los triazoles ejercen un efecto curativo al detener el desarrollo del hongo, y una acción sistémica que alcanza a toda la planta.

Las estrobirulinas tienen movilidad más limitada. Dicha movilidad está relacionada con la fase vapor, ya que no se mueven por el sistema conductor de la planta, y por la acumulación en la capa cerosa del tejido foliar y posterior liberación gradual. Además presentan acción translaminar (14).

Mediante la combinación de ambos principios activos (estrobirulinas + triazoles), los que se complementan en su mecanismo de acción, es posible ampliar el espectro de control y reducir el riesgo de aparición de cepas resistentes.

En lo que respecta a *C. kikuchii*, Imazaki y col. (2006) detectaron, desde la década de los 90, algunas genovarietades con resistencia hacia compuestos benzimidazólicos (17).

En cuanto a *C. sojina*, diferentes autores reportaron no sólo resistencia a las estrobirulinas sino también a los fungicidas inhibidores de la quinona externa (Qol) (10, 18).

En Argentina se han llevado a cabo estudios de efectividad y sensibilidad a los antifúngicos "a campo" (3, 4, 11, 20 - 22),

pero no se han encontrado en la bibliografía reportes de estudios *in vitro*, por lo que se consideró importante monitorear la evolución de la sensibilidad a los fungicidas mediante ensayos de laboratorio.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica, mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de diferentes compuestos frente a aislamientos regionales de *C. kikuchii* y *C. sojina*, de manera de aportar datos que permitan un mejor conocimiento de dos de los fitopatógenos más frecuentes en la zona.

Materiales y métodos

Aislamiento de los hongos

Se trabajó con cinco hongos pertenecientes a la especie *C. kikuchii* (CK14, CK16, CK19, CK21 y CK26), cinco pertenecientes a *C. sojina* (CS73, CS76, CS78, CS79, CS80) y las cepas de referencia *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 y *Cercospora sojina* NBRC 6715. Los aislamientos regionales se obtuvieron a partir de plantas de soja enfer-

mas con tizón de la hoja y con mancha ojo de rana (MOR), respectivamente, recolectadas por integrantes del proyecto y de la Red de Información de Interés Agronómico (RiiA). Para ello se utilizó la metodología propuesta por Salvador y col. (1990) (23) y adaptada en el laboratorio de Microbiología General (24). Es importante destacar que en los cultivos de los cuales se obtuvieron los aislamientos no se habían realizado tratamientos fungicidas.

Agentes antifúngicos utilizados

Como antifúngico de referencia se utilizó fluconazol (TODOFARMA Droguería, Lote 0101205; origen India). El mismo se tomó como representante de los compuestos triazólicos y para la puesta a punto de la metodología.

Además se utilizaron 5 (A-E) productos de origen comercial (P), que se describen en la Tabla 1. Para *C. kikuchii* se ensayaron: PA, PD y PE, mientras que en el caso de *C. sojina* se utilizaron PB, PC y PE.¹

Tabla 1. Composición química y concentración de cinco (A-E) productos comerciales (P) ensayados.

Producto	Tipo de compuesto	Compuesto Activo	Concentración (g/L)
PA	estrobirulina	azoxistrobina	250
PB	estrobirulina	piraclostrobina	250
PC	benzimidazol	benzimidazol	500
PD	estrobirulina	trifloxistrobina	375
	triazol	ciproconazol	160
PE	estrobirulina	piraclostrobina	133
	triazol	epoxiconazol	50

¹ Sólo se ensayaron 3 de los 5 productos comerciales para cada una de las especies de *Cercospora* estudiadas, debido a que se trató de muestras recibidas en

donación, en diferentes períodos de tiempo y cuyos volúmenes residuales se destinaron a otras aplicaciones.

Determinación de la Concentración

Inhibitoria Mínima (CIM)

Se trabajó tomando como base el método de referencia M38- A2 aprobado por CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (25). Se aplicó la técnica de macrodilución en caldo por tratarse de hongos de desarrollo lento. El valor de la CIM (expresada en $\mu\text{g/mL}$) se definió como la menor concentración del compuesto que inhibe completamente el crecimiento visible del hongo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Con el objeto de adaptar la metodología a las características particulares de las especies de *Cercospora*, se llevaron a cabo las siguientes modificaciones:

- Tiempo de incubación: Los tubos se incubaron durante 14 días, prolongándose considerablemente el tiempo de incubación propuesto por CLSI (25).
- Temperatura de incubación: se utilizó la temperatura óptima para el desarrollo del hongo: $25 \pm 0,5$ °C.
- Condiciones de luz/oscuridad: Se trabajó bajo régimen de luz discontinua de 8 h de oscuridad y 16 h de luz fría (fotoperíodos de 16 h).
- Medio de cultivo: Se utilizó Caldo Papa Dextrosa (CPD) (26).
- Inóculo: Para su preparación se utilizaron estrías del hongo, desarrolladas en Agar Papa Dextrosa (APD) (26), de 5 días de incubación. Las estructuras fúngicas se obtuvieron mediante el vertido de CPD, desprendiéndolas suavemente con un ansa y cuidando de no arrastrar medio agarizado. La concentración del inóculo se ajustó mediante el recuento en cámara de Fuch-Rosenthal para lograr una concentración final de 4.10^3 - 5.10^4 UFC/mL. Además, se efectuó el control

del inóculo mediante un recuento microbiológico en superficie.

Luego de 72-96 h de incubación se seleccionaron las placas que tenían entre 30 y 300 colonias, se promedió la cantidad de colonias que había entre ellas y se calculó la concentración inicial del inóculo.

• Concentraciones de los compuestos:

Fluconazol: se trabajó con diluciones seriadas al medio en concentraciones comprendidas entre 2048 $\mu\text{g/mL}$ y 0,0625 $\mu\text{g/mL}$.

En este caso, se amplió el rango de concentraciones respecto de la norma (128 $\mu\text{g/mL}$ – 0,0625 $\mu\text{g/mL}$).

La potencia se obtuvo del rótulo del envase del compuesto.

Para realizar las diluciones se siguió el esquema propuesto en la norma para compuestos insolubles en agua (25).

Productos comerciales: se prepararon soluciones "stock" diluyendo la solución original, a fin de lograr distintas concentraciones de los compuestos activos. De esta forma se calcularon las diluciones óptimas para cada producto, fundamentalmente para los que contenían la combinación de dos antifúngicos, a fin de poder determinar la CIM.

Para los 5 compuestos se siguió el esquema para agentes antifúngicos solubles en agua (25).

Análisis estadístico

Para comparar los distintos tratamientos y si existían diferencias significativas en la respuesta a los antifúngicos por parte de los aislamientos, tanto de *C. kikuchii* como de *C. sojina*, se procedió a realizar una prueba no paramétrica. Se aplicó el Test de Cochran (27, 28), reconocido por su estadístico Q, que permitió evaluar la Hipótesis nula de

que todos los hongos se comportan de igual modo (con respuesta dicotómica) frente a la Hipótesis alternativa de que al menos uno se comporta de manera diferente.

Además, se realizaron pruebas sobre dos proporciones (28). En este caso se armaron todos los pares de grupos posibles y se calculó el estadístico Z y el valor **p** asociado. Se tomaron dos niveles de significancia y se consideró estadísticamente significativo un valor **p** menor a $\alpha=0,10$, y muy significativo un valor **p** menor a $\alpha=0,05$. Los datos fueron procesados con el Software SPSS versión 17.0.

Resultados y Discusión

No se pudieron encontrar valores de corte para fluconazol, ya que aún ensa-

yando la mínima dilución posible en la que se lograba solubilizar la droga, dicha concentración no afectaba el desarrollo de los hongos (CIM > 2048 $\mu\text{g/mL}$). Fluconazol se utiliza para el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales y sistémicas, en humanos, producidas por hongos hialinos. Si bien fue usado como control de referencia en otros estudios sobre antimicrobianos con actividad sobre hongos patógenos de cultivos (hialinos y dematiáceos) (29), al ser evaluado frente a las especies del género *Cercospora* estudiadas en este trabajo, demostró no poseer buena actividad.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de las CIM con los productos comerciales ensayados se expresan en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima de los diferentes productos antifúngicos (P: PA, PD y PE) frente a aislamientos de *Cercospora kikuchii*.

Producto	Hongo	Concentración Inhibitoria Mínima (expresada en $\mu\text{g/mL}$)					
		CK14 ¹	CK16 ¹	CK19 ¹	CK21 ¹	CK26 ¹	CK6711 ²
PA	azoxistrobina	1,22	2,44	9,77	0,31	1,22	4,88
PD	trifloxistrobina	234,38	468,75	468,75	14,65	117,19	117,19
	ciproconazol	100	200	200	6,25	50	50
PE	piraclostrobina	5,20	1,30	10,39	0,65	0,65	0,65
	epoxiconazol	1,95	0,49	3,91	0,24	0,24	0,24

¹ Aislamientos regionales de *C. kikuchii*; ² cepa de referencia *Cercospora kikuchii* NBRC 6711

Tabla 3. Concentración Inhibitoria Mínima de los diferentes productos antifúngicos (P: PB, PC y PE) frente a aislamientos de *Cercospora sojina*.

Hongo Producto		Concentración Inhibitoria Mínima (expresada en µg/mL)					
		CS73 ¹	CS76 ¹	CS78 ¹	CS79 ¹	CS80 ¹	S6715 ²
PB	piraclostrobina	312,5	312,5	78,1	2500	39	39
PC	benzimidazol	> 5000	> 5000	3,9	0,12	0,97	0,12
PE	piraclostrobina	81,12	81,12	20,78	20,78	20,78	10,39
	epoxiconazol	39,25	39,25	7,81	7,81	7,81	3,91

¹ Aislamientos regionales de *C. sojina*; ² cepa de referencia *Cercospora sojina* NBRC 6715

Cuando se aplicó el Test de Cochran, se comprobó que hubo diferencias significativas ($p < 10^{-4}$) en la respuesta de los distintos aislamientos de *C. kikuchii* frente a los 3 productos. Para facilitar el análisis, en la

Tabla 4 se presenta un resumen de todas las diferencias encontradas en la prueba de dos proporciones para los tres compuestos ensayados.

Tabla 4. Diferencias entre los aislamientos de *C. kikuchii* cuando se aplicaron pruebas sobre dos proporciones.

Hongos	CK14 ¹	CK16 ¹	CK19 ¹	CK21 ¹	CK26 ¹	CK6711 ²
CK14 ¹			▣	△⊙	⊙	⊙
CK16 ¹			⊙	▣△		
CK19 ¹	▣	⊙		≡△⊖	▣⊖	⊖
CK21 ¹	△⊙	▣△	≡△⊖		△	≡△
CK26 ¹	⊙		▣⊖	△		
CK6711 ²	⊙		⊖	≡△		

□: PA ⊙: PD △: PE ▣: indica diferencias significativas ($p < 0,1$)

≡: indica diferencias muy significativas ($p < 0,05$)

¹ Aislamientos regionales de *C. kikuchii*; ² Cepa de referencia *C. kikuchii* NBRC 6711.

Los casilleros vacíos corresponden a los casos en que no se encontraron diferencias.

Se puede observar que cuando se enfrentan los aislamientos CK19 y CK21 se producen diferencias muy significativas para los tres compuestos. Estos dos aislamientos se encuentran en los extremos: por un lado CK19, cuyos valores de CIM son más elevados, sería más resistente a los compuestos ensayados, mientras que CK21 sería más sensible (Tabla 2).

En la gran mayoría de los pares enfrentados se produjo al menos una diferencia para uno de los 3 compuestos, lo que evidencia la existencia de gran variabilidad en las respuestas a los antifúngicos.

En este trabajo, la mezcla de piraclostrobina + epoxiconazol (PE) se comportó mejor

que la mezcla PD (Tabla2), lo que es coincidente con los resultados de los ensayos “a campo” llevados a cabo por Soda (2011), quien obtuvo los mejores rendimientos al compararla con otras mezclas de estrobirulinas + triazoles (21).

En cuanto a la especie *C. soja*, cuando se aplicó el Test de Cochran, se comprobó que hubo diferencias significativas en las respuestas frente a los compuestos PB y PC ($p=1,5 \times 10^{-3}$ y $9,71 \times 10^{-10}$, respectivamente) pero no frente a PE ($p=0,06$) (Tabla 3). En la Tabla 5 se presenta un resumen de todas las diferencias encontradas en la prueba de dos proporciones para los tres compuestos ensayados.

Tabla 5. Diferencias entre los aislamientos de *C. soja* cuando se aplicaron pruebas sobre dos proporciones.

Hongos	CS73 ¹	CS76 ¹	CS78 ¹	CS79 ¹	CS80 ¹	CS6715 ²
CS73 ¹			⊖	⊖	⊖	⊖
CS76 ¹			⊖	⊖	⊖	⊖
CS78 ¹	⊖	⊖		⊖ ⊖		⊖
CS79 ¹	⊖	⊖	⊖ ⊖		⊖	⊖
CS80 ¹	⊖	⊖		⊖		
CS6715 ²	⊖	⊖	⊖	⊖		

□:PB ○:PC △:PE ▨: indica diferencias significativas ($p<0,1$)

▨: indica diferencias muy significativas ($p<0,05$)

¹Aislamientos regionales de *C. soja*; ²Cepa de referencia *C. soja* NBRC 6715.

Los casilleros vacíos corresponden a los casos en que no se encontraron diferencias.

Los valores de CIM para el compuesto PC resultaron, en la mayoría de los casos, más bajos que para los otros compuestos ensayados con excepción de los aislamientos CS73 y CS76, que mostraron valores de CIM muy elevados frente a todos los productos ensayados.

Al igual que en el caso de *C. kikuchii*, en la mayoría de los pares enfrentados se produjeron diferencias muy significativas para alguno de los 3 compuestos evidenciando, como ya se comentó, la variabilidad de las respuestas de estos aislamientos frente a los antifúngicos.

En Argentina se encuentran registrados para su comercialización 20 principios activos fungicidas competentes destinados al control de enfermedades en el cultivo de soja, de los cuales 25 productos (52 marcas comerciales) son para tratar las EFC. Entre estos se incluyen 4 benzimidazoles (21 marcas comerciales), 2 triazoles (4 marcas comerciales), 2 estrobirulinas (2 marcas comerciales), 11 mezclas de estrobirulinas con triazol (15 marcas comerciales), 3 mezclas de triazol con benzimidazol (5 marcas comerciales) y 3 mezclas de dos triazoles diferentes (5 marcas comerciales) (21).

Diferentes profesionales sostienen que en ensayos "a campo" con mezclas de triazoles + estrobirulinas, no se han detectado diferencias en el control de las enfermedades de la soja y que estas mezclas, a su vez, permitieron un mayor rendimiento (Kg/ha) a medida que se aumentaban las dosis (21). También sostienen que si bien éstas son las más recomendadas, la eficacia varía según el compuesto lo que, según los resultados obtenidos (Tabla 2), fue comprobado para la especie *C. kikuchii*.

A diferencia de lo reportado por Imazaki y col. (2006), quienes detectaron resistencia de diferentes genovarietades de *C. kikuchii*

frente a azoxistrobina, en este trabajo los hongos ensayados resultaron sensibles a dicho compuesto, lo que reforzaría la necesidad de implementar las pruebas *in vitro* para determinar el comportamiento de los fitopatógenos frente a los fungicidas (17).

A pesar de que se describe a piraclostrobina como la estrobirulina con mejor comportamiento no sólo por su actividad antifúngica sino también por sus efectos fisiológicos bien marcados en el rendimiento de la soja (21), algunos de los aislamientos de *C. sojina* resultaron poco sensibles (Tabla 3).

Benzimidazol (PC) es un fungicida genérico de amplio espectro, que al ser aplicado sobre la planta enferma elimina la patología al mismo tiempo que los elementos de propagación del hongo, lo que evita que continúe su avance a los estratos superiores de la planta. Por ello, este compuesto es muy recomendado sobre todo para tratar la MOR, debido a su rápido desarrollo epidemiológico desde las primeras infecciones. Sin embargo, debido a su escaso efecto residual, los expertos aconsejan efectuar el retratamiento de los cultivos (21), lo que podría incrementar la contaminación ambiental. Además, en este trabajo, algunos hongos (CS73 y CS76) demostraron una elevada resistencia a la acción de este fungicida.

Conclusiones

En este trabajo se pudo constatar que la actividad antifúngica de los compuestos analizados resultó diferente frente a distintos aislamientos regionales de *C. kikuchii* y *C. sojina*. Los resultados obtenidos aportaron datos sobre el comportamiento de estos hongos, complementando de este modo la información existente sobre dos de los fitopatógenos de soja más frecuentes en la zona.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco del Proyecto CAID 2009, financiado por Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Un agradecimiento especial a los integrantes del equipo RiiA por las muestras remitidas.

Nota

1. Resultados parciales del trabajo fueron presentados en el XII Congreso Argentino de Microbiología (2010), X Congreso Nacional de Micología (España, 2010), XII Congreso Argentino de Micología (2011) y IX Jornadas Argentinas de Microbiología (2011).

Referencias Bibliográficas

1. Aiuto, M. I., 2006. "Plaguicidas en la Argentina. Informe sobre la problemática del uso de plaguicidas y sus consecuencias en las principales provincias sojeras". Grupo de Reflexión Rural (Argentina). Disponible en Internet: http://www.grr.org.ar/trabajos/Informe_de_Pueblos_final.pdf. Fecha de acceso: Junio de 2012.
2. Carmona, M., 2005. Roya asiática de la soja y enfermedades de fin de ciclo. Relación con la ecofisiología y el control químico. En: INTA (Ed.), "Información técnica de cultivos de verano. Campaña 2005". INTA EEA Rafaela (Argentina), **104**.
3. Quintana, G. y Sasovsky, C., 2006. Control químico de roya asiática de la soja y enfermedades de fin de ciclo en la región sudoeste de la provincia del Chaco. Disponible en Internet: http://www.acsoja.org.ar/mercosoja2006/trabajos_pdf/T101.pdf. Fecha de acceso: Junio 2012.
4. Formento, N., 2007. Enfermedades foliares de la soja: momento de aplicación de fungicidas y rendimientos. En: INTA (Ed.), "Información técnica de cultivos de verano. Campaña 2007". INTA EEA Rafaela (Argentina), **108**.
5. Pioli, R., 2007. Situación del Complejo *Diaporthe/Phomopsis* en el cultivo de soja de Argentina. En: 3º Congreso de soja del Mercosur – Mercosoja (Ed.), "Compendio de Conferencias Plenarias. Protección Vegetal" Mercosoja (Argentina), I: 325-331. Disponible en Internet: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/blog/?p=12>. Fecha de acceso: Junio 2012.
6. Formento, N., 2011. Mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*) y roya asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) de la soja en argentina: pasado, presente y futuro. Quinto Congreso de la Soja del MERCOSUR; Primer foro de la soja Asia-Mercosur. Disponible en Internet: <http://www.mercosoja2011.com.ar/site/wp-content/imagenes/FORMENTO-Norma1.pdf>. Fecha de acceso: junio de 2012.
7. Padgett, G.B.; Schneider, R.W. y Whitam, H.K., 2003. Foliar-applied fungicides in soybean disease management. *Louis. Agric.* **46**: 7 - 9.
8. Schneider, R.W., 2008. Biology and management of soybean diseases in Louisiana. *Plant Pathol Crop Physiol* (Louisiana State University). Disponible en Internet: http://www.lsu.edu/ppcp/faculty_staff/schneider/index.htm. Fecha de acceso: Junio 2012.
9. Carmona, M. A.; Scandiani, M. M. y Luque, A., 2009. Severe Outbreaks of Soybean Frog-eye Leaf Spot Caused by *Cercospora sojina* in the Pampean region, Argentina. *Plant Dis.* **93**, (9): 966.
10. Zhang, G. R.; Newman, M. A. y Bradley, C. A., 2012. First report of the soybean frog-eye leaf spot fungus (*Cercospora sojina*) resistant to quinone outside inhibitor fungicides in North America. *Plant Dis.* **96**, 5: 767.
11. Montenegro, R.A., 2006. Informe sobre los efectos de los plaguicidas en la salud humana y el ambiente. Necesidad de prohibir el uso de plaguicidas agropecuarios en áreas urbanas y periurbanas. Fundación para la Defensa del Ambiente. Córdoba, Argentina. Disponible en Internet: http://www.posgradofadu.com.ar/archivos/biblio_doc/12.doc. Fecha de acceso: Mayo de 2012.
12. Martínez-Valenzuela, C. y Gómez-Arroyo, S., 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plagui-

cidas en trabajadores agrícolas. Rev. Int. Contam. Ambient. **23**: 185 - 200.

13. Ministerio de Salud Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Asociación Argentina de Médicos por el Medio Ambiente y Organización Panamericana de la Salud, 2007. "La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente". Ministerio de Salud (Argentina).

14. Carmona, M., 2007. "Fungicidas: características, clasificación, especificidad. Resistencia de hongos y principales usos. Manual de las jornadas de Actualización elementos fundamentales para el buen uso de fitoterápicos, dosis, modo de acción y deriva". INTA EEAOC y Sociedad Rural de Tucumán (Argentina), **I**, 20 - 22.

15. Carmona, M.; Reis, E. M., 2009. Critério: sistema de pontuação para aplicação de fungicidas para as doenças de final de ciclo na cultura da soja. In: Erlei Melo Reis. (Ed.). "Critérios indicadores do momento para aplicação de fungicidas visando ao controle de doenças em soja e trigo". Aldeia Norte Editora (Brasil), **I** 54 - 65.

16. Distéfano, S.G. y Gadbán, L.C., 2007. Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la campaña 2006 - 2007. Informe de actualización técnica. INTA Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez. **7**: 15 - 19.

17. Imazaki, I.; Iizumi, H.; Ishikawa, K.; Sasahara, M.; Yesuda, N. y Koizumi, S., 2006. Effects of thiophanate-methyl and azoxystrobin on the composition of *Cercospora kikuchii* populations with thiophanate-methyl-resistant strains. J. General Plant Pathol. **72**: 292 - 300.

18. Bradley, C. A., 2011. More strobilurin fungicide-resistant strains of the causal agent of Frog-eye Leaf Spot of soybean. The Bulletin **23**:3.

19. Carmona, M. A., 2010. Manejo químico de la mancha ojo de rana (MOR). XVIII Congreso de Apresid (Argentina), **I**: 1 - 4. Disponible en Internet: [http://www.agroconsultasonline.com](http://www.agroconsultasonline.com.ar/documento.html/Manejo%20qu%EDmico%20de%20la%20Mancha%20ojo%20de%20rana%20(MOR)%20(2010).pdf?op=d&documento_id=294)

[ar/documento.html/Manejo%20qu%EDmico%20de%20la%20Mancha%20ojo%20de%20rana%20\(MOR\)%20\(2010\).pdf?op=d&documento_id=294](http://www.agroconsultasonline.com.ar/documento.html/Manejo%20qu%EDmico%20de%20la%20Mancha%20ojo%20de%20rana%20(MOR)%20(2010).pdf?op=d&documento_id=294). Fecha de acceso: Junio 2012.

20. Distéfano, S.G. y Gadbán, L.C., 2010. Efecto de la aplicación de fungicidas foliares de distintos grupos químicos en diferentes estadios fenológicos del cultivo de soja sobre la intensidad de mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*) y los componentes del rendimiento. Disponible en Internet: <http://www.inta.gov.ar/mjuarez/info/documentos/soja/fungimor10.pdf>. Fecha de acceso: Junio 2012.

21. Soda, L., 2011. Fungicida foliar en soja. Pyraclostrobin + Difenconazole: ¿El fungicida foliar ideal para el control de EFC en soja? Accesible por Internet: <http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/fungicidas-en-soja-t3282/415-p0.htm>. Fecha de acceso: Junio 2012.

22. Sillón, M.R., 2011. Red de ensayos de fungicidas para manejo de enfermedades en soja. Sitio Santa Fe, Ciclo agrícola 2010/2011. Programa Nacional de Roya de la soja. Disponible en internet: [http://64.76.123.202/site/agricultura/roya_soja/07=informes/02_Red%20de%20Ensayos/_archivo/000006-Campa%C3%B1a%202010-11/000007_2011%20PNRS%20Sitio%20Santa%20Fe%20\(Sillon,M\)%20Informe%20FINAL.pdf](http://64.76.123.202/site/agricultura/roya_soja/07=informes/02_Red%20de%20Ensayos/_archivo/000006-Campa%C3%B1a%202010-11/000007_2011%20PNRS%20Sitio%20Santa%20Fe%20(Sillon,M)%20Informe%20FINAL.pdf). Fecha de acceso: Junio 2012.

23. Salvador, D. y Garrido, M.I., 1990. Características culturales y patogenicidad del hongo causante de la mancha en cadena del sorgo. Fitopatol. Venez. **3**: 11 - 15.

24. Mattio, M. C.; Turino, L.; González, A. M.; Di Conza, J. A.; Latorre Rapela, M. G.; Vaccari, M. C.; Iacona, V. A. y Lurá, M. C., 2008. *Cercospora* patógenas de soja: influencia de factores ambientales sobre su desarrollo. Degradación biológica de cercosporina. Rev. FABICIB **12**: 25 - 32.

- 25.** Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard-Second edition. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute (USA).
- 26.** Pitt, J. I. y Hocking, A. D., 1999. "Fungi and food spoilage" Aspen Publishers Inc. (USA), I. 509-513.
- 27.** Conover, W.J., 1980. "Practical nonparametric statistics" John Wiley & Sons (USA), I. 195-201.
- 28.** Agresti, A., 2002. "Categorical Data Analysis", Ed. Wiley Series in Probability and Statistics. University of Florida (USA).
- 29.** Svetaz, L. A.; Pioli, R. N.; Zacchino, S. A. y Petenatti, E., 2006. Compuestos Antifúngicos de origen vegetal para el control de patógenos de fin de ciclo asociados en Soja. Ergormix.com. Disponible en internet: <http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/compuestos-antifungicos-origen-vegetal-t1136/415-p0.htm>