

“Estudio de la sensibilidad a fungicidas de aislados de *Cercospora sojina* Hara, agente causal de la mancha ojo de rana en el cultivo de soja”

Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires. Área Producción Vegetal, orientación en Protección Vegetal

María Belén Bravo

Ingeniera Agrónoma, Universidad Nacional de San Luis – 2011
Especialista en Protección Vegetal, Universidad Católica de Córdoba -
2015

INTA

Estación Experimental Agropecuaria, San Luis

Fecha de defensa: 5 de abril de 2019



Escuela para Graduados Ing. Agr. *Alberto Soriano*
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Marcelo Aníbal Carmona

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae en Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad Nacional de La Plata)

Co-director

Alicia Luque

Bioquímica (Universidad Nacional de Rosario)

Profesora de Enseñanza Superior (Universidad de Concepción del Uruguay)

Doctora (Universidad Nacional de Rosario)

Consejero de Estudios

Diego Martínez Alvarez

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de San Luis)

Magister en Ciencias Agropecuarias. Mención en Producción Vegetal (Universidad Nacional de Río Cuarto)

JURADO EVALUADOR

Dr. Leonardo Daniel Ploper

Dra. Cecilia Inés Mónaco

Ing. Agr. MSci. Olga Susana Correa

DEDICATORIA

*A mi compañero de caminos
Juan Pablo Odetti
A Leti, mi amiga guerrera...*

AGRADECIMIENTOS

Al sistema de becas de INTA y la EEA INTA San Luis por permitirme capacitarme y realizar mis estudios de posgrado.

A los proyectos PRET SUR, PRET NO y sus coordinadores Hugo Bernasconi y Jorge Mercáu por la ayuda recibida en todo momento.

Al director de tesis Marcelo Carmona, co directora Alicia Luque y consejero de estudios Diego Martínez Alvarez, por las enseñanzas recibidas.

A Francisco Sautua, por brindarme su conocimiento desinteresada y amablemente.

Al CEREMIC y todo su equipo de trabajo, los llevo en los más lindos recuerdos.

A la Escuela Para Graduados Alberto Soriano. Por hacer placentero mi transitar durante la maestría.

A mi director de beca Oscar Terenti, por su ayuda y consejos.

A mis compañeros de trabajo; María Isabel Nieto, José Luis Riedel, Martha Lopez, Karina Frigerio, Estela Blanco, Romina Iacovino, Ruth Rauber, Juan Cruz Colazo, Aldo Suarez, Martín Chicahuala y Luis Mayer, por la ayuda de todos y cada uno.

A mi familia, papá Carlos, mamá Mary, hermano Rodrigo y hermanas Ma. Laura y Ma. Celeste.

A las amigas que me dio la vida, Leticia Garay, María Verónica Grenón, Marcia Micca y Shirley Muñoz.

A la familia que me regaló Buenos Aires, Silvia Zavala, Liam y Guillermo Peacock, Flia. Palma - Gentini, Mercedes y Néstor Wyss.

A los amores de mi vida, Juan Pablo y Joaquín Odetti.

A mi sonora compañera y a la música, por allanarme el camino.

DECLARACIÓN

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no ha sido presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución”.

Ing. Agr. (Esp.) María Belén Bravo

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁG.
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS UTILIZADAS	XIII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
CAPÍTULO 1	17
Introducción general	17
1.1. Introducción	18
1.1.1 Historia y producción del cultivo de soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill)	18
1.1.2. Fenología y grupos de madurez de soja	20
1.1.3. Enfermedades en el cultivo de soja y su importancia	21
1.1.4. Mancha ojo de rana	22
1.1.4.1. Importancia económica de mancha ojo de rana	23
1.1.4.2. Sintomatología	24
1.1.4.3. Etiología	26
1.1.4.4. Ambiente y enfermedad	27
1.1.4.5. Medidas de manejo	28
1.1.4.6. Resistencia de <i>C. sojina</i> a fungicidas	33
1.1.4.7. Respiración alternativa	34
1.2. Objetivos	35
1.2.1. Objetivo general	35
1.2.2. Objetivos específicos	35
1.3. Hipótesis	36
CAPÍTULO 2	39
Caracterización micro-morfológica de aislados de	39
<i>C. sojina</i>	39
2.1 Introducción	40
2.2 Materiales y métodos	41
2.2.1 Colección de muestras y descripción morfológica de aislados de <i>C. sojina</i>	41
2.2.2 Caracterización micro-morfológica de aislados de <i>C. sojina</i>	42
2.2.3 Preparación de medios de cultivo necesarios para el estudio de aislados de <i>C. sojina</i> .	43
2.2.4 Conservación de aislados de <i>C. sojina</i>	44
2.3 Resultados	44
2.3.1 Descripción morfológica de aislados de <i>C. sojina</i>	44
2.3.2 Colección de muestras y caracterización morfológica de cada aislado	45
2.3.3 Caracterización micro-morfológica de aislados de <i>C. sojina</i>	47
2.4 Discusión	50

2.5 Conclusiones	52
CAPÍTULO 3	53
Determinación de sensibilidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>C. sojina</i> a fungicidas utilizados comúnmente para su control.	53
3.1 Introducción	54
3.2 Materiales y métodos	58
3.2.1 Aislados de <i>C. sojina</i> utilizados para la determinación de sensibilidad <i>in vitro</i>	58
3.2.2 Fungicidas utilizados	58
3.2.4 Determinación de la CI ₅₀	58
3.2.5 Ensayo <i>in vivo</i>	61
3.3 Resultados	63
3.3.1 Modelos matemáticos para cálculo de concentraciones inhibitorias medias (CI ₅₀)	63
3.3.2 Concentración inhibitoria media de fungicidas	64
3.3.3 Sensibilidad de aislados de <i>C. sojina</i>	71
3.3.4 Ensayo <i>in vivo</i>	71
3.4 Discusión	74
3.5 Conclusiones	77
CAPÍTULO 4	79
Respiración alternativa de <i>C. sojina</i>	79
4.1 Introducción	80
4.2 Materiales y métodos	81
4.3 Resultados	82
4.3.1 Concentraciones inhibitorias medias	82
4.3.2 Porcentajes de Inhibición de crecimiento	83
4.4 Discusión	84
4.5 Conclusiones	85
CAPÍTULO 5	87
Conclusiones finales	87
5.1 Introducción	88
5.2 Síntesis de los principales resultados	89
5.3 Avances logrados en el conocimiento	92
5.4 Aplicaciones futuras	93
5.5 Implicancias para investigaciones futuras	94
BIBLIOGRAFÍA	97
APÉNDICE	115
Cálculos estadísticos	116

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁG.
Tabla 2.1: Aislados de <i>C. sojina</i> utilizados para pruebas de fungitoxicidad <i>in vitro</i> .	42
Tabla 2.2: Imágenes de tamaño, color, forma y textura de aislados de <i>C. sojina</i> . (Las imágenes corresponden a colonias con períodos de crecimiento entre 15 y 20 días).	45
Tabla 2.3: Imágenes del desarrollo <i>in vitro</i> de aislados de <i>C. sojina</i> en medio de cultivo APG a los 15 días de incubación con horas de alternancia de luz y oscuridad.	46
Tabla 2.4: Medición de conidios y medias de cada aislado, obtenidos del conteo de 100 conidios por aislado.	31
Tabla 2.5: Comparación de imágenes en microscopio electrónico y óptico de estructuras reproductivas de aislados de <i>C. sojina</i> .	49
Tabla 3.1: Fungicidas utilizados en las pruebas de fungitoxicidad <i>in vitro</i> , principios activos de cada uno, nombre comercial y empresa.	58
Tabla 3.2: Ecuaciones de regresión no lineal para cada modelo: log-logístico de cuatro parámetros (LL.4), asimétrico Weibull tipo I (W1.4) y II (W2.4).	60
Tabla 3.3: Criterio de sensibilidad de hongos a fungicidas y de fungitoxicidad de acuerdo con la escala propuesta por Edgington <i>et al.</i> (1971). Escala de sensibilidad basada en la CI50 ($\mu\text{g/ml}$).	60
Tabla 3.4: Descripción de los tratamientos planteados en ensayo de sensibilidad <i>in vivo</i> .	63
Tabla 3.5: Concentración inhibitoria media (CI50) promedio de seis aislados <i>C. sojina</i> para los diferentes fungicidas analizados	65
Tabla 3.6: Desarrollo <i>in vitro</i> de seis aislados del patógeno <i>C. sojina</i> en medio de cultivo APG con distintas concentraciones del fungicida trifloxystrobina + cyproconazole.	66
Tabla 3.7: Desarrollo <i>in vitro</i> de seis aislados del patógeno <i>C. sojina</i> en medio de cultivo APG con distintas concentraciones del fungicida pyraclostrobina + epoxiconazole.	67
Tabla 3.8: Desarrollo <i>in vitro</i> de seis aislados del patógeno <i>C. sojina</i> en medio de cultivo APG con distintas concentraciones del fungicida picoxystrobina + cyproconazole.	68

Tabla 3.9: Desarrollo <i>in vitro</i> de seis aislados del patógeno <i>C. sojina</i> en medio de cultivo APG con distintas concentraciones del fungicida carbendazim.	69
Tabla 3.10: Desarrollo <i>in vitro</i> de seis aislados del patógeno <i>C. sojina</i> en medio de cultivo APG con distintas concentraciones del fungicida azoxystrobina + cyproconazole.	70
Tabla 3.11: Valores medios de CI50 de cinco fungicidas en promedio para cada aislado analizado.	71
Tabla 3.12: Incidencia de <i>C. sojina</i> sobre los tratamientos T5 (aislado 232-10 con fungicida), T3 (aislado 232-10 sin fungicida), T4 (aislado 172-09 sin fungicida) y T6 (aislado 172-09 con fungicida).	72
Tabla 3.13: Severidad de <i>C. sojina</i> sobre los tratamientos T5 (aislado 232-10 con fungicida), T3 (aislado 232-10 sin fungicida), T4 (aislado 172-09 sin fungicida) y T6 (aislado 172-09 con fungicida).	72
Tabla 4.1: Nombre, procedencia, raza y CI50 del fungicida azoxystrobina para los aislados más y menos sensibles de <i>C. sojina</i> utilizados.	81
Tabla 4.2: Valores de CI50 ($\mu\text{g/ml}$) de los aislados 232-10 y 172-09 para el fungicida azoxystrobina y azoxystrobina + SHAM.	82
Tabla 4.3: Pruebas de fungitoxicidad de los aislados 232-10 y 172-09 frente al uso de distintas dosis de azoxystrobina y azoxystrobina más SHAM.	83
Tabla 4.4: Valores de PIC (Porcentaje de Inhibición de crecimiento) de los aislados 232-10 y 172-09 para el fungicida azoxystrobina y azoxystrobina + SHAM.	83
Tabla 6.1: Test no paramétrico de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5% para los modelos de ajuste log-logístico de cuatro parámetros (LL.4), asimétrico Weibull tipo I (W1.4) y II (W2.4).	116
Tabla 6.2: Test no paramétrico de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5% de las concentraciones inhibitorias medias (CI50) en promedio de los cinco fungicidas ensayados: pyraclostrobina + epoxiconazole; picoxystrobina + cyproconazole; trifloxystrobina + cyproconazole y azoxystrobina + cyproconazole y carbendazim	117
Tabla 6.3: Análisis de la varianza y test de Tukey de la sensibilidad a fungicidas de seis aislados de <i>C. sojina</i> .	118
Tabla 6.4: Análisis de la varianza y test de Tukey para ensayo de sensibilidad <i>in vivo</i> . Incidencia de <i>C. sojina</i> sobre los tratamientos tratamientos T1 (testigo sin inoculación ni fungicida), T2 (testigo sin inoculación más fungicida), T3 (aislado más sensible sin fungicida), T4 (aislado menos sensible sin fungicida), T5 (aislado más sensible con fungicida) y T6 (aislado menos sensible con fungicida)	119

Tabla 6.5: Análisis de la varianza y test de Tukey para ensayo de sensibilidad *in vivo*. Severidad de *C. sojina* sobre los tratamientos T1 (testigo sin inoculación ni fungicida), T2 (testigo sin inoculación más fungicida), T3 (aislado más sensible sin fungicida), T4 (aislado menos sensible sin fungicida), T5 (aislado más sensible con fungicida) y T6 (aislado menos sensible con fungicida)

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁG.
Figura 1.1: Provincias con aptitud agrícola donde se cultiva soja. Fuente: Min. de Agroindustria, 2017.	19
Figura 1.2: Producción total de soja (toneladas) en la República Argentina resultante de la campaña agrícola 2017/2018. Fuente: http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes .	20
Figura 1.3: Ciclo de la enfermedad mancha ojo de rana. Fuente: Carmona y Di Núbila (Carmona, 2014).	28
Figura 2.1: Placas de Petri con diferentes medios de cultivo. SNA, V8, agar zanahoria y APG.	43
Figura 2.2: Conidios de <i>C. sojina</i> observados en microscopio óptico.	33
Figura 2.3: Conidióforos en aumento 10 y 40 x en microscopio óptico. Se observa la marca que deja el conidio al desprenderse.	48
Figura 2.4: Conidióforos observados en lupa estereoscópica.	49
Figura 3.1: Inhibición de formación del huso mitótico que dará lugar a la división celular del hongo. Modo de acción de fungicidas bencimidazoles	55
Figura 3.2: Inhibición del transporte de electrones en la cadena respiratoria del hongo. Modo de acción de fungicidas estrobilurinas. Adaptado de: "Fosforilación oxidativa: Figura 3", de Openstax College, Biología (CC BY 3.0).	55
Figura 3.3: Bloqueo de la 14 α -desmetilasa en la formación del lípido ergosterol presente en la pared celular. Modo de acción de fungicidas triazoles (Bravo, 2018).	56
Figura 3.4: Placas de Petri con los seis aislados y dosis de fungicidas ensayados en medio APG, incubándose en cámaras de cultivo.	59
Figura 3.5: Escala de severidad de mancha ojo de rana propuesta por Distéfano y Gabdán (2009).	62
Figura 3.6: Diagrama de ensayo en invernáculo.	63
Figura 3.7: Concentraciones inhibitorias medias (CI50) ($\mu\text{g/ml}$) de cinco fungicidas para seis aislado <i>en promedio</i> de <i>C. sojina</i> según tres modelos de	64

ajuste: log-logístico de cuatro parámetros (LL.4), asimétrico Weibull tipo I (W1.4) y II (W2.4).

Figura 3.8: Plantas inoculadas con *C. sojina* bajo cámara húmeda y tratamiento testigo, mostrando mancha típica de la enfermedad MOR: **73**

Figura 3.9: Severidad de *C. sojina* en los tratamientos T5 (aislado 232-10 con fungicida), T3 (aislado 232-10 sin fungicida), T4 (aislado 172-09 sin fungicida) y T6 (aislado 172-09 con fungicida) **73**

ABREVIATURAS UTILIZADAS

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
MOR	Mancha ojo de rana
EFC	Enfermedades de fin de ciclo
PDRYT	Podredumbre de raíz y tallo
RTO	Rendimiento
APG	Agar Papa Glucosado
SHAM	Ácido Salicil Hidroxámico
AOX	Enzima Oxidaza Alternativa
CI₅₀	Concentración Inhibitoria Media

RESUMEN

Estudio de la sensibilidad a fungicidas de aislados de *Cercospora sojina* Hara, agente causal de la mancha ojo de rana en el cultivo de soja.

La mancha ojo de rana es una de las enfermedades foliares más importantes en soja debido a su carácter explosivo y las pérdidas en rendimiento y calidad de grano que genera. Estudios sobre la sensibilidad del patógeno son prácticamente nulos. Este trabajo propuso, 1) estudiar la sensibilidad *in vitro* de *C. sojina* a fungicidas mezclas de estrobilurinas más triazoles y a un bencimidazol utilizados comúnmente para su control, 2) caracterizar micro-morfológicamente aislados del patógeno de distintas razas y procedencia, 3) comprobar variabilidad entre aislados a diferentes dosis de fungicidas, 4) determinar una vía de respiración alternativa como escape al modo de acción de las estrobilurinas, 5) clasificar potencia de fungicidas y 6) analizar *in vivo* los aislados más y menos sensibles al fungicida más potente. Se utilizaron seis aislados que fueron conservados mediante criopreservación en medio de cultivo APG (agar papa glucosado). Las características micro morfológicas fueron similares en los distintos aislados, sus conidios, con 8 septos en promedio, midieron 23 – 67,3 μm de largo y 8 μm de ancho. Los fungicidas utilizados (pyraclostrobina + epoxiconazole, trifloxystrobina + cyproconazole, picoxystrobina + cyproconazole, azoxystrobina + cyproconazole y carbendazim) resultaron altamente fungitoxicos a todos los aislados, destacándose trifloxystrobina + cyproconazole como el más potente. El fungicida bencimidazol presentó menor potencia en comparación con las mezclas de estrobilurinas más triazoles. No hubo variabilidad entre aislados a los fungicidas testeados. Mediante el uso de SHAM (ácido salicil hidroxámico) como inhibidor de una posible vía alternativa de respiración, no se comprobó este mecanismo de resistencia a las estrobilurinas, debido a que el fungicida estrobilurina azoxystrobina (98%) resultó

altamente fungitóxico. Los aislados con mayor y menor valor de CI_{50} ensayados *in vivo* tuvieron similar comportamiento al observado *in vitro*, mostrando diferencias en los valores de incidencia (número de folíolos enfermos/total de folíolos x 100) pero no en los valores de severidad (grado de infección).

Palabras claves: fungitoxicidad, sensibilidad, ensayos *in vitro*, inoculación, ensayos *in vivo*, respiración alternativa

ABSTRACT

Sensitivity to fungicides of *Cercospora sojina* Hara isolates, causal agent of frog-eye leaf spot in soybean.

Frog-eye leaf spot is one of the most important foliar diseases of soybeans due to its explosive nature and the losses in yield and grain quality it generates. Studies on the sensitivity of the pathogen are practically null. This study was aimed to, 1) study the *in vitro* sensitivity of *C. sojina* to fungicides mixtures of strobilurins - triazoles and a benzimidazole commonly used for their control, 2) characterize micro-morphologically isolated of the pathogens of different races and origin, 3) check variability between isolates to different doses of fungicides, 4) determine an alternative respiratory pathway as escape to the mode of action of strobilurins, 5) classify the potency of fungicides and 6) analyze *in vivo* the isolates more and less sensitive to the most potent fungicide. Six isolates were used, which were preserved by cryopreservation in PDA culture medium (potato dextrose agar). Micro-morphological characteristics were similar in the different isolates, their conidia, with 8 septa on average, measured 23 – 67,3 μm long and 8 μm wide. The fungicides used (pyraclostrobin + epoxiconazole, trifloxystrobin +

cyproconazole, picoxystrobin + cyproconazole, azoxystrobin + cyproconazole and carbendazim) were highly fungitoxic to all isolates, with trifloxystrobin + cyproconazole being the most potent. The benzimidazole fungicide showed lower potency compared to mixtures of strobilurins plus triazoles. There was no variability between isolates to the fungicides tested. By the use of SHAM (salicylic hydroxamic acid) as an inhibitor of a possible alternative pathway of respiration, this mechanism of resistance to strobilurins was not proven, because the fungicide strobilurin azoxystrobin (98 %) was highly fungitoxic. The isolates with highest and lowest IC₅₀ value tested *in vivo* had a similar behavior to that observed *in vitro*, showing differences in the incidence values (number of leaflets / total folioles x 100) but not in the values of severity (degree of infection)

Keywords: fungitoxicity, sensitivity, *in vitro* assays, inoculation, *in vivo* assays, alternative respiratory pathway.

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.1. Introducción

1.1.1 Historia y producción del cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

La soja es una oleaginosa de alta importancia mundial, originaria de China. Se introdujo en América del norte en 1756, desde donde se multiplicó y diseminó al mundo (Ivancovich, 2011). En Argentina, en el año 1898 se introdujo en la provincia de Mendoza con el objeto de aportar materia orgánica en los suelos arenosos destinados a la implantación de los viñedos. Luego, en 1955 se crea una filial de Brandt Laboratorios S.A.: Agrosoja S.R.L con el fin de introducir la especie como cultivo extensivo al país. Posteriormente en 1958, conjuntamente con el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), emprenden un plan de investigación conjunto destinado a difundir y establecer una especie aún no cultivada en Argentina (Martínez Alvarez, 2012). En el año 1962, se realiza exitosamente la primera exportación de soja argentina con destino a Hamburgo (Alemania), fruto de una exitosa campaña agrícola (1961/62) llevada a cabo por la empresa mencionada, con 11.000 hectáreas sembradas (Martínez Alvarez, 2012). Sin embargo, la expansión sostenida del cultivo se inició a fines de la década de 1960, cuando representaba el 0,06% de la producción mundial (Barreto *et al.*, 1997, Guirong *et al.*, 2011). En los años siguientes, se continuó con estudios agroecológicos del cultivo en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (Remussi y Pascale, 1966) y fue a partir de la década del 80 que el cultivo tuvo una expansión acelerada, consolidándose desde 1996/97 con la difusión de variedades resistentes a herbicidas y la siembra directa. Como resultado del volumen logrado como por la industria de molienda, que alcanzó a construir el complejo agroindustrial más importante en valor de la producción y de las exportaciones, la soja llegó a transformarse en el cultivo extensivo de mayor importancia en Argentina (Ivancovich, 2011). En la actualidad, la producción mundial de soja mantiene una expansión sostenida, alcanzando en el año

2016, más de 742 millones de toneladas (FAOSTAT, 2017). En Argentina, se cultiva en 15 de las 23 provincias del país (Buenos Aires, La Pampa, San Luis, Santa Fe, Córdoba, Catamarca, Santiago del Estero, Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Chaco, Formosa, Tucumán, Salta y Jujuy) (Figura 1.1), siendo las de mayor producción Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe (Figura 1.2) (Min. Agroindustria, 2017).



Figura 1.1: Provincias con aptitud agrícola donde se cultiva soja. Fuente: Min. de Agroindustria, 2017.

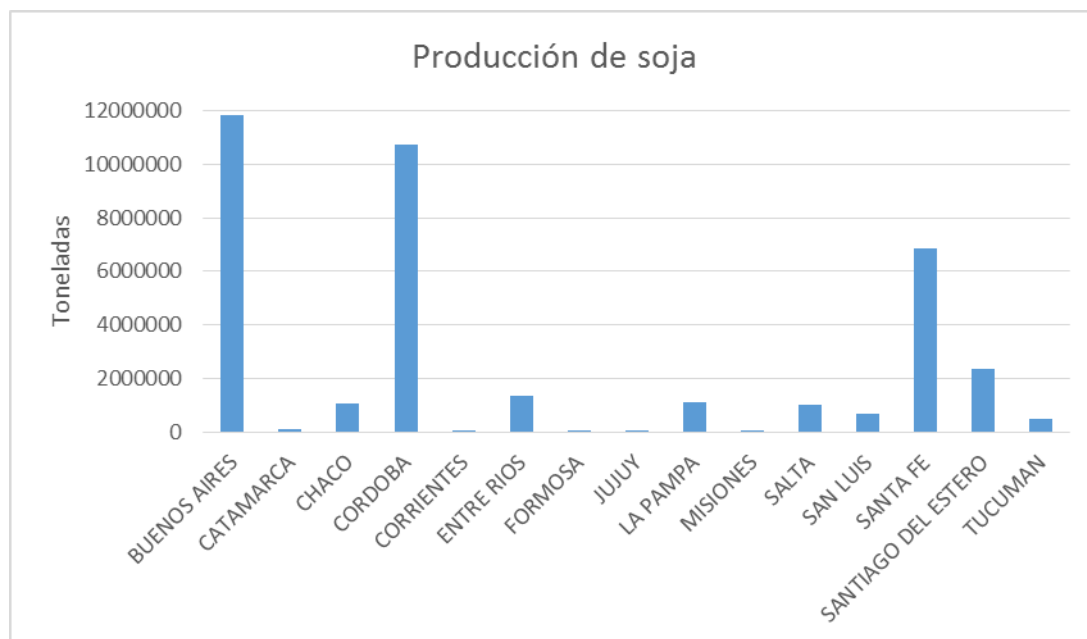


Figura 1.2: Producción total de soja (toneladas) en la República Argentina resultante de la campaña agrícola 2017/2018. Fuente: <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>

1.1.2. Fenología y grupos de madurez de soja

Según Fehr y Caviness (1977) los estadios fenológicos de soja se dividen en vegetativos (V) y reproductivos (R) teniendo en cuenta las hojas y estructuras reproductivas de la planta. Dependiendo de la duración del ciclo, los cultivares se dividen en 12 grupos de madurez (GM), que van desde los más cortos 00 y 0 que se cultivan en Canadá, el norte de Europa y Asia, hasta el GM X adaptado a regiones ecuatoriales. En Argentina, se cultivan mayoritariamente sojas de los GM II o III al norte de la Patagonia o al sur de Buenos Aires, el GM IV predomina en casi toda la región pampeana y los GM VI al IX están difundidos en el noroeste (NOA) y noreste argentino (NEA), sobre los cuales se han realizado mejoras genéticas para resistir, tolerar y combatir a las enfermedades que afectan al cultivo (Sadras *et al.*, 2002; Satorre *et al.*, 2003; Salado Navarro, 2012; Carmona *et al.*, 2015 b).

1.1.3. Enfermedades en el cultivo de soja y su importancia

El desarrollo de enfermedades en soja ha provocado severas reducciones en el rendimiento en grano (RTO) y en la calidad del cultivo. A nivel mundial se calcula que las pérdidas de RTO provocadas por enfermedades oscilan entre el 10 y el 15 %. En Argentina los daños causados anualmente, alcanzan del 8 al 10 % del total de la producción impactando negativamente en la rentabilidad del cultivo (Ivancovich, 2011). Las denominadas enfermedades de fin de ciclo (EFC), las pudriciones de raíz y tallo (PDRYT), los hongos que afectan a la semilla y la mancha ojo de rana (MOR) se convirtieron en las más importantes asociadas principalmente con el sistema de producción bajo siembra directa y monocultivo (Ivancovich, 2011; Carmona *et al.*, 2015 a).

Las EFC de la soja involucran a aquellas que se presentan en los estadios reproductivos intermedios avanzados. Provocan defoliación prematura y madurez anticipada ocasionando pérdidas en el RTO por el desarrollo incompleto de los granos y daños que van desde el 10 al 30 % (Ivancovich, 2011; Carmona, 2014). Las EFC de mayor presencia en Argentina son, según Carmona (2014): tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla [*Cercospora kikuchii* (T. Matsu y Tomoyasu) Gardner], antracnosis [*Glomerella glycines* (Hori) Lehman y Wolf]; [*Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrews y WD Moore], mancha marrón (*Septoria glycines* Hemmi), tizón de la vaina y tallo (*Phomopsis* spp.), mildiu [*Peronospora manshurica* (Naum.) Syd: Gäum], mancha anillada [*Corynespora cassiicola* (Berk y Curt) Wei], mancha foliar por *Alternaria* (*Alternaria* spp.), pústula bacteriana [*Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (Nakano) Dye.] y tizón bacteriano [*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young, Dye y Wilkie].

Las PDRYT que ocasionan “damping off” o muerte o tizón de plántulas, son provocadas principalmente por el complejo de hongos compuesto por *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* spp. y por los oomycetes *Pythium* spp. y *Phytophthora sojae* (Mont.) (Formento *et al.*, 2016).

En cuanto a los hongos que afectan a la semilla, los principales determinados en Argentina son *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cercospora kikuchii* (T. Matsu y Tomoyasu) Gardner), *Colletotrichum* spp., *Fusarium semitectum* (Berck. y Rav.), *F. graminearum*, *Peronospora manshurica* (Naum) Syd., *Phomopsis* spp. y *Penicillium* spp. (Scandiani y Luque, 2009; Ivancovich, 2011).

Por otra parte, MOR, es una enfermedad de comportamiento policíclico de gran importancia debido a los daños que ocasiona y a su forma de aparición explosiva (Carmona *et al.*, 2010; Carmona, 2014). Asimismo, puede generar resistencia y de ese modo llevar a la ineficiencia de los insumos fitosanitarios utilizados comúnmente para su control (Zhang *et al.*, 2012; Peretti *et al.*, 2012; Price, 2013; Zeng *et al.*, 2015; Carmona *et al.*, 2017; Smatnik *et al.*, 2017).

1.1.4. Mancha ojo de rana

Esta enfermedad se detectó por primera vez en Argentina en el ciclo agrícola 1997/1998, luego se presentó de manera epifítica durante la campaña agrícola 1999/2000 en el Noroeste Argentino, principalmente en Tucumán y Salta (Ploper *et al.*, 2000). Posteriormente, su ocurrencia fue esporádica hasta el ciclo 2008/2009 donde se diseminó rápidamente en la Región Pampeana con ataques intensos en Córdoba y Santa Fe principalmente en muchas variedades de soja de los GM III, IV y V (Carmona y Scandiani, 2009). La epidemia ocurrida en esa campaña agrícola provocó incidencia de plantas afectadas hasta del 100 % en todos los campos relevados de las provincias de

Córdoba y Santa Fe, mientras que, en Buenos Aires la incidencia fue variable desde campos sin infección hasta un 100% de incidencia. En ese momento, la severidad provocada por *C. sojina* varió desde el 30 al 60 % en lotes de Córdoba (Carmona *et al.*, 2010). Registros tomados por Carmona *et al.* (2009), del número de lesiones por folíolo en localidades de Córdoba y Santa Fe, llegaron a 20-55 manchas por folíolo. El aumento en prevalencia, incidencia y severidad fue notable y significativo durante la campaña 2009/2010 en la zona núcleo sojera (Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires), encontrándose también la enfermedad en lotes de la provincia de San Luis (Carmona, 2014). En la actualidad, la enfermedad aparece esporádicamente y con bajos niveles de severidad debido al mejoramiento genético y el reemplazo de las variedades susceptibles por otras de menor susceptibilidad o resistentes. Sin embargo, debido a la variabilidad del hongo, esa resistencia puede quebrarse y aunque no haya actualmente epidemias tan severas como las registradas anteriormente, esta enfermedad constituye un peligro permanente por los daños que ocasiona (Reis *et al.*, 2012).

1.1.4.1. Importancia económica de mancha ojo de rana

La MOR ha provocado importantes pérdidas de RTO en Argentina y el mundo. Concretamente en Brasil, en la década del 70, se alcanzaron pérdidas del 100% y posteriormente en el ciclo 1987/88, pérdidas de 500.000 toneladas. En Indonesia, en el año 1994 las pérdidas fueron de 20 t, por otra parte en 1997, se perdieron 2.000 t en Bolivia y 504.800 t en China (Ploper *et al.*, 2001; Wrather *et al.*, 1997; Akem y Dashiell, 1994; Yorinori, 1989).

En el noroeste argentino durante la campaña agrícola 1999/2000, MOR se presentó de manera epifítica. En el oeste de Córdoba y sur de Santa Fe, durante el ciclo 2008/2009, Carmona y Scandiani (2009) citaron un impacto sobre el rendimiento de

entre 400 y 900 kg/ha. Otra experiencia llevada cabo en Santa Fe, mostró impactos que oscilaron entre 400 y 2.000 kg/ha en parcelas de variedades susceptibles sin control químico (Carmona, 2010). En esa misma campaña, los síntomas se observaron desde etapas tempranas de los cultivos, causando daños y pérdidas variables según GM, cultivar y tipo de reacción del mismo, con un rango de caída en el RTO de entre 90 y 1.709 kg/ha para cultivares de los GM III y IV (Distéfano, 2010). MOR es considerada la enfermedad de mayor importancia en la historia de la soja en nuestro país debido a que las pérdidas ocasionadas por ella, fueron estimadas en aproximadamente 2000 millones de dólares (Odetto y Baigorri, 2010; Carmona, 2011).

1.1.4.2. Sintomatología

La sintomatología es principalmente de ubicación foliar, pudiéndose presentar además en tallos, vainas y semillas. En los estadios iniciales de la enfermedad, los síntomas pueden variar con el cultivar, estado fenológico de la planta, temperatura y humedad relativa. Las lesiones aparecen, en un comienzo, en el haz de las hojas, como pequeñas manchas circulares o angulares de color castaño rojizo a grisáceas oscuras. Posteriormente, las partes centrales se tornan más claras y grises, rodeándose de un delgado margen marrón rojizo. Luego, se observan en el centro de la mancha puntos oscuros que corresponden a la producción de conidióforos en ambos lados de la lesión, característica típica que le da el nombre “ojo de rana” a la enfermedad. A diferencia de otras enfermedades foliares, estas manchas, carecen de halo clorótico. El diámetro de las lesiones puede variar de 1 a 5 mm, pero con condiciones ambientales favorables lesiones adyacentes pueden coalescer y formar áreas de hasta 10 mm de diámetro. Respecto a la forma de las manchas, son más o menos circulares, irregulares y angulosas. La irregularidad de la forma es debida a la dificultad que el hongo encuentra

de colonizar las nervaduras. Asimismo, es muy común observar las lesiones perforadas, lo que genera una gran pérdida de área foliar (Phillips, 1999; Mian *et al.*, 2008; Distéfano y Gabdán 2009; Carmona y Scandiani, 2009). La infección puede ocurrir en cualquier estado fenológico del cultivo, sin embargo, los síntomas se observan normalmente después de floración y se hacen muy evidentes en R3 (inicio de formación de vainas) (Carmona *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2012; Carmona, 2014).

En tallos los síntomas aparecen en el final del ciclo del cultivo, cuando la densidad del inoculo producido por las hojas alcanza su pico máximo. Las lesiones son normalmente más largas que en hojas, presentándose la porción central deprimida (Mian *et al.*, 2008). Se observa además, estromas negros fijando los conidióforos. La sintomatología en vainas presenta el aspecto ojo de rana característico de la enfermedad, con manchas circulares a alargadas que miden 1- 4 mm de diámetro. La superficie de las lesiones presenta el centro deprimido, sitio por dónde el hongo atraviesa la vaina llegando finalmente a las semillas, por lo general el hongo penetra en la semilla por el poro o rajaduras de la cubierta seminal y también a través del hilo (Phillips, 1999; Carmona y Scandiani, 2009; Distéfano y Gabdán, 2009). Las semillas infectadas pueden ser asintomáticas o presentar síntomas variados como semillas oscuras, arrugadas y resquebrajadas con desarrollos de áreas color gris claro, oscuro y/o marrón, de tamaño y forma variable. Finalmente, la producción de conidios ocurre sobre la superficie de la semilla (Carmona *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2012, Carmona, 2014).

La reacción a la enfermedad en los diferentes cultivares de soja varía desde la inmunidad hasta la alta susceptibilidad, cuánto más susceptible es una variedad, mayores y más uniformes son las lesiones, y por lo tanto mayor es la producción de conidios en dichas lesiones que sirven para generar nuevos ciclos de infección (Carmona *et al.*, 2010). Los cultivares con reacción intermedia presentan un menor

número de lesiones que no suelen superar los 2 mm de diámetro, mientras que los cultivares resistentes muestran muy pocas lesiones o ninguna (Ploper *et al.*, 2000).

1.1.4.3. Etiología

El hongo fitopatógeno *C. sojina* Hara es el agente causal de la enfermedad mancha ojo de rana. Pertenece al phylum *Ascomycota*, clase *Dothiideomycetes*, orden *Capnodiales*, familia *Mycosphaerellaceae*, género *Cercospora* y especie *Cercospora sojina* (Ferri *et al.*, 2011; Formento *et al.*, 2011). El género de este patógeno fue descrito por primera vez en 1863 por G. Fresenius en apio (*Apium graveolens*), desde entonces, miles de especies han sido informadas en todo el mundo. El libro “Monografía del género *Cercospora*”, menciona alrededor de 1.400 especies (Groenewald *et al.*, 2012; Hino y Hasime 1978; Chupp, 1953). En cuanto a la especie *C. sojina*, fue descrita en 1915 por Nogoyokoku, Hara en Tokyo y luego en Estados Unidos en el año 1924 (Melchers, 1925; Groenewald *et al.*, 2012). El estado sexuado del hongo hasta el momento es desconocido (Carmona *et al.*, 2010; Luque, 2010). Las fructificaciones del hongo ocurren en el centro de las lesiones que ocasiona. Los conidióforos son de color marrón claro a marrón oscuro, con 1 a 4 septos, rectos o sinuosos, fasciculados con 1 a 12 geniculaciones y miden 52-120 x 4-6 μm . Cuando un conidio se desprende de los conidióforos deja una cicatriz en el lugar donde estuvo fijado, pudiéndose observar hasta 11 cicatrices en un mismo conidióforo. Los conidios presentan 1 a 10-13 septos, son hialinos, cilíndricos, elongados, fusiformes, raramente aciculares y truncados en la base. Se generan de forma holoblástica a partir de una célula conidiógena que prolifera simpodialmente. Los conidios germinan fácilmente en presencia de agua emitiendo un tubo germinativo del cual pueden producirse conidios secundarios (Reis *et al.*, 2012; Carmona *et al.*, 2010; Mattio, 2006).

1.1.4.4. Ambiente y enfermedad

El desarrollo de la enfermedad es favorecido por tiempo cálido y húmedo, con temperaturas entre 25 y 30 a 35° C, lluvias abundantes y humedad relativa ambiente superior a 90 % con 72 horas de mojado continuo de las hojas (Yorinori, 1989; Mian *et al.*, 2008; Camera, 2012; Reis *et al.*, 2012). Bajo estas condiciones, las estructuras reproductivas del hongo pueden germinar en la superficie foliar al cabo de una hora (Camera, 2012). La dispersión de conidios libres y secos es a corta distancia a áreas vecinas a través del viento. Características ambientales como alta heliofanía, amplitud térmica, altas temperaturas mínimas y máximas, altos valores de mojado foliar por precipitación y rocío estimulan la esporulación, germinación e infección del patógeno (Moschini *et al.*, 2009; Carmona *et al.*, 2010; Sepulcri *et al.*, 2015). Asimismo, condiciones térmicas benignas del invierno anterior ayudan a la supervivencia del patógeno en rastrojo, lo que aumenta la cantidad de inóculo inicial en la siguiente campaña, todas características ambientales fuertemente correlacionadas con la aparición de epidemias (Carmona *et al.*, 2010; Sepulcri *et al.*, 2015). Las condiciones limitantes para la germinación y esporulación de los conidios son temperaturas por debajo de los 20 °C y por encima de 40 °C (Yorinori, 1989; Reis *et al.*, 2012). El ciclo de la enfermedad puede observarse en la Figura 1.3.

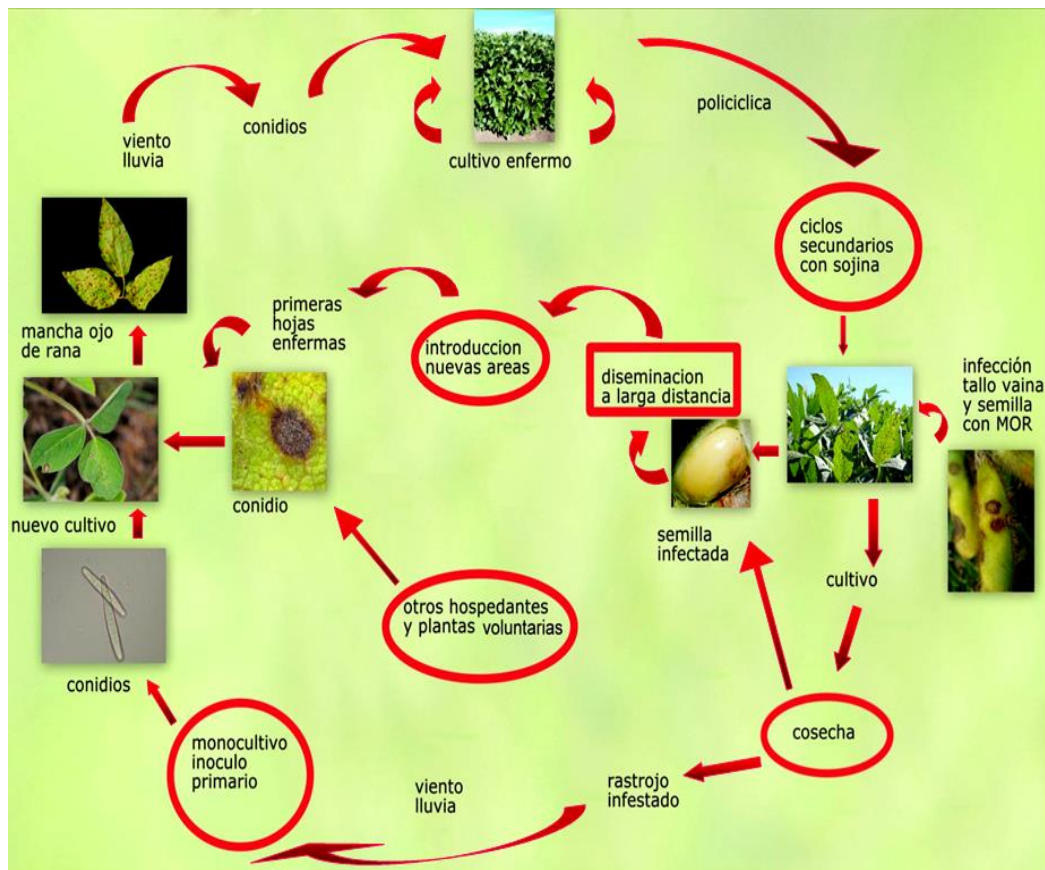


Figura 1.3: Ciclo de la enfermedad mancha ojo de rana. Fuente: Carmona y Di Núbila (Carmona, 2014).

1.1.4.5. Medidas de manejo

Las medidas de manejo que se utilizan para esta enfermedad son: rotación de cultivos, empleo de variedades resistentes a la enfermedad, uso de semilla libre de *C. soja* y/o tratadas con fungicida y la aplicación foliar de productos químicos (Ploper *et al.*, 2000; Lago *et al.*, 2010; Carmona *et al.*, 2010; Carmona, 2014).

Rotación de cultivos

La rotación de cultivos tiende a erradicar al patógeno de las áreas sembradas con soja previamente. La medida es efectiva si no se vuelve a sembrar soja en el mismo lote por al menos uno o dos años. Se utilizan para la rotación, cultivos que no sean susceptibles como maíz, sorgo, girasol, etc. Esta estrategia le produce la muerte al

patógeno por inanición o hambre, y resulta muy eficiente en especies como *C. sojina* que no posee estructuras de resistencia (Carmona *et al.*, 2010).

Variedades resistentes

El empleo de cultivares resistentes es la principal herramienta de manejo, y resulta un método eficaz y económico (Ploper *et al.*, 2000; Carmona, 2014). En Argentina se han incorporado genes de resistencia principalmente en GM largos VII y VIII, utilizados en el Noroeste Argentino debido al desarrollo inicial de la enfermedad en esa zona (Carmona *et al.*, 2010). Sin embargo, la existencia de razas del patógeno lleva a suponer que podrían ocurrir cambios en la reacción de los genotipos (Phillips, 1999). En Argentina se han descrito dos razas del patógeno, la raza 11 que predomina en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe y la raza 12 encontrada en las provincias de Santiago del Estero y Entre Ríos (Scandiani *et al.*, 2012). En otros países se encuentran identificadas un número mayor de razas, 12 en Brasil y 22 en Estados Unidos (Carmona *et al.*, 2010).

La incorporación de múltiples genes de resistencia reduce el impacto de razas del patógeno amenazantes de los cultivares de soja, sin embargo esta herramienta se vería afectada debido al incremento de la frecuencia de biotipos del patógeno capaces de superar a esos genes de resistencia. De este modo, cultivares que por muchos años fueron resistentes pueden experimentar quiebres de resistencia ocasionales, perdiendo esa capacidad de un año al otro (Yorinori 1989, 1992; Phillips, 1999; Martins *et al.*, 2002; Carmona *et al.*, 2010; Scandiani *et al.*, 2012).

Como se dijo anteriormente, en los últimos años ha disminuido la prevalencia e intensidad de mancha ojo de rana, probablemente debido a un recambio de cultivares. Las variedades muy susceptibles como DM 3700, DM 4613 y DM 4670 que representaban el 60% de la superficie sembrada en la zona núcleo durante la mayor

epidemia de Argentina (2010) fueron reemplazadas por otros cultivares de mejor comportamiento o resistentes a partir de 2011 y 2012, lo que representó una disminución de la prevalencia e intensidad de MOR en los años que siguieron.

Control químico

Este tipo de control es una de las medidas de manejo más utilizadas para combatir los daños ocasionados por MOR y otras enfermedades (Carmona *et al.*, 2010; Lago *et al.*, 2010; Carmona *et al.*, 2015 *b*). El tratamiento se realiza en semilla y como aplicación foliar. En semillas tiene el objetivo de controlar al patógeno vehiculizado por éstas, evitar la introducción del hongo en lotes libres de la enfermedad y disminuir el nivel de inóculo inicial, además de minimizar el riesgo de la posible introducción de nuevas razas (Carmona *et al.*, 2010).

Las aplicaciones foliares se realizan en función de los niveles de incidencia y severidad de la enfermedad, el estado fenológico del cultivo, el comportamiento sanitario de la variedad, estado general del lote y las condiciones ambientales, así como la asociación con otras posibles enfermedades presentes como las del complejo de EFC (Carmona, 2014). El impacto de los fungicidas en el manejo epidemiológico de la enfermedad, consiste en reducir la tasa epidemiológica, limitando el crecimiento del patógeno y de la enfermedad (Reis *et al.*, 2010). Sin embargo, los fungicidas no constituyen la clave fundamental del manejo químico, sino el saber accionar, es decir cuándo y cómo aplicarlos (Carmona *et al.*, 2010). En función de ello, existen recomendaciones basadas en el umbral de daño económico (UDE), definido como la intensidad de enfermedad (%) que causa una pérdida de cosecha equivalente al costo de control (March *et al.*, 2011). En el año 2015 Carmona *et al.* realizaron la primera determinación del UDE de MOR para cultivares de soja susceptibles a la enfermedad. Este umbral involucra aspectos económicos y epidemiológicos al considerar factores

como, la intensidad de la enfermedad, costo de control, precio de la soja, rendimiento potencial del cultivo y eficiencia de control del fungicida.

Los principales fungicidas utilizados para MOR son las moléculas del grupo químico bencimidazoles, estrobilurinas y triazoles, aplicados en mezclas. Los bencimidazoles interfieren la mitosis, dando como resultado la muerte de la célula, las estrobilurinas actúan bloqueando la transferencia de electrones afectando la respiración mitocondrial y los triazoles inhiben la síntesis del ergosterol (Hewitt, 1998). Las mezclas de estrobilurinas más triazoles son efectivas para *C. soja* logrando un eficiente control de MOR (Carmona *et al.*, 2010), así como el uso de bencimidazoles solos o en mezclas (Carmona y Scandiani, 2009; Scandiani *et al.*, 2009; Couretot *et al.*, 2009). Sin embargo, son numerosos los reportes de resistencia de patógenos a estos fungicidas (FRAC, 2010, 2017). La resistencia es un término que refiere a una adquirida y heredable reducción de la sensibilidad de un hongo a un principio activo anti-fúngico específico (Beckerman, 2013). Este proceso se explica por el hecho de que algunos individuos de la población fúngica logran sobrevivir, multiplicarse y propagarse, a pesar de haber sido expuestos a la aplicación de un fungicida que normalmente controlaba a esa población (Hobbelen *et al.*, 2014). El nivel de riesgo de aparición de resistencia a los fungicidas por parte del patógeno es proporcional a la especificidad del mecanismo de acción del fungicida. Los fungicidas más específicos y selectivos, están más predispuestos a la resistencia, reducción o pérdida de la sensibilidad (Reis y Carmona, 2012).

Durante los últimos años se ha incrementado significativamente el número de reportes de resistencia generando una inédita preocupación mundial (Hollomon, 2015; Kretschmer, 2012; Leadbeater, 2012; Oliver y Hewitt, 2014). Por lo tanto, el surgimiento de esta problemática a los diferentes principios activos en los hongos

agentes causales de enfermedades es hoy uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la agricultura moderna (Deising *et al.*, 2008; Hollomon, 2015; Lucas *et al.*, 2015). Es por ello que, la determinación de la sensibilidad a un fungicida particular en una población de hongos fitopatógenos es el primer paso para desarrollar un programa de manejo de la resistencia a los fungicidas. Para conocer la sensibilidad de un hongo a un fungicida y la fungitoxicidad de una sustancia química, existen parámetros como, la CI_{50} (concentración que inhibe el 50% del crecimiento micelial o germinación de esporas) que sirve para conocer la variabilidad entre aislados de una población a un mismo grupo de fungicidas y para comparar la potencia fungitóxica entre fungicidas a un mismo aislado (Carmona *et al.*, 2011; Carmona y Reis, 2013; Reis *et al.*, 2015). Uno de los principales usos de éste parámetro es el monitoreo de la sensibilidad de las cepas en el tiempo (Russell, 2003; Wise *et al.*, 2008; Bradley y Pedersen, 2011). Esta concentración es específica para cada combinación entre un ingrediente activo fungicida particular y una muestra de una población de un patógeno determinado. Cuanto menor sea la CI_{50} representa una alta acción fungicida con una baja concentración de sustancia química (Reis *et al.*, 2010; Tonin *et al.*, 2013). Otro parámetro para medir la reducción de la sensibilidad de un patógeno, es el factor de reducción de sensibilidad (FRS), que es una magnitud de la diferencia entre la CI_{50} de linajes sensibles (concentración de referencia o base) y la CI_{50} del aislado sospechado de tener la sensibilidad alterada ($FRS = CI_{50}$ del linaje sospechado / CI_{50} del linaje sensible) (Russel, 2003; Reis *et al.*, 2010). Si el FRS fuera 1,0, la sensibilidad no ha sufrido alteración. Si fuera $>1,0$ indica que está habiendo reducción de la sensibilidad. Por lo tanto, si la CI_{50} base o de referencia se alterase en el tiempo hacia valores mayores con el uso repetido de un fungicida en una misma región buscando el control de un determinado patógeno, podría indicar que está ocurriendo selección de ese hongo objeto de control en la dirección hacia la

insensibilidad a aquella sustancia química. Por consiguiente, el monitoreo de la sensibilidad a fungicidas, en una población de patógenos, es importante para determinar la presencia de linajes resistentes, de manera de poder mantener la eficiencia del control químico en el tiempo (Carmona y Reis, 2011).

1.1.4.6. Resistencia de *C. soja* a fungicidas

Existen en la actualidad numerosos reportes de resistencia de *C. soja* a los fungicidas utilizados comúnmente para su control (Bradley *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Peretti *et al.*, 2012; Price, 2013; Zeng *et al.*, 2015; Smatnik *et al.*, 2017).

En el año 2010 se informó la resistencia en 5 localidades de Estados Unidos, aumentando a 32 en el 2012. Experiencias con estrobilurinas demostraron un aumento significativo de las CI_{50} , desde 0,01271 $\mu\text{g/ml}$ a 3 $\mu\text{g/ml}$ para azoxystrobina, de 0,00027 $\mu\text{g/ml}$ a 0,3 $\mu\text{g/ml}$ para pyraclostrobina y de 0,0016 $\mu\text{g/ml}$ a 6 $\mu\text{g/ml}$ en trifloxystrobina indicando pérdida de sensibilidad del patógeno a esos compuestos (Bradley *et al.*, 2010). Por otra parte, Zhang *et al.* (2012) detectaron en ese país 15 aislamientos de *C. soja* altamente resistentes a las estrobilurinas, con valores de CI_{50} aproximadamente 249 a 7144 veces mayores que la concentración de referencia (línea de base) para azoxystrobina, pyraclostrobina y trifloxystrobina. Además, Zeng *et al.* (2015) comprobaron que estos aislados de *C. soja* contienen la mutación G143A en el gen del citocromo *b*, característica que los hace resistentes a esos fungicidas. En Argentina, se observó pérdida de sensibilidad a fungicidas estrobilurinas y bencimidazoles en 5 aislados regionales de *C. soja*. En este caso, se utilizó para la determinación, la concentración inhibitoria mínima (CIM), que se define como la menor concentración del compuesto que inhibe completamente el crecimiento visible del hongo. Como resultado, algunos aislados fueron poco sensibles a pyraclostrobina, mientras que 2 de

los 5 aislados evaluados demostraron elevada resistencia a la acción del fungicida bencimidazol (Peretti *et al.*, 2012). En la actualidad en Ohio (USA) se reportó la existencia de cepas de *C. soja* susceptibles y resistentes presentes en los mismos lotes, lo que generaría altas poblaciones insensibles del patógeno a los controles químicos utilizados (Smatnik *et al.*, 2017).

1.1.4.7. Respiración alternativa

Otro posible mecanismo de resistencia desarrollado por el hongo, es el de poseer una vía de respiración alternativa (Kubiuk *et al.*, 1980). Esta vía se da a nivel de la membrana mitocondrial por una oxidasa alternativa (AOX) que se encuentra implicada en la regulación del crecimiento, el desarrollo y la resistencia al estrés oxidativo y permitiría la germinación de esporas aún con dosis altas de fungicidas del grupo estrobilurinas o QoI (inhibidores de la respiración del hongo por bloqueo del transporte de electrones) (Minagawa y Yoshimoto, 1987; Bartlett *et al.*, 2002; Hong-Jie Liang *et al.*, 2015). Publicaciones al respecto exponen que el agregado del ácido salicil hidroxámico (SHAM) podría cortar el efecto de la AOX considerando que los metabolitos secundarios de la planta no inhibirían a la oxidasa y que SHAM tendría una toxicidad directa sobre el patógeno (Hong-Jie Liang *et al.*, 2015).

Por lo expuesto anteriormente, resulta necesario generar información precisa referente a la variabilidad poblacional de fitopatógenos y su relación con la sensibilidad a fungicidas en condiciones de laboratorio y ambientes controlados (Reis *et al.*, 2010; Avozani, 2011). De ese modo, se logran medidas efectivas para evitar el surgimiento de la resistencia. Ya que, cuando se detecta por primera vez disminución de la eficiencia de control de los fungicidas a campo, la subpoblación resistente del patógeno

probablemente ya ha evolucionado durante muchas generaciones y esté presente en una frecuencia de 1% o más (Carmona *et al.*, 2017).

En Argentina, para *C. sojina*, son prácticamente nulos los estudios realizados para conocer la sensibilidad a fungicidas utilizados en cultivos extensivos de grano. Asimismo, una posible vía de respiración alternativa como mecanismo de resistencia en este fitopatógeno es desconocida.

Este trabajo busca estudiar la sensibilidad *in vitro* de aislados de *C. sojina* frente a fungicidas utilizados comúnmente para su control, caracterizar micro morfológicamente cada uno de esos aislados, comprobar si existe variabilidad entre aislados a diferentes dosis de las moléculas químicas ensayadas, determinar un posible mecanismo alternativo de respiración del hongo, clasificar la potencia de los fungicidas y analizar el comportamiento de los aislados más y menos sensibles a la aplicación del fungicida más potente en plantas de soja.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

El objetivo general del proyecto es estudiar la sensibilidad a fungicidas de aislados de *C. sojina* Hara.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar micro-morfológicamente aislados de *C. sojina* de distinta procedencia geográfica.

2. Establecer la sensibilidad *in vitro* del patógeno a fungicidas triazoles, estrobilurinas y bencimidazoles a diferentes concentraciones mediante la determinación de la CI₅₀ para cada molécula.
3. Comparar el comportamiento y sensibilidad de los aislados a los fungicidas evaluados.
4. Determinar si *C. sojina* posee la capacidad de utilizar una vía de respiración alternativa *in vitro* frente a la exposición de fungicida estrobilurina.
5. Realizar una clasificación de la potencia de los fungicidas más frecuentemente usados en el cultivo de soja para los diferentes aislados testeados.
6. Analizar el comportamiento en plantas de soja de los aislados más y menos sensibles aplicando el fungicida que haya resultado más potente.

1.3. Hipótesis

Hipótesis 1: La sensibilidad de los diferentes aislados de *C. sojina in vitro*, es variable en función de la raza, procedencia geográfica y de las distintas concentraciones de fungicidas utilizados.

Hipótesis 2: Los fungicidas que normalmente se utilizan en el cultivo de soja presentan diferentes CI₅₀.

Hipótesis 3: Las moléculas del grupo químico de los bencimidazoles resultan las más fungitóxicas a todos los aislados.

Hipótesis 4: El patógeno presenta una vía de respiración alternativa que le confiere resistencia a altas dosis de estrobilurinas.

Hipótesis 5: El comportamiento de los aislados más y menos sensibles frente a la aplicación del fungicida con más potencia en plantas de soja, es similar al observado *in vitro*.

CAPÍTULO 2

Caracterización micro-morfológica de aislados de

C. soja

2.1 Introducción

Caracterizar una especie significa determinar los atributos peculiares que la diferencia del resto y la distingue de las demás (Real Academia Española, 2018). En la investigación de microorganismos fitopatógenos resulta esencial la identificación y caracterización del hongo, ya que permite estudios taxonómicos, pruebas de patogenicidad, inoculaciones asistidas para evaluar el comportamiento de líneas avanzadas y genotipos, identificación de razas, ensayos de fungitoxicidad, intercambio con otros países para la construcción de árboles filogenéticos, entre otras cosas (Ferri *et al.*, 2011; Scandiani *et al.*, 2012). Para ello, es necesario brindarle al patógeno el medio de cultivo adecuado para su crecimiento en condiciones de laboratorio, intentando simular su hábitat natural en relación con la satisfacción de sus necesidades vitales como ser vivo (Gómez y Batista, 2006). Se destacan para el crecimiento adecuado de hongos que afectan a las plantas, los medios de cultivo agar zanahoria (AZ), agar V8 (V8, jugo de ocho frutas) y agar papa glucosado (APG). En la elección del medio apropiado Formento *et al.*, 2011, mencionan a los dos primeros como buenos para la esporulación de los cultivos y aptos para una correcta caracterización. Otros estudios de condiciones de desarrollo y esporulación *in vitro* de cepas de *Cercospora* que infectan soja, afirman que el medio más favorable para el desarrollo de las cepas es APD (Agar Papa Dextrosa) (Lo Piccolo *et al.*, 2013). Sin embargo, el medio más conveniente y las mejores condiciones para el patógeno, dependen fundamentalmente de cada cepa (Mattio, 2006). Por otra parte, los métodos de conservación resultan fundamentales para lograr el mantenimiento adecuado en el tiempo de los cultivos patogénicos, ya que aseguran la viabilidad e integridad morfológica, fisiológica y genética, así como el mantenimiento de las características de la cepa original (Gato Cárdenas, 2010). Estos métodos emplean como factores de respuesta el potencial de viabilidad, la estabilidad y

presencia o ausencia de cambios en las características macro y microscópicas. Algunos de ellos son; criopreservación, liofilización y cultivo periódico con y sin aceite mineral (Pinzón Gutiérrez *et al.*, 2009).

En este capítulo se informa sobre la caracterización micro-morfológica aislados de *C. sojina* mediante el uso de diferentes medios de cultivos, formas de preservación del fitopatógeno y observaciones en microscopio óptico y electrónico, cumpliendo de este modo, con el objetivo específico número 1.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Colección de muestras y descripción morfológica de aislados de *C. sojina*

Las cepas utilizadas en este estudio provienen del laboratorio del Centro de Referencia de Micología (CEREMIC), perteneciente a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario. Se repicaron un total de 18 aislados, provenientes de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y Santiago del Estero. Luego, se eligieron 6, dos provenientes de Buenos Aires y uno de cada provincia restante. Éstos aislados se seleccionaron por sus características morfológicas, facilidad de cultivar *in vitro* y porque fueron obtenidos de zonas dónde la enfermedad se presentó de manera explosiva en la epidemia ocurrida en los años 2009-2010. Asimismo, 3 de ellos han sido caracterizados a nivel de razas. Se encuentran rotulados según criterio del CEREMIC y se presentan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Aislados de *C. soja* utilizados para pruebas de fungitoxicidad *in vitro*.

Aislado	Procedencia	Raza
CCC: 172-09	Venado Tuerto, Santa Fe.	Raza 11
CCC: 232-10	Vuelta Obligado, Buenos Aires.	Raza 11
CCC: 234-10	Selva, Santiago del Estero.	Raza 12
CCC: 243-10	Nogoyá, Entre Ríos.	Sin determinar
CCC: 269-10	Pergamino, Buenos Aires.	Sin determinar
CCC: 278-10	Cañada de Luque, Córdoba.	Sin determinar

CCC: Número asignado por la Colección de Cultivos del CEREMIC

Posteriormente, se realizó una descripción morfológica en medio de cultivo APG, donde se observaron características externas de las colonias como, diámetro, color, forma y textura.

2.2.2 Caracterización micro-morfológica de aislados de *C. soja*

Mediante el uso de microscopio óptico, se observaron diversas colonias de los seis aislados del patógeno. Se midió tamaño de las estructuras reproductivas (conidióforos y conidios), se contó número de septos de los conidios y se comparó entre aislados. Para la medición, se utilizó como unidad de medida 100 conidios para cada aislado. Finalmente, se obtuvieron imágenes de las estructuras reproductivas en microscopio óptico y electrónico perteneciente al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la UAT- CCT- CONICET de Bahía Blanca, con magnitud de imagen superior, y se compararon las imágenes obtenidas de conidios y conidióforos.

2.2.3 Preparación de medios de cultivo necesarios para el estudio de aislados de *C. soja*.

Para evaluar crecimiento y desarrollo de las colonias del hongo, se probaron distintos medios de cultivos (Figura 2.1). Se utilizó APG, con una composición de agar, papa, glucosa, carbonato de calcio y sulfato de magnesio (Mac Faddin, 1985); AGAR ZANAHORIA, compuesto por agar y solución de zanahoria; V8 JUICE, utilizando el jugo V8 con ocho vegetales, agar, carbonato de calcio y clorafenicol, por último, el medio de cultivo SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) (Farmacopea Nacional Argentina, 2003), constituido por agar, sacarosa, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, nitrato de potasio y fosfato diácido de potasio. Sobre los medios de cultivo preparados se sembraron los distintos aislados, luego se colocaron en estufa de incubación a 27°C y alternancia de 12 horas luz y 12 de oscuridad, se observó diariamente el crecimiento en las placas de Petri. Por último, para la conservación del hongo, se realizaron repiques periódicos de las colonias.



Figura 2.1: Placas de Petri con diferentes medios de cultivo. SNA, V8, agar zanahoria y APG.

2.2.4 Conservación de aislados de *C. soja*


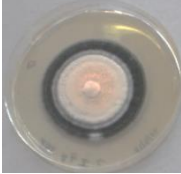



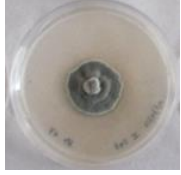






Se realizó en primera instancia el método de conservación por criopreservación, en donde se congelaron las células y tejidos del hongo para disminuir sus funciones vitales. Para ello se colocó una suspensión de conidios en crioviales que fueron llevados a heladera y a freezer de -70 °C. Posteriormente se colocó el patógeno en columna de agar con vaselina, que consistió en utilizar tubos de ensayo con medio de cultivo con APG en columna de 4-5 cm, sobre los cuales una vez crecido el hongo, se colocó 1,5 cm de vaselina estéril y se conservó a temperatura ambiente. Por último, se realizó la conservación en crioviales con cubos de agar, en este caso se dejó crecer el hongo en cajas de Petri, luego de comprobada la fructificación del mismo se cortaron con un bisturí cubos del medio con el hongo y se los colocó en crioviales estériles. Se llenaron con agua destilada estéril y se conservaron a temperatura ambiente.

2.3 Resultados

2.3.1 Descripción morfológica de aislados de *C. soja*

Se utilizó el medio de cultivo APG, debido a que resultó el más efectivo para el crecimiento y desarrollo de las colonias en comparación con agar zanahoria, agar V8 y SNA. Los aislados observados presentaron diámetro, color, forma y textura variables. El diámetro de las colonias con el mismo tiempo de incubación (15-20 días) varió desde 4 a 7 cm Respecto al color, se observaron grises, blancos y verdes, grises oscuros con manchas blancas, predominando colores oscuros. La forma fue similar en todos los aislados, circular con crecimiento radial, desuniforme en algunos casos. En cuanto a texturas se observó micelio aterciopelado, afelpado, liso y rugoso (Tabla 2.2).





Tabla 2.2: Imágenes de tamaño, color, forma y textura de aislados de *C. sojina*. (Las imágenes corresponden a colonias con períodos de crecimiento entre 15 y 20 días).

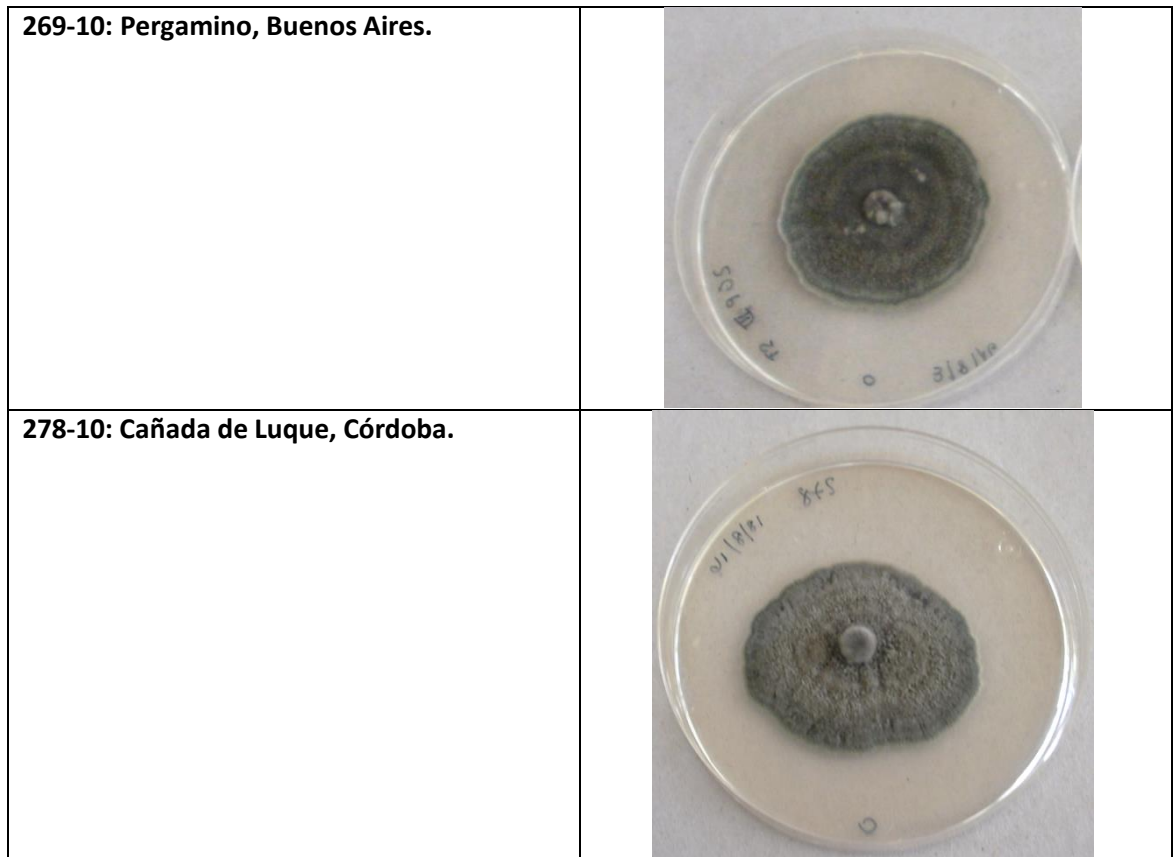
Aislados	Tamaño	Color	Forma	Textura
243-10; 232-10; 232-10 y 234-10				
172-09; 269-10; 269-10 y 232-10				
232-10; 243-10; 269-10 y 278-10				

2.3.2 Colección de muestras y caracterización morfológica de cada aislado

Durante la caracterización de los aislados de la colección de muestras obtenidas, se observaron diferencias en la morfología. El aislado 172-09, mostró un crecimiento radial uniforme, con coloración oscura negro-verdosa y textura lisa. Por otra parte, el aislado 232-10, tuvo crecimiento radial desuniforme, de color verde oscuro con contornos blancos y presentó textura rugosa. 234-10, de crecimiento radial uniforme, coloración grisácea con algunos sectores blancos, y su textura lisa, algo algodonosa y rugosa en algunos casos. El aislado 243-10, presentó rápido crecimiento, uniforme, de color gris-verdoso y con una textura rugosa bien marcada. 269-10, creció de manera radial uniforme, de color gris-verdoso y textura lisa. Por último, el aislado 278-10, tuvo crecimiento radial desuniforme, su color fue grisáceo y textura lisa a algodonosa (Tabla 2.3).

Tabla 2.3: Imágenes del desarrollo *in vitro* de aislados de *C. sojina* en medio de cultivo APG a los 15 días de incubación con horas de alternancia de luz y oscuridad.

Aislado / Procedencia	
172-09: Venado Tuerto, Santa Fe.	
232-10: Vuelta Obligado, Buenos Aires.	
234-10: Selva, Santiago del Estero.	
243-10: Nogoyá, Entre Ríos.	



2.3.3 Caracterización micro-morfológica de aislados de *C. sojina*

En las observaciones realizadas en microscopio óptico, los conidios de los distintos aislados presentaron medidas similares y el número de septos fue variable (Tabla 2.4), se encontraron algunos conidios hinchados y germinados (Figura 2.2). Las imágenes obtenidas en microscopio electrónico muestran las mismas características descritas anteriormente (Tabla 2.5). Todos los ejemplares observados fueron hialinos y truncados en la base. Los conidióforos observados presentaban coloración marrón, septados, rectos y sinuosos (Figura 2.3, Figura 2.4).

Tabla 2.4: Medición de conidios y medias de cada aislado, obtenidos del conteo de 100 conidios por aislado.

Aislado	Largo (μm)	Media	E.E	Ancho (μm)	Media	E.E.	n° septos	Media	E.E
172-09	25 – 50	37.5 A	3.35	5 – 10	7.35 AB	0.67	3 – 9	6 AB	0.63
232-10	20 – 52	36 A	4.05	8 – 10	9 B	0.33	6 – 8	7 B	0.30
234-10	17.5 – 100	58.75 B	6.51	5 – 10	7.5 AB	0.58	3 – 9	6 AB	0.60
243-10	18 – 47	32.5 A	3.63	5 – 7	6 A	0.33	4 – 7	4 A	0.30
269-10	22.5 – 75	48.75 AB	4.78	6 – 11	8.5 B	0.56	2 – 8	5 AB	0.56
278-10	17 – 80	48.5 AB	6.70	6 – 10	8 AB	0.61	4 – 8	6 AB	0.45

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), de acuerdo a ANOVA y test de Tukey.



Figura 2.2: Conidios de *C.sojina* observados en microscopio óptico.

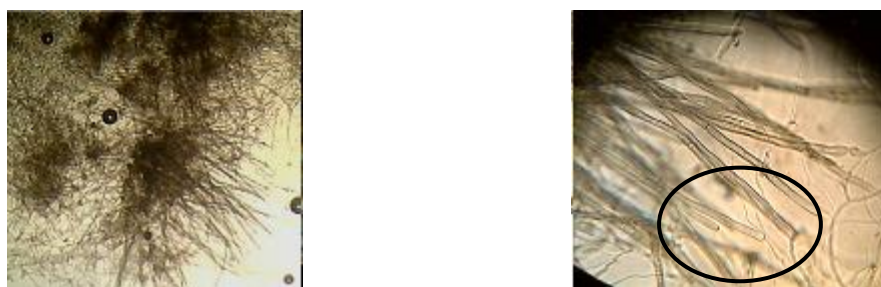


Figura 2.3: Conidióforos en aumento 10 y 40 x en microscopio óptico. Se observa la marca que deja el conidio al desprenderse.



Figura 2.4: Conidióforos observados en lupa estereoscópica

Tabla 2.5: Comparación de imágenes en microscopio electrónico y óptico de estructuras reproductivas de aislados de *C. sojae*.

Conidio de <i>C. sojae</i>		
Conidióforos de <i>C. sojae</i>		
Conidio de <i>C. sojae</i> con sus células hinchadas.		

2.4 Discusión

En la caracterización realizada, se observó diversidad en cuanto a textura, forma y tamaño de las colonias de los diferentes aislados ensayados (Tabla 2.2). El largo de los conidios fue similar en los aislados 243-10, 232-10 y 172-09, pero mostraron diferencias significativas con 234-10. 278-10 y 269-10 no difirieron de los anteriores. En cuanto al ancho, 243-10 presentó medidas significativamente diferentes a 269-10 y 232-10, pero sin diferencias con 172-09, 234-10 y 278-10. Por último, el número de septos fue diferente significativamente en el aislado 243-10 y 232-10, sin diferencias con el resto de los aislados (Tabla 2.4). Distinto fue informado por Formento *et al.* (2011), quienes observaron tamaño de conidios y número de septos similares en seis aislados diferentes de *C. sojina*.

Las medidas obtenidas de conidios en este trabajo, arrojaron valores medios de 23 – 67.3 μm de largo, 8 μm de ancho y número de septos con una media de 8 por conidio con un rango de 2 – 9 (Tabla 2.4), esto es similar a lo descrito por Reis (1974) y Carmona *et al.* (2009), quienes mencionan 24 -108 μm y 26 - 111 μm de largo, 6 - 8 μm y 5.2 - 7.4 μm de ancho y número de septos 0 -10 y 1 - 9 respectivamente. Otros autores han descrito medidas menores con medias de 20.3 - 26.8 μm de largo, 2.55 - 2.94 μm de ancho y número de septos 5 en promedio (Phillips, 1999; Ploper *et al.*, 2001; Mengistu *et al.*, 2002 y Gómez, 2011). Por otra parte, durante la observación de conidios, algunos de ellos presentaban como característica inusual las células de los septos hinchadas (Tabla 2.5), lo mismo se visualiza en las imágenes aportadas por Reis *et al.* (2012) (Figura 1, pág. 174).

De los cuatro medios ensayados para el crecimiento y caracterización de los seis aislados, el medio de cultivo utilizado (APG) dio mejores resultados. Esto coincide con lo expuesto por Mattio (2006), quien menciona al APD (Agar Papa Dextrosa) como el medio sobre el cual crecieron y se desarrollaron mejor cepas de *Cercospora* que afectan a soja. Otros autores destacan también el buen funcionamiento de este medio de cultivo, como Reyes Ramírez *et al.*, 2011 quienes observaron un crecimiento óptimo de los fitopatógenos en medios que contenían APD. Asimismo, la comunidad científica alrededor del mundo ha utilizado a este medio con óptimos resultados para crecimiento, mantenimiento y aislamiento de todo tipo de hongos, desde parásitos de insectos, fitopatógenos y saprófitos (Stefanova *et al.*, 1999; Cañedo y Ames, 2004; Hernandez y Roson 2005; Gómez y Batista, 2006; Suárez-Contreras, 2006; Carnauba *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2015; Lovato Echeverría *et al.*, 2015; Kenneth *et al.*, 2018). Sin embargo, Camera *et al.*, (2017), en ensayos de producción de inóculo de *Passalora sojina* (sin. *Cercospora sojina* Hara.), observaron la mayor producción de conidios en medios como FTJ (jugo de tomate) y V8 (jugo de ocho vegetales). Otras investigaciones destacan también a V8 y AZ (agar zanahoria) (Formento *et al.*, 2011).

De los métodos de preservación utilizados, la criopreservación permitió mantener los aislados en buen estado durante todo el ensayo. Pinzón *et al* (2009) afirman que este método minimiza el riesgo de pérdida del material biológico y brinda condiciones de manejo que conservan las características biológicas bajo estudio. Otros autores mencionan a esta técnica como eficiente para la conservación de microorganismos (Crespo, *et al.*, 2000; Gato Cárdenas, 2010; Lo Piccolo *et al.*, 2013; Recalde Rodríguez *et al.*, 2017).

Se presentó como inconveniente, disminución del desarrollo de estructuras reproductivas, característica conocida en cepas de *C. sojina* luego de un tiempo de almacenamiento (Luque, 2017 Com. Per.).

2.5 Conclusiones

En este capítulo se caracterizó micro-morfológicamente a diferentes aislados de *C. sojina* de distinta procedencia geográfica. La caracterización descrita constituye una base importante para el conocimiento específico del agente causal de la enfermedad mancha ojo de rana ya que, teniendo en cuenta los rasgos particulares de la especie *sojina* se contribuye a lograr un diagnóstico certero y útil de la enfermedad. Asimismo, es destacable mencionar que no hay, hasta el momento, información actualizada en el país al respecto.

Mediante las características descritas en este capítulo, se podrán realizar estudios moleculares futuros que permitirán conocer nuevas razas virulentas del patógeno potenciales generadoras de resistencia.

CAPÍTULO 3

**Determinación de sensibilidad *in vitro* e *in vivo* de
C. sojina a fungicidas utilizados comúnmente para su
control.**

3.1 Introducción

Los fungicidas que comúnmente se utilizan para el control de la MOR son de la familia de los bencimidazoles y las mezclas de estrobilurinas y triazoles (Carmona *et al.*, 2010). Los primeros actúan sobre la unión de la tubulina de los hongos durante la mitosis inhibiendo la división celular (Figura 3.1) y provocan efectos negativos sobre la germinación de esporas y el crecimiento de hifas (Davidse, 1986; Price, 2013). Las estrobilurinas inhiben la respiración mitocondrial por el bloqueo de la transferencia de electrones (Figura 3.2) y los triazoles inhiben la formación del ergosterol (Figura 3.3), componente lipídico que permite mantener la impermeabilidad de la pared celular del hongo (Pontón, 2008). La combinación de diferentes grupos químicos, aumenta el espectro de acción y previene la posibilidad de resistencia de los hongos a un modo de acción específico (Carmona, 2010). Sin embargo, el uso reiterado de estos principios activos puede provocar una disminución de la sensibilidad de las poblaciones de patógenos y el surgimiento de mutaciones que confieren resistencia (Gisi *et al.*, 2002; Carmona y Reis 2013; FRAC, 2017). La resistencia a fungicidas se puede adquirir por mutaciones simples en genes del patógeno o por el incremento de la frecuencia de las subpoblaciones que tienen menor sensibilidad de forma natural (Brent y Hollomon, 2007). En bencimidazoles se ha asociado a la presencia de mutaciones puntuales en el gen de la β - tubulina que da lugar a la alteración de aminoácidos en su sitio de unión (Sanchez Torres, 2007). La resistencia a estrobilurinas es generada por la mutación G143A y F129L en el gen *cyt b*, así como en mecanismos adicionales del transporte de electrones (Zeng *et al.*, 2015; FRAC, 2017). En triazoles, la resistencia se ha reportado por mutaciones en los sitios específicos V136A, Y137F, A379G del gen *cyp51* en el transporte de electrones (FRAC, 2017).

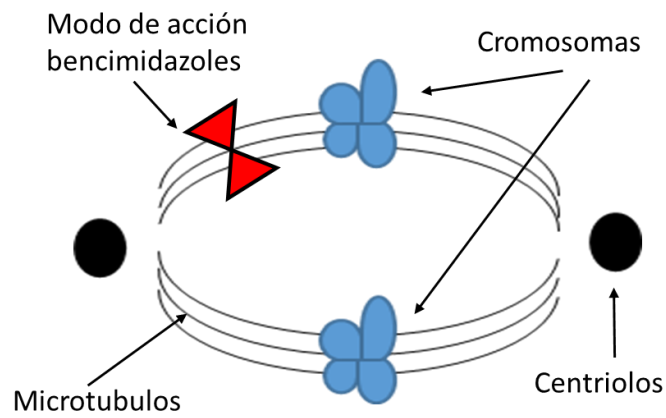


Figura 3.1: Inhibición de formación del huso mitótico que dará lugar a la división celular del hongo. Modo de acción de fungicidas bencimidazoles (Bravo, 2018).

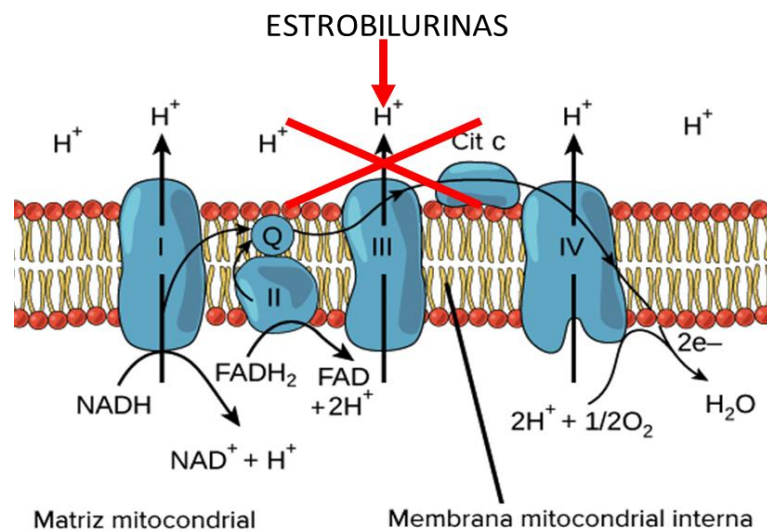


Figura 3.2: Inhibición del transporte de electrones en la cadena respiratoria del hongo. Modo de acción de fungicidas estrobilurinas. Adaptado de: "Fosforilación oxidativa: Figura 3", de Openstax College, Biología (CC BY 3.0).

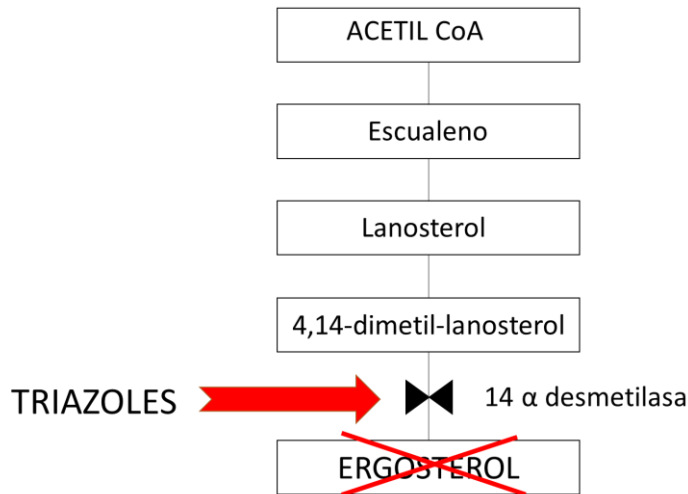


Figura 3.3: Bloqueo de la 14 α -desmetilasa en la formación del lípido ergosterol presente en la pared celular. Modo de acción de fungicidas triazoles (Bravo, 2018).

El monitoreo de la sensibilidad a fungicidas en una población de patógenos, es una herramienta importante para determinar la presencia de linajes resistentes y de ese modo, mantener la eficiencia del control químico en el tiempo (Carmona y Reis, 2011). Con este objetivo, existe en la literatura diferente metodología descripta para medir la fungitoxicidad de una sustancia química, que incluyen ensayos *in vitro* e *in vivo* (Tonin *et al.*, 2012). La sensibilidad de un hongo a un fungicida y la fungitoxicidad de una sustancia química *in vitro* se miden por la CI_{50} (concentración que inhibe el 50% del crecimiento micelial o germinación de esporas). Cuanto menor sea la CI_{50} más alta será la acción fungicida con una baja concentración de sustancia química (Reis, *et al.*, 2010; Tonin, *et al.*, 2013). De acuerdo con la clasificación propuesta por Edgington *et al.* (1971), los aislados para los que un principio activo tienen una CI_{50} de 50 ppm o más, son considerados insensibles a tal principio activo. Los que tienen una CI_{50} entre 1 y 10 ppm son considerados moderadamente sensibles, y aquellos aislados con una CI_{50}

menor a 1 ppm son considerados altamente sensibles. Por otra parte, los fungicidas con valores de CI_{50} menores a 1ppm se consideran de alta fungitoxicidad, aquellos con valores entre 1 y 10, moderadamente fungitóxicos y los que presenten valores mayores a 50 ppm, sin fungitoxicidad (Edgington *et al.*, 1971). Para el análisis de este tipo de datos microbiológicos los modelos de regresión no lineales son recomendados sobre otros modelos convencionales, ya que permiten hacer siempre predicciones biológicamente significativas, y en la mayoría de los casos predecir valores cercanos a la observación (Zhao *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2002; Sholberg, *et al.*, 2003; Molina Vargas, *et al.*, 2010). Por otra parte, los ensayos *in vivo* más comúnmente usados se realizan bajo condiciones controladas y sobre hojas aisladas o plantas enteras (Ghini y Kimati, 2000; Miller y Gubler, 2004; Reis *et al.*, 2005; Ardium, 2009; Latorre Rapela *et al.*, 2013). Estos métodos permiten controlar la posible pérdida de sensibilidad y posteriores fallas a campo (Tonin *et al.*, 2012).

En Argentina son prácticamente nulos los estudios realizados sobre la sensibilidad de *C. sojina* a principios activos usados para su control, por lo tanto, la medición del grado de sensibilidad de aislados regionales a fungicidas permitiría conocer la existencia de selección del hongo en dirección hacia la insensibilidad y el posible surgimiento de resistencia (Carmona y Reis, 2011).

Los objetivos de esta parte del estudio fueron, (i) establecer la sensibilidad *in vitro* de aislados de *C. sojina* a fungicidas de la familia de los bencimidazoles y mezclas de estrobilurinas más triazoles, (ii) comparar la sensibilidad de los aislados, (iii) realizar una clasificación de la fungitoxicidad de los fungicidas estudiados y (iv) analizar el comportamiento en plantas de soja de los aislados más y menos sensibles aplicando el fungicida que haya resultado más fungitóxico.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Aislados de *C. soja* utilizados para la determinación de sensibilidad *in vitro*

Se utilizaron los seis aislados caracterizados en el capítulo 2, provenientes de diferente procedencia geográfica, tres de ellos con razas identificadas (Tabla 2.1). Los aislados se obtuvieron de la Colección de Cultivos del Centro de Referencia de Micología (CEREMIC), perteneciente a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

3.2.2 Fungicidas utilizados

Se ensayaron cinco fungicidas, cuatro de ellos compuestos por mezclas de estrobilurinas y triazoles, y uno del grupo químico bencimidazol (Tabla 3.1). Fueron elegidos por ser aquellos comúnmente usados para el control de MOR.

Tabla 3.1: Fungicidas utilizados en las pruebas de fungitoxicidad *in vitro*, principios activos de cada uno, nombre comercial y empresa.

Principios activos	Nombre comercial	Empresa
Pyraclostrobina 13.3% + cyproconazole 5%	Opera	BASF Argentina S.A.
Picoxystrobina 20% + cyproconazole 8%	Stinger	DuPont Argentina S.R.L.
Trifloxystrobina 37.5% + cyproconazole 16%	Sphere Max	Bayer S.A.
Azoxystrobina 20% + cyproconazole 8%	AmistarXtra	Syngenta Agro S.A.
Carbendazim 50%	Carbendazim 50	NUFARM S.A.

3.2.4 Determinación de la CI₅₀

Se adicionaron concentraciones variables de los fungicidas [0 (testigo); 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0, 20,0 y 40 µg/ml] a un medio estéril agar papa glucosado (APG, Britania) (Carmona *et al.*, 2017). Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, con 4

repeticiones. Cada ensayo se realizó por triplicado. El medio preparado, con distintas concentraciones de cada fungicida, se volcó en placas de Petri y en el centro de cada una de ellas se ubicó un disco de agar de 6 mm conteniendo micelio activo del patógeno. Las placas inoculadas se incubaron en cámara de cultivo a 25-27°C con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad (Figura 3.4).



Figura 3.4: Placas de Petri con los seis aislados y dosis de fungicidas ensayados en medio APG, incubándose en cámaras de cultivo.

En cada placa, se midieron dos diámetros perpendiculares de la colonia luego de 15 días de incubación y se tomaron fotografías del crecimiento fúngico. El análisis estadístico se realizó con el software estadístico R versión 3.2.5 (R Core Team, 2013). Para cada combinación fungicida-aislado se realizó un análisis de regresión no lineal. Se utilizó como variable de respuesta el crecimiento relativo (diámetro de colonia de las placas con fungicida / diámetro de la colonia de control sin fungicida). Se ajustaron tres modelos para cada combinación patógeno - fungicida; los modelos asimétricos Weibull tipo I (W1.4) y tipo II (W2.4) y log-logístico de cuatro parámetros (LL.4). Las ecuaciones de cada modelo se observan en la tabla (Tabla 3.2) (Ritz *et al.*, 2015). Para evaluar los modelos matemáticos propuestos se comparó las CI_{50} usando como criterio de clasificación a los fungicidas. Se realizó un test no paramétrico de

Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5%, mediante el software estadístico InfoStat (2011). El modelo con mejor ajuste, menores valores de CI_{50} y acorde a reportes previos, fue seleccionado para cada combinación fungicida-aislado (Zhang *et al.*, 2012; Carmona *et al.*, 2017). Para conocer el fungicida más potente, se realizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis, debido a que la distribución de los datos no presentó normalidad. La sensibilidad de los aislados se evaluó mediante un ANOVA y se comparó con test de Tukey realizados con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

Tabla 3.2: Ecuaciones de regresión no lineal para cada modelo: log-logístico de cuatro parámetros (LL.4), asimétrico Weibull tipo I (W1.4) y II (W2.4).

Modelo	$f(x,(b,c,d,e))=$
LL.4	$c+((d-c)/1+\exp(b(\log(x)-\log(e))))$
W1.4	$c + (d-c)\exp(-\exp(\log(x)-\log(e)))$
W2.4	$c + (d-c)(1-\exp(-\exp(b(\log(x)-\log(e))))$

Como criterio de clasificación de sensibilidad de los aislados y fungitoxicidad de los fungicidas se utilizó la escala propuesta por Edgington *et al.* (1971) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Criterio de sensibilidad de hongos a fungicidas y de fungitoxicidad de acuerdo con la escala propuesta por Edgington *et al.* (1971). Escala de sensibilidad basada en la CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$).

Escala de CI_{50}	Sensibilidad del hongo	Fungitoxicidad del fungicida
<1	Muy sensible	Alta fungitoxicidad
1 a 10	Moderadamente sensible	Moderada fungitoxicidad
10 a 50	Poco sensible	Baja fungitoxicidad
>50	Insensible	Sin fungitoxicidad

3.2.5 Ensayo *in vivo*

Se trabajó con los aislados de mayor y menos valor de CI_{50} y el fungicida más fungitóxico resultantes de las pruebas de sensibilidad *in vitro*. Se sembró el genotipo Don Mario 4670, susceptible a MOR (Carmona *et al.*, 2010), en macetas de 15 cm de diámetro y 15 cm de profundidad. Se colocaron 15 semillas por maceta y una vez emergidas las plantas se raleo a 5 por maceta. Luego se regó periódicamente hasta el momento de inoculación de los aislados del patógeno. La inoculación de las plantas se realizó en estado fenológico V2 - V3 (segunda hoja trifoliada bien expandida y la tercera sin expandir) con una concentración de conidios de 1×10^5 conidios/ml, a la que se adicionó una gota de Tween 20 (1 ml/l) como surfactante, utilizando un aspersor manual. Las plantas inoculadas se mantuvieron en cámara húmeda mediante bolsas de polietileno transparentes y dejando las macetas en bandejas con agua. Se realizaron seis tratamientos: T1, tratamiento control sin inoculación ni fungicida; T2, sin inoculación más fungicida; T3, inoculado con aislado de menor valor de CI_{50} sin fungicida, T4, inoculado con aislado de mayor valor de CI_{50} sin fungicida; T5 inoculado con aislado de menor valor de CI_{50} más fungicida; T6, inoculado con aislado de mayor valor de CI_{50} más fungicida. El fungicida se aplicó con un aspersor manual, posteriormente a la inoculación de los aislados. Luego de 72 horas se retiraron las bolsas y a los 21 DDI (días después de inoculación) se realizó la lectura de incidencia y severidad sobre 10 hojas trifoliadas. Para corroborar la presencia del agente patógeno, se observaron los síntomas bajo lupa estereoscópica (10 – 40 x) y en microscopio óptico. La incidencia foliolar se calculó contando el número de folíolos centrales enfermos sobre el total de folíolos por cien (Carmona *et al.*, 2010) y se usó de referencia la escala propuesta por

Distéfano y Gabdán (2009) (Figura 3.5). El ensayo se realizó bajo condiciones semicontroladas con aireación, luz natural y temperaturas entre 20 y 35 °C.

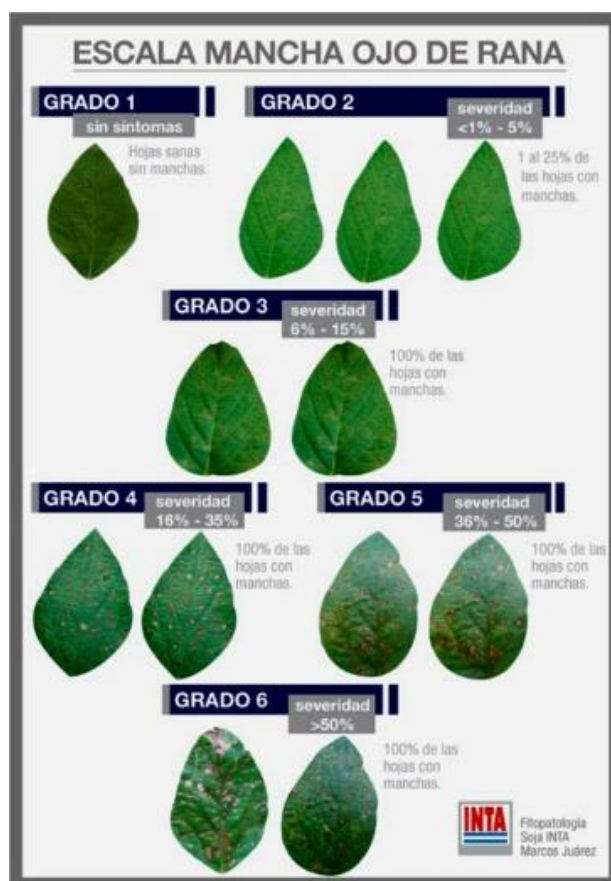


Figura 3.5: Escala de severidad de mancha ojo de rana propuesta por Distéfano y Gabdán (2009).

Para evaluar el efecto de los aislados y su control, se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con 6 tratamientos y 8 repeticiones (Tabla 3.4). Las macetas se colocaron en invernáculo sobre mesadas de acuerdo al diagrama de la Figura 3.6 con condiciones de temperatura y humedad semicontroladas en rangos que fueron desde 14,25 a 35,9 °C (con mínimas de 4.7 y máximas de 40 °C) y 56 % de humedad (con 15 % de mínima y 93% de máxima).

Tabla 3.4: Descripción de los tratamientos planteados en ensayo de sensibilidad *in vivo*.**TRATAMIENTOS**

T1	Testigo sin inoculación ni fungicida
T2	Sin inoculación más fungicida(*)
T3	Inoculado con aislado de menor valor de CI ₅₀ sin fungicida
T4	Inoculado con aislado de mayor valor de CI ₅₀ sin fungicida
T5	Inoculado con aislado de menor valor de CI ₅₀ más fungicida
T6	Inoculado con aislado de menor valor de CI ₅₀ más fungicida

(*) Fungicida más potente.

T3 R1	T1 R3	T2 R5	T4 R7	T5 R3	T6 R6	T5 R8	T2 R7
T6 R3	T5 R5	T1 R1	T6 R5	T4 R1	T5 R7	T3 R6	T6 R8
T3 R4	T5 R2	T4 R3	T4 R2	T1 R6	T2 R3	T3 R7	T5 R4
T1 R7	T6 R1	T4 R4	T3 R3	T2 R8	T1 R2	T2 R4	T3 R5
T4 R5	T6 R2	T3 R8	T5 R6	T2 R2	T4 R6	T1 R5	T6 R4
T2 R6	T1 R4	T4 R8	T5 R1	T3 R2	T1 R8	T2 R1	T6 R7

Figura 3.6: Diagrama de ensayo en invernáculo.

Finalmente, se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis (debido a que la distribución de los datos no presentó normalidad) para conocer el efecto de los fungicidas sobre cada aislado.

3.3 Resultados

3.3.1 Modelos matemáticos para cálculo de concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀)

Los resultados del test no paramétrico de Kruskal Wallis para evaluar los modelos de ajuste propuestos arrojaron un p- valor no significativo (p 0.4497) (apéndice

1), por lo tanto, no existen diferencias significativas entre los modelos log-logístico de cuatro parámetros (LL.4), asimétrico Weibull tipo I (W1.4) y II (W2.4). Se eligieron los modelos (W1.4) para los fungicidas pyraclostrobina + epoxiconazole; picoxystrobina + cyproconazole; trifloxystrobina + cyproconazole y azoxystrobina + cyproconazole y (W2.4) para carbendazim por proporcionar los valores estimados más pequeños de CI_{50} y similares a estudios realizados con el mismo patógeno (Zhang *et al.*, 2012) (Figura 3.7).

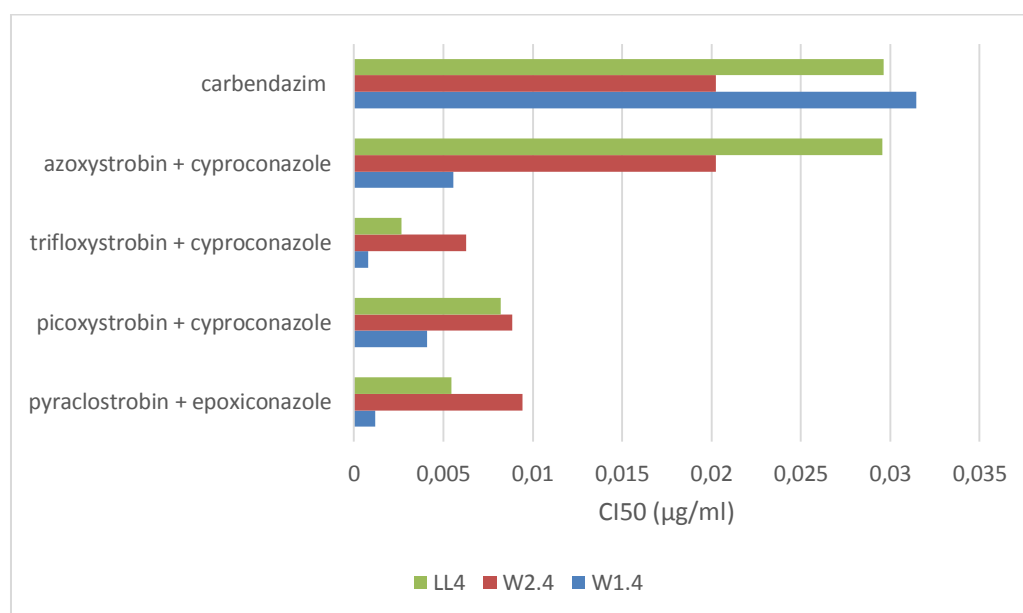


Figura 3.7: Concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) ($\mu\text{g/ml}$) de cinco fungicidas para seis aislados en promedio de *C. soja* según tres modelos de ajuste: log-logístico de cuatro parámetros (LL.4), asimétrico Weibull tipo I (W1.4) y II (W2.4).

3.3.2 Concentración inhibitoria media de fungicidas

El fungicida trifloxystrobina + cyproconazole presentó el menor valor de CI_{50} (0,000796 $\mu\text{g/ml}$) distinguiéndose significativamente de azoxystrobina + cyproconazole y carbendazim (Tabla 3.5). Sin embargo, no difiere significativamente de pyraclostrobina + epoxiconazole ni de picoxystrobina + cyproconazole. En la Tabla 3.6 se observa el efecto del fungicida sobre seis aislados del patógeno. La combinación

pyraclostrobina + epoxiconazole no tiene diferencias significativas con el fungicida de menor valor de CI_{50} (trifloxystrobina + cyproconazole) (Tabla 3.5). En la Tabla 3.7 se puede ver cómo afecta este fungicida a los aislados de *C. soja* *in vitro*. Picoxystrobina + cyproconazole tiene una ubicación intermedia al no diferir significativamente del resto de los fungicidas (Tabla 3.5), su efecto sobre el patógeno *in vitro* se observa en la Tabla 3.8. Carbendazim arrojó el mayor valor de CI_{50} (0,024656 $\mu\text{g/ml}$) sin embargo no presenta diferencias significativas con el fungicida azoxystrobina + cyproconazole (Tabla 3.5). El impacto de estos fungicidas *in vitro* sobre las colonias del hongo se observan en las Tabla 3.9 y Tabla 3.10 respectivamente.

Tabla 3.5: Concentración inhibitoria media (CI_{50}) promedio de seis aislados *C. soja* para los diferentes fungicidas analizados

Fungicida	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) promedio	E.E.
trifloxystrobina + cyproconazole	0,000796 A	0,0004507
pyraclostrobina + epoxiconazole	0,001202 A	0,0006819
picoxystrobina + cyproconazole	0,004080 AB	0,0017721
azoxystrobina + cyproconazole	0,024656 B	0,0138792
carbendazim	0,020231 B	0,0141126

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

De acuerdo a estos resultados, el fungicida trifloxystrobina + cyproconazole es el más fungitóxico y carbendazim el menos fungitóxico en los seis aislados de *C. soja*.

Tabla 3.6: Desarrollo *in vitro* de seis aislados del patógeno *C. sojae* en medio de cultivo APG con distintas concentraciones del fungicida trifloxystrobina + cyproconazole.


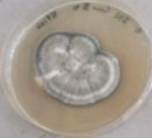
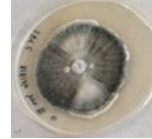
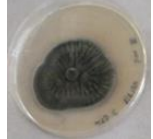
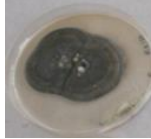
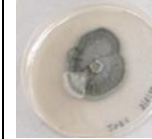



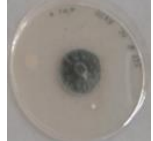
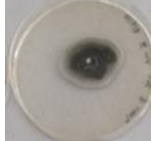




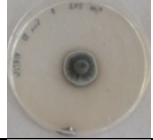





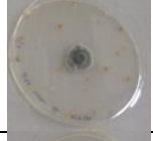





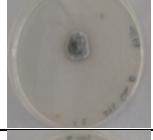


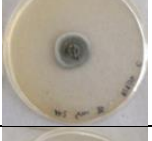


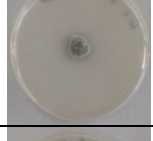
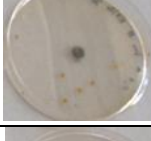




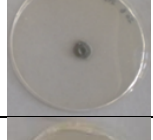
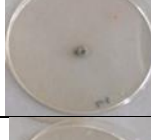
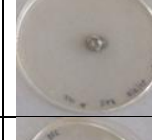






Dosis (µg/ml)	Aislados 172-09	232-10	234-10	243-10	269-10	278-10
0						
0.001						
0.01						
0.1						
1						
10						
20						
40						

Tabla 3.7: Desarrollo *in vitro* de seis aislados del patógeno *C. sojae* en medio de cultivo APG con distintas concentraciones del fungicida pyraclostrobina + epoxiconazole.


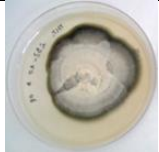

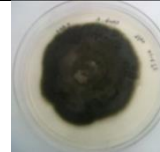
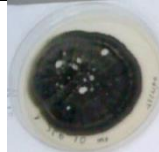
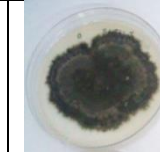




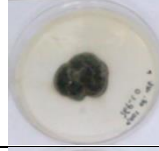
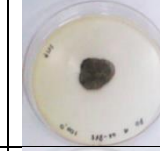
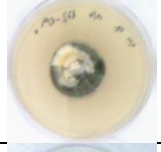
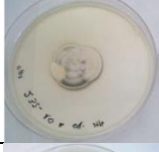

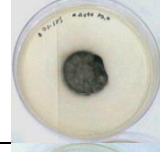
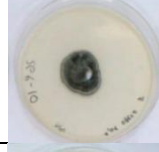
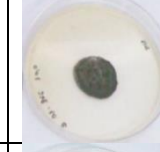
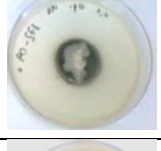
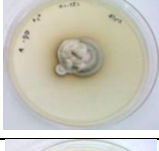


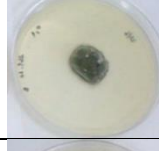

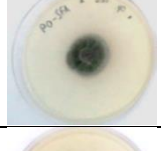
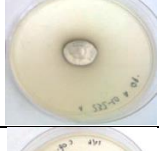
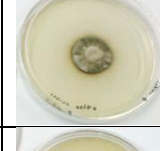
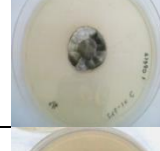
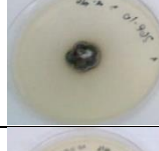
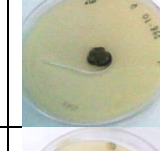
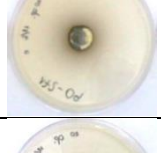
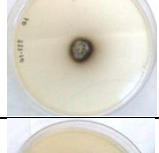
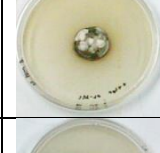
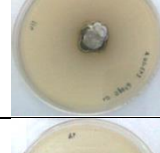

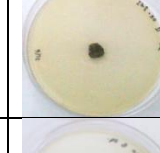
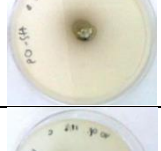
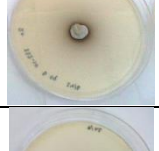
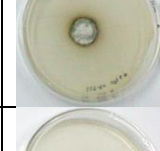
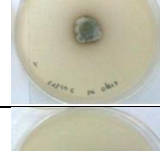
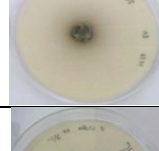
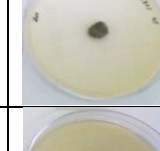






Dosis (µg/ml)	Aislados 172-09	232-10	234-10	243-10	269-10	278-10
0						
0.001						
0.01						
0.1						
1						
10						
20						
40						

Tabla 3.8: Desarrollo *in vitro* de seis aislados del patógeno *C. sojae* en medio de cultivo APG con distintas concentraciones del fungicida picoxystrobina + cyproconazole.

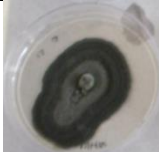
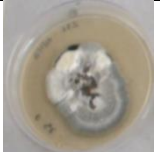
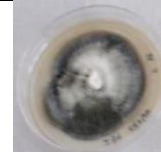










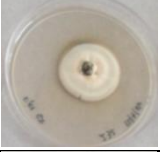











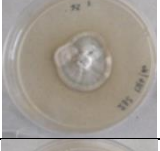



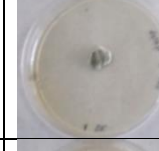

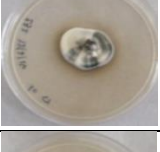






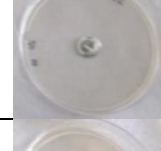
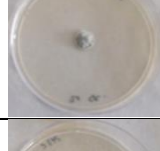

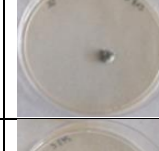



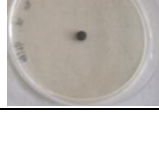

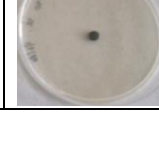
Dosis (µg/ml)	Aislados 172-09	232-10	234-10	243-10	269-10	278-10
0						
0.001						
0.01						
0.1						
1						
10						
20						
40						

Tabla 3.9: Desarrollo *in vitro* de seis aislados del patógeno *C. sojae* en medio de cultivo APG con distintas concentraciones del fungicida carbendazim.

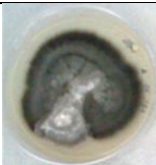

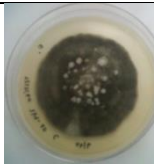



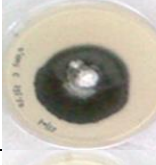
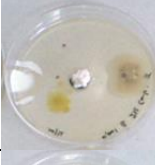
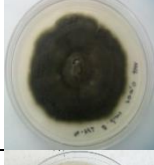
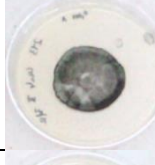

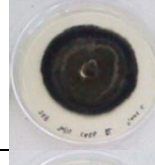

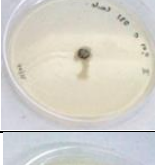
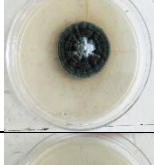


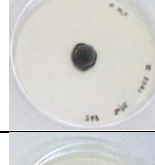
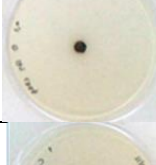
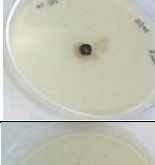
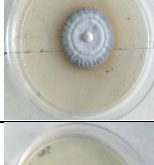
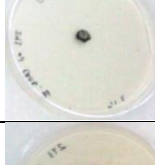
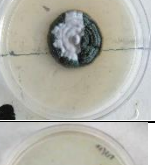
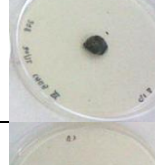
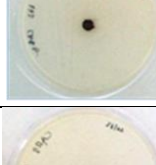
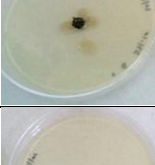
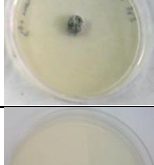
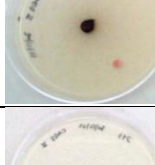
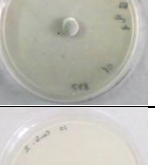
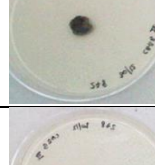
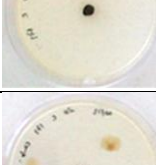
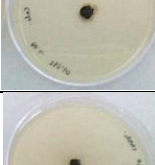
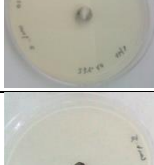
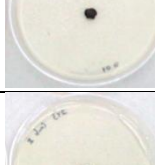
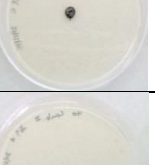
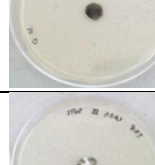

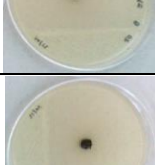
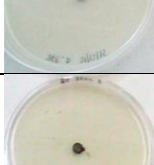
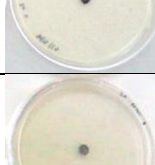
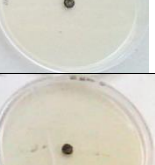








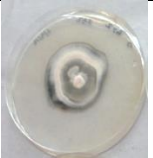


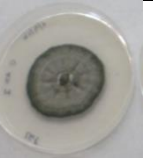







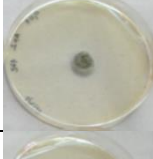
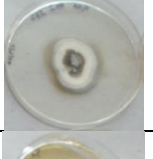
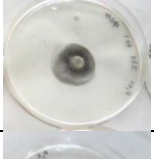
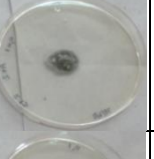
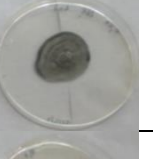
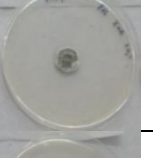
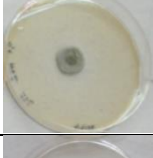
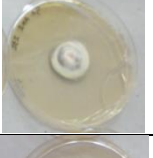
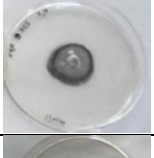
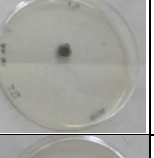
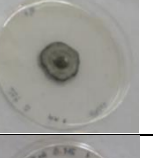







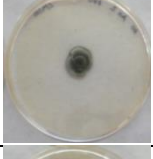

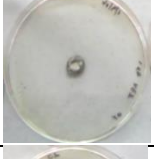
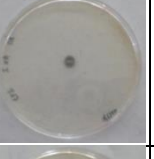
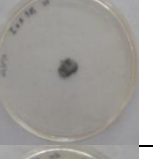

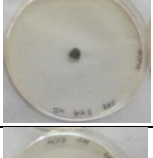
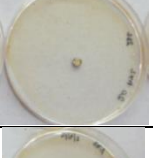










Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Aislados 172-09	232-10	234-10	243-10	269-10	278-10
0						
0.001						
0.01						
0.1						
1						
10						
20						
40						

Tabla 3.10: Desarrollo *in vitro* de seis aislados del patógeno *C. sojae* en medio de cultivo APG con distintas concentraciones del fungicida azoxystrobina + cyproconazole.

Dosis (µg/ml)	Aislados 172-09	232-10	234-10	243-10	269-10	278-10
0						
0.001						
0.01						
0.1						
1						
10						
20						
40						

3.3.3 Sensibilidad de aislados de *C. soja*

Los seis aislados estudiados fueron sensibles a los fungicidas testeados (Edgington *et al.*, 1971). No hubo diferencias significativas entre aislados (Tabla 3.11). Se observa con el menor valor de CI₅₀ al aislado 232-10 y con el mayor valor a 172-09 (Tabla 3.11).

Tabla 3.11: Valores medios de CI₅₀ de cinco fungicidas en promedio para cada aislado analizado.

Aislado	Procedencia	Medias	E.E.
232-10	Vuelta Obligado, Buenos Aires.	0,0025 A	0,0016
278-10	Cañada de Luque, Córdoba.	0,0028 A	0,0019
234-10	Selva, Santiago del Estero.	0,01 A	0,0021
269-10	Pergamino, Buenos Aires.	0,01 A	0,0023
243-10	Nogoyá, Entre Ríos.	0,01 A	0,0051
172- 09	Venado Tuerto, Santa Fe.	0,04 A	0,0216

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), de acuerdo a ANOVA y test de Tukey.

3.3.4 Ensayo *in vivo*

La inoculación en invernáculo fue exitosa, obteniendo los síntomas típicos en el testigo sin fungicida y con fungicida (T1, T2) (Figura 3.8). La incidencia del aislado con menor valor de CI₅₀ con fungicida (T5) presentó diferencias significativas con el aislado con mayor valor de CI₅₀ con fungicida (T6). En un estrato intermedio se ubicaron los T3 (aislado 232-10 sin fungicida) y T4 (aislado 172-09 sin fungicida) pero sin diferir significativamente del T5 y T6 (Tabla 3.12).

Tabla 3.12: Incidencia de *C. sojina* sobre los tratamientos T5 (aislado 232-10 con fungicida), T3 (aislado 232-10 sin fungicida), T4 (aislado 172-09 sin fungicida) y T6 (aislado 172-09 con fungicida).

Tratamiento	Medias (Incidencia)	E.E.
T5	8.57 A	1,09
T3	17.50 AB	2,64
T4	25 AB	4,77
T6	40 B	0,36

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), de acuerdo a ANOVA y test de Tukey.

Los valores de severidad estimados de cada tratamiento según escala de Distéfano y Gabdán (2009) no presentaron diferencias significativas entre ellos, la severidad estimada en todos los tratamientos fue baja (Tabla 3.13)

Tabla 3.13: Severidad de *C. sojina* sobre los tratamientos T5 (aislado 232-10 con fungicida), T3 (aislado 232-10 sin fungicida), T4 (aislado 172-09 sin fungicida) y T6 (aislado 172-09 con fungicida).

Tratamiento	Medias (severidad)	E.E.
T3	2,50 A	0,16
T5	2,50 A	0,16
T6	3,75 A	0,22
T4	3,75 A	0,22

.Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo a ANOVA y test

de Tukey.



Figura 3.8: Plantas inoculadas con *C. sojina* bajo cámara húmeda y tratamiento testigo, mostrando mancha típica de la enfermedad MOR:

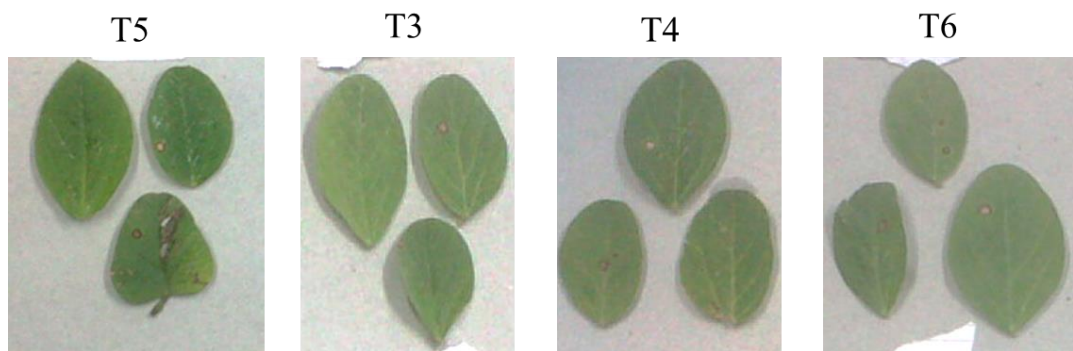


Figura 3.9: Severidad de *C. sojina* en los tratamientos T5 (aislado 232-10 con fungicida), T3 (aislado 232-10 sin fungicida), T4 (aislado 172-09 sin fungicida) y T6 (aislado 172-09 con fungicida).

3.4 Discusión

A pesar de que algunos autores utilizan ingredientes activos puros (Zhang *et al.*, 2012) para determinar la sensibilidad de aislados de *C. soja*, el uso de fungicidas comerciales permitió establecer las CI_{50} de los seis aislados en este trabajo. Esto, se considera lo suficientemente representativo, ya que es lo que aplica el productor a campo y a lo que realmente se enfrenta el patógeno (Schmitz *et al.*, 2013; Twizeyimana y Hartman, 2017).

Los valores de CI_{50} obtenidos para los fungicidas trifloxystrobina + cyproconazole, pyraclostrobina + epoxiconazole, picoxystrobina + cyproconazole, azoxystrobina + cyproconazole y carbendazim fueron todos menores a 1 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 3.5). Considerando la escala de sensibilidad propuesta por Edgington *et al.* (1971), los seis aislados son muy sensibles a los fungicidas ensayados y en consecuencia, los fungicidas altamente fungitóxicos.

Las CI_{50} tuvieron diferencias significativas entre fungicidas (Tabla 3.5), el fungicida trifloxystrobina + cyproconazole, resulta el más fungitóxico sin diferir significativamente de pyraclostrobina + epoxiconazole. Picoxystrobina + cyproconazole no difiere de los más y menos fungitóxico (Tabla 3.5). Estos resultados indican además que los fungicidas normalmente utilizados en el cultivo de soja presentan diferentes CI_{50} (Tabla 3.5), lo que permite aceptar la hipótesis número 2, que afirma que “los fungicidas que normalmente se utilizan en el cultivo de soja presentan diferentes CI_{50} ”.

El fungicida bencimidazol carbendazim resultó fungitóxico a los seis aislados ensayados, sin embargo, no fue el más potente en comparación a los fungicidas mezclas

(estrobilurinas + triazoles) (Tabla 3.11). En consecuencia, no se acepta la hipótesis número tres (“las moléculas del grupo químico bencimidazol resultan las más fungitóxicas a todos los aislados”). Por otra parte, considerando los antecedentes de pérdida de sensibilidad a este fungicida en *C. sojina* y patógenos del mismo género, resulta necesario ampliar el análisis con un número mayor de aislados (Imazaki *et al.*, 2006; Lartey, 2010; Peretti *et al.*, 2012). En contraparte, otras investigaciones mencionan la efectividad de carbendazim como erradicante de *C. sojina* en semillas (Sautua *et al.*, 2018) sin considerar al resto de los fungicidas testeados en esta tesis por no ser generalmente usados como curasemillas.

La sensibilidad de los diferentes aislados no tuvo diferencias significativas entre ellos (Tabla 3.11), esto podría deberse a que no hubo diferencia de gradiente en los resultados obtenidos de algunas dosis de los fungicidas. Es por ello que, no se puede afirmar que la sensibilidad de los diferentes aislados de *C. sojina*, *in vitro*, es variable en función de la raza, procedencia geográfica y de las distintas concentraciones de fungicidas utilizados (hipótesis número uno).

La inoculación artificial mediante la metodología utilizada permitió infectar exitosamente las plantas de soja con *C. sojina*. Esto pudo comprobarse mediante la visualización y confirmación de síntomas y estructuras reproductivas típicas del hongo en microscopio óptico. La incidencia lograda por el T5 (aislado 232-10 con fungicida) tuvo diferencias significativas con el T6 (aislado 172-09 con fungicida), con el menor valor medio para T5 y el mayor para T6 (Tabla 3.12). Esto muestra que los aislados con menor y mayor valor de CI_{50} tuvieron similar comportamiento al observado *in vitro*. En base a esto, se afirma en parte, que el comportamiento de los aislados *in vivo* fue similar

al observado *in vitro* (hipótesis 5), ya que el ensayo se realizó sobre dos aislados de seis. Por otra parte los tratamientos sin fungicida (T3 y T4) no presentaron diferencias significativas entre ellos ni con los demás tratamientos (Tabla 3.12).

Los valores de severidad fueron bajos, oscilando entre 2 y 5 % según escala de Distéfano y Gabdán (2009) sin diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 3.13). Considerando las condiciones ambientales óptimas para la infección, temperaturas entre 25 y 30-35 °C, rocío y humedad relativa ambiente superior a 90% (Yorinori, 1989, Mian *et al.*, 2008), la baja severidad pudo deberse a valores de temperatura extremos entre 4.7°C de mínima y 40°C de máxima, así como humedad relativa ambiente entre 93 al 15% durante el ensayo *in vivo*. Otros estudios sobre inoculación de *Passalora sojina* (sin. *Cercospora sojina*) en soja, demuestran que la intensidad de la enfermedad aumenta con el incremento del periodo de mojado de hoja, detectando la mayor intensidad con 72 hrs de mojado foliar (Camera *et al.*, 2017). Por otra parte, la baja infección lograda pudo deberse a la concentración de inóculo utilizada de 1×10^5 conidios/ml, similar a Carmona *et al.*, (2010) quienes inocularon con $1,3 \times 10^5$ conidios/ml pero contrario a Ploper *et al.* (2001), Mengistu (2002) y Zhang y Bradley (2017) quienes utilizaron concentraciones mayores de 4×10^4 , 3×10^4 y 6×10^4 conidios/ml, respectivamente. La baja concentración de conidios podría deberse a la disminución del desarrollo de estructuras reproductivas de los aislados de *C. sojina* luego de un tiempo de almacenamiento (Luque, 2017. Com. Per.). Es conocido además, el lento crecimiento de especies de *Cercospora* y escasez de esporulación en medios artificiales Brunelli *et al.* (2006).

Los resultados obtenidos en este ensayo demuestran la efectividad de los grupos químicos comúnmente usados para el control de MOR (Formento, 2007; Carmona *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2010; Sillón, 2011). Sin embargo, es necesario considerar vital el monitoreo de sensibilidad para seguir el grado de adaptación de *C. sojina* a los fungicidas y explicar las posibles causas de las fallas de control a campo.

3.5 Conclusiones

Los aislados de *C. sojina* estudiados en este capítulo resultaron sensibles a los fungicidas comerciales testeados. De todos modos, se debería continuar los monitoreos de sensibilidad en el futuro, teniendo en cuenta además, numerosos reportes de cepas de *C. sojina* resistentes (Zhang *et al.*, 2012; Standish *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2015; Zhang y Bradley, 2017).

Los resultados obtenidos demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas en la sensibilidad *in vitro* de *C. sojina* a diferentes concentraciones de los fungicidas estrobilurinas más triazoles, pyraclostrobina + epoxiconazole, picoxystrobina + cyproconazole, trifloxystrobina + cyproconazole, azoxystrobina + cyproconazole y bencimidazol carbendazim.

Los aislados con menor valor de CI_{50} y mayor valor de CI_{50} resultantes de las pruebas en laboratorio, tuvieron similar comportamiento *in vivo*. Sin embargo, se considera importante desarrollar nuevos ensayos para conocer el comportamiento de un mayor número de aislados en plantas de soja bajo condiciones semi-controladas.

Este trabajo es un avance que servirá de herramienta para conocer cambios de sensibilidad en el tiempo del fitopatógeno. No obstante, es necesario aumentar el número de repeticiones de los mismos aislados y de otros aislados del patógeno, como así también otros fungicidas de grupos químicos como carboxamidas, para ampliar el espectro del análisis y de ese modo aumentar la precisión de estos resultados.

CAPÍTULO 4

Respiración alternativa de *C. sojina*

4.1 Introducción

Además de poseer un ajuste estable y hereditario a un fungicida, los hongos, pueden desarrollar otro mecanismo de resistencia, como una vía de respiración alternativa que se da a nivel de la membrana mitocondrial por una oxidasa alternativa (AOX) (Hong-Jie Liang *et al.*, 2015). Esta vía puede o no utilizarse según la situación fisiológica de la célula en cuestión. Este mecanismo, permitiría al hongo escapar al efecto de fungicidas estrobilurinas al transportarse los electrones por una oxidasa alternativa (AOX) cuando existe una limitación en la zona del citocromo *b* (sitio de acción de fungicidas estrobilurinas) (Sánchez, 1980; Hong-Jie Liang *et al.*, 2015). Para cortar el efecto de la AOX es utilizado el ácido salicil hidroxámico (SHAM) (Zhang *et al.*, 2012; Price, 2013; Standish, 2015; Hong-Jie Liang *et al.*, 2015). El efecto toxico de este ácido se ha informado bajo condiciones *in vitro* sobre diversos patógenos; *Fusicladium effusum*, *Microdochium nivale*, *M. majus*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Ascochyta rabiei* (Wise, *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2009; Seyran *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013; Hong-Jie Liang *et al.*, 2015). En *C. sojina*, Zhang *et al.* (2012) trabajaron con germinación de esporas en medios de cultivo con un principio activo estrobilurina puro, y observaron valores de CI₅₀ significativamente mayores cuando SHAM no fue incluido al medio. Por lo tanto, sugieren que la respiración alternativa podría existir en *C. sojina*.

El objetivo de éste capítulo fue determinar si una posible vía de respiración alternativa es inducida en *C. sojina* frente a un fungicida de la familia química de las estrobilurinas.

4.2 Materiales y métodos

Se utilizaron para este ensayo, los aislados con menor y mayor CI_{50} resultantes de las pruebas de fungitoxicidad (Tabla 3.11). Se tomaron como referencia los valores obtenidos de las CI_{50} (Tabla 4.1). El fungicida usado para determinar la sensibilidad fue azoxystrobina 98 %, del grupo químico de las estrobilurinas.

Tabla 4.1: Nombre, procedencia, raza y CI_{50} del fungicida azoxystrobina para los aislados más y menos sensibles de *C. soja* utilizados.

Aislado	Procedencia	Medias	E.E.
232-10	Vuelta Obligado, Buenos Aires.	0,0025 A	0,0016
172- 09	Venado Tuerto, Santa Fe.	0,04 A	0,0216

Se realizaron pruebas de sensibilidad del fungicida estrobilurina a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ disuelto en acetona (Zhang *et al.*, 2012). El fungicida se adicionó a medio estéril agar papa glucosado (APG, Britania) a concentraciones variables de 0; 0,001; 0,01; 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$. La concentración “0” representó el testigo del ensayo. Se siguieron los procedimientos de los ensayos de sensibilidad realizados en el capítulo 3. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, con 4 repeticiones. El experimento se repitió tres veces para garantizar la precisión de los resultados. Posteriormente, para determinar la posible vía de respiración alternativa, se agregó al medio una solución de SHAM (salicil hidroxamic acid, 99%) en metanol de 60 $\mu\text{g/ml}$ (Zhang *et al.*, 2012). Para conocer si existían diferencias significativas en las CI_{50} con el agregado de SHAM se realizó un ANOVA no paramétrico (debido a que la distribución de los datos no presentaba normalidad) prueba de Kruskal Wallis, utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

Por último, para conocer el efecto de SHAM sin fungicida sobre el crecimiento de las colonias, se midió el PIC (Porcentaje de Inhibición de Crecimiento) mediante la fórmula

$$PIC (\%) = \frac{\text{Crecimiento micelial testigo (mm)} - \text{Crecimiento micelial tratamiento (mm)}}{\text{Crecimiento micelial testigo (mm)}} * 100$$
 , y

se comparó con el PIC de azoxystrobina con y sin el agregado de SHAM.

4.3 Resultados

4.3.1 Concentraciones inhibitorias medias

El aislado 232-10 con el fungicida azoxystrobina presentó diferencias significativas con el aislado 172-09 con azoxystrobina + SHAM (Tabla 4.2). Sin embargo no difirió del tratamiento 172-09 con azoxystrobina ni de 232-10 con azoxystrobina + SHAM (Tabla 4.2). Se observa además, que el agregado del ácido provoca una disminución notoria en los valores de las CI₅₀ para los dos aislados (Tabla 4.2).

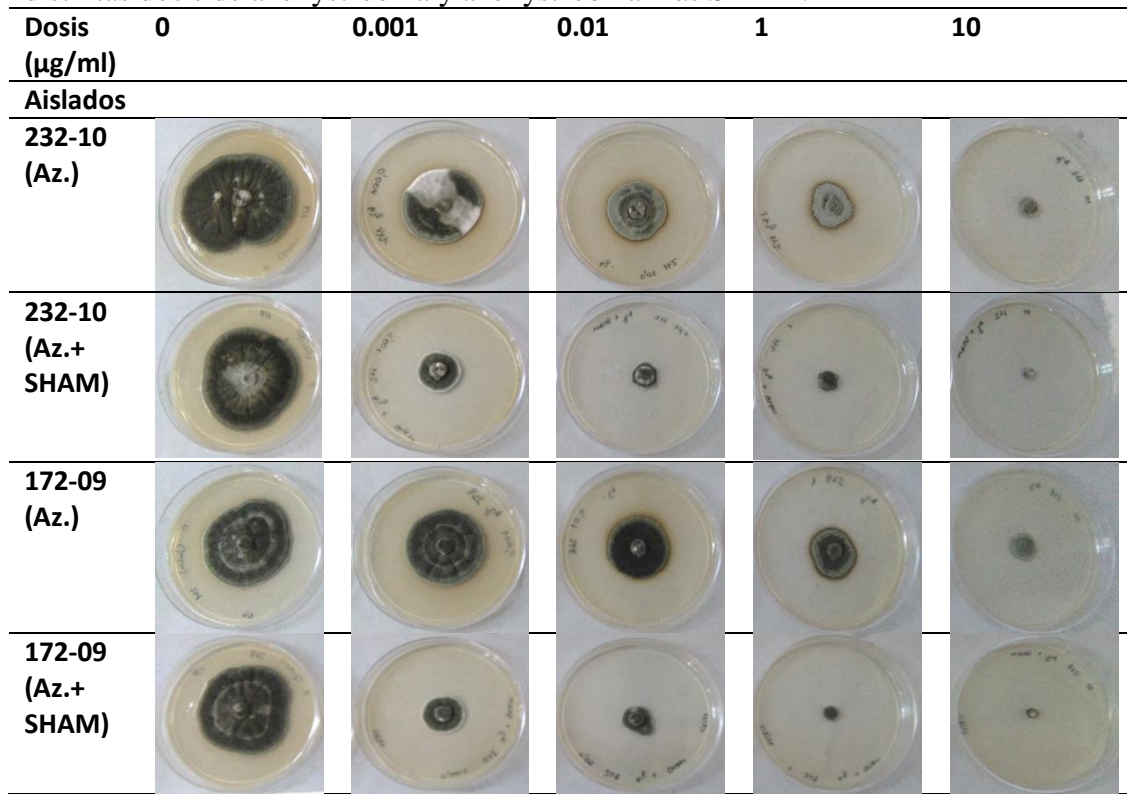
Tabla 4.2: Valores de CI₅₀ (µg/ml) de los aislados 232-10 y 172-09 para el fungicida azoxystrobina y azoxystrobina + SHAM.

Tratamiento	CI ₅₀
232-10 - azoxystrobina	0.01 A
172-09 - azoxystrobina	0.04 AB
232-10 - azoxystrobina + SHAM	0.00033 AB
172-09 - azoxystrobina + SHAM	0.0013 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo a test no paramétrico de Kruskal Wallis.

En Tabla 4.3 se observa el efecto del fungicida azoxystrobina y del agregado de SHAM sobre los aislados 232-10 y 172-09.

Tabla 4.3: Pruebas de fungitoxicidad de los aislados 232-10 y 172-09 frente al uso de distintas dosis de azoxystrobina y azoxystrobina más SHAM.



4.3.2 Porcentajes de Inhibición de crecimiento

En los aislados 232-10 y 172-09 se observa que el agregado de SHAM al medio con azoxystrobina se distingue significativamente del PIC de azoxystrobina y de SHAM. Del mismo modo, los PIC de azoxystrobina y de SHAM no difieren estadísticamente (Tabla 4.4).

Tabla 4.4: Valores de PIC (Porcentaje de Inhibición de crecimiento) de los aislados 232-10 y 172-09 para el fungicida azoxystrobina y azoxystrobina + SHAM.

Tratamiento	PIC (media)	E.E.
232-10 - azoxystrobina	49,19 A	2,61
232-10 - SHAM	51,11 A	2,61
232-10 - azoxystrobina + SHAM	68,01 B	2,61
172-09 - azoxystrobina	41,63 A	2,30
172-09 - SHAM	45,75 A	2,30
172-09 - azoxystrobina + SHAM	66,48 B	2,30

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo a test no paramétrico de Kruskal Wallis.

4.4 Discusión

Los resultados obtenidos en este ensayo son un aporte inédito en nuestro país sobre un posible mecanismo de respiración alternativa *in vitro* en aislados de *C. soja*.

De acuerdo a la escala de sensibilidad propuesta por Edgington *et al.* (1971), los aislados ensayados resultaron muy sensibles al fungicida estrobilurina azoxystrobina con valores medios de 0.01 y 0.04 $\mu\text{g/ml}$ para 232-10 y 172-09 respectivamente (Tabla 4.2). Estos resultados difieren a Zhang *et al.* (2012) quienes reportaron cepas resistentes con CI_{50} mayores (3.16 $\mu\text{g/ml}$) para azoxystrobina y significativamente menores con el agregado de SHAM, indicando que *C. soja* podría tener la capacidad de utilizar una vía de respiración alternativa. Resultados similares fueron obtenidos con la exposición del patógeno *Pyrenophora tritici-repentis* al fungicida estrobilurina pyraclostrobina. Donde los valores de CI_{50} de seis aislados fueron significativamente mayores cuando SHAM no fue añadido al medio con pyraclostrobina (Patel *et al.*, 2011).

Por otra parte, SHAM individualmente, provoca una disminución en el diámetro de las colonias pero no tiene un efecto distinto al del fungicida solo (Tabla 4.4). Otros autores, sin embargo, expresan que SHAM tendría una toxicidad directa sobre el patógeno (Hong-Jie Liang *et al.*, 2015).

Así como los aislados 232-10 y 172-09 resultaron muy sensibles a los fungicidas mezclas de estrobilurinas más triazoles ensayados en el capítulo 3 (Tabla 3.5), fueron muy sensibles al principio activo puro azoxystrobina utilizado en este ensayo. Es por ello que, aunque el agregado de SHAM disminuyó los valores de CI_{50} (Tabla 4.3), no se

puede afirmar que el patógeno presente una vía de respiración alternativa que le confiera resistencia a los fungicidas estrobilurinas (hipótesis 4)

4.5 Conclusiones

Los aislados de *C. sojina* estudiados en este capítulo son sensibles al fungicida azoxystrobina 98%.

El patógeno no demuestra una vía de respiración alternativa *in vitro*, sin embargo, se podría aumentar el número de aislados así como evaluar otros fungicidas de la familia estrobilurinas para corroborar los resultados obtenidos en este capítulo.

CAPÍTULO 5

Conclusiones finales

5.1 Introducción

En la actualidad, MOR aparece esporádicamente y con bajos niveles de severidad debido al mejoramiento genético y el reemplazo de las variedades susceptibles por otras de menor susceptibilidad o resistentes. Sin embargo, debido a la variabilidad de su agente causal, esa resistencia puede quebrarse y aunque no haya actualmente epifitias tan severas como las registradas anteriormente, esta enfermedad constituye un peligro permanente por los daños que ocasiona (Reis *et al.*, 2012). Por ello, resulta necesario generar información precisa referente a la variabilidad poblacional del fitopatógeno y su relación con la sensibilidad a fungicidas en condiciones de laboratorio y ambientes controlados (Reis *et al.*, 2010; Avozani, 2011).

Al presente, *C. sojina* ha desarrollado cepas resistentes al control químico alrededor del mundo (Standish *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2015; Zhang y Bradley, 2017), sin embargo, son prácticamente nulos los estudios realizados en nuestro país para conocer su sensibilidad *in vitro* e *in vivo* a los principios activos que lo controlan.

Durante el desarrollo de este trabajo se estudió la sensibilidad de *C. sojina* a fungicidas utilizados comúnmente para su control. Abarcando desde la caracterización de aislados regionales del patógeno, pasando por la determinación de su sensibilidad *in vitro* e *in vivo*, hasta el análisis de una posible vía de respiración alternativa como mecanismo de resistencia.

En este capítulo se realiza una recapitulación del estudio realizado, analizando los diferentes objetivos e hipótesis planteadas y los resultados y conclusiones a las que se arribó. Se exponen además, implicancias futuras que puedan desprenderse de este trabajo.

5.2 Síntesis de los principales resultados

Con el fin de caracterizar micro-morfológicamente aislados de *C. soja* de distinta procedencia geográfica (objetivo 1), se probaron distintos medios de cultivo, formas de preservación del fitopatógeno y se realizaron observaciones en microscopio óptico y electrónico.

El medio de cultivo APG proporcionó óptimos resultados para crecimiento, aislamiento y mantenimiento del patógeno. Esto coincide con lo expuesto por publicaciones alrededor del mundo (Stefanova *et al.*, 1999; Cañedo y Ames, 2004; Hernandez y Roson, 2005; Gómez y Batista, 2006; Suárez-Contreras, 2006; Carnuba *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2015; Lovato Echeverría *et al.*, 2015; Kenneth *et al.*, 2018). Sin embargo, Camera *et al.* (2017), en ensayos de producción de inóculo de *Passalora soja* (sin. *Cercospora soja* Hara.), observaron la mayor producción de conidios en medios como FTJ (jugo de tomate) y V8 (jugo de ocho vegetales). Otras investigaciones destacan también a V8 y AZ (agar zanahoria) (Formento *et al.*, 2011).

Por otra parte, la criopreservación permitió conservar las características de los aislados en buen estado durante el desarrollo de los ensayos. Este método fue considerado también por otros autores, como eficiente para la preservación de diferentes patógenos (Crespo *et al.*, 2000; Pinzón *et al.*, 2009; Gato Cárdenas, 2010; Lo Piccolo *et al.*, 2013; Recalde Rodríguez *et al.*, 2017).

Las observaciones realizadas en microscopio óptico permitieron confirmar la identidad del patógeno, determinar el tamaño de estructuras reproductivas y compararlas entre aislados (Tabla 2.2). Los conidióforos, de color marrón a marrón claro, septados, sinuosos, tuvieron características y longitudes similares a las observadas por Mengistu *et al.* (2002). Las medidas de los conidios, arrojaron valores de 23 – 67.3 μm de largo, 8 μm (2 – 9 μm) de ancho y número de septos con una media de 8 por

conidio, esto es similar a lo descrito por Reis (1974) y Carmona *et al.* (2009) pero difiere con Phillips (1999); Ploper *et al.* (2001); Mengistu *et al.* (2002) y Gómez, (2011), quienes mencionan medidas inferiores.

Las imágenes obtenidas del microscopio electrónico perteneciente al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la UAT- CCT- CONICET de Bahía Blanca, permitieron observar estructuras reproductivas con mayor magnitud y comparar con las obtenidas mediante microscopio óptico (Tabla 2.5).

La determinación de las CI_{50} para fungicidas estrobilurinas más triazoles y bencimidazoles, permitió establecer la sensibilidad *in vitro* del patógeno a esos principios activos (objetivo 2).

Los seis aislados de diferente procedencia resultaron sensibles a los fungicidas evaluados, según la escala de sensibilidad propuesta por Edgington *et al.* (1971) (Tabla 3.3).

Para determinar la sensibilidad de *C. sojina*, se utilizaron mezclas comerciales de fungicidas comúnmente aplicadas a campo para el control de MOR. Al ser este un estudio preliminar y uno de los primeros realizados en Argentina, se considera a los fungicidas comerciales lo suficientemente representativos, ya que son los que aplica el productor en el campo y a los que realmente se enfrenta el patógeno (Schmitz *et al.*, 2013; Twizeyimana y Hartman, 2017). Sin embargo, otros autores utilizaron solo ingredientes activos puros para medir la sensibilidad del patógeno (Zhang *et al.*, 2012).

Los principios activos trifloxystrobina + cyproconazole y pyraclostrobina + epoxiconazole resultaron los más fungitóxicos, difiriendo significativamente de azoxystrobina + cyproconazole (Tabla 3.5). El fungicida picoxystrobina + cyproconazole no mostró diferencias significativas con los anteriores. El efecto de los fungicidas sobre los aislados del patógeno puede observarse en las siguientes tablas:

Tabla 3.6, Tabla 3.7 , Tabla 3.8 y Tabla 3.10. Estos resultados indican además que los fungicidas normalmente utilizados en el cultivo de soja presentan diferentes CI_{50} , lo que permite aceptar la hipótesis número 2.

Al comparar el comportamiento y sensibilidad de los aislados a los fungicidas evaluados (objetivo 3), se consideró al aislado 232-10 y al 172-09 como los más y menos sensibles respectivamente al obtener el mayor y menos valor de CI_{50} , de acuerdo a las medias obtenidas en el análisis estadístico. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las CI_{50} de los seis aislados. Es por ello que, no se puede afirmar que la sensibilidad de los diferentes aislados de *C. soja*, *in vitro*, varíe en función de la raza, procedencia geográfica y de las distintas concentraciones de fungicidas utilizados. Por lo tanto, no se acepta la hipótesis 1.

Con referencia a la clasificación de la potencia de los fungicidas (objetivo 5), el fungicida bencimidazol carbendazim, resultó el menos potente en comparación a las mezclas de estrobilurinas y triazoles, y de éstos, el más fungitóxico fue trifloxystrobina + cyproconazole (Tabla 3.5). Por ende, no se acepta la hipótesis 3, que sentencia que las moléculas del grupo químico bencimidazol resultan las más fungitóxicas a todos los aislados. Sin embargo, Sautua *et al.* (2018) destacan el efecto erradicante de *C. soja* en semillas de soja tratadas con carbendazim. No obstante, no fueron considerados en ese trabajo el resto de los fungicidas utilizados en esta tesis por no ser generalmente usados como curasemillas.

Por otra parte, para poder analizar el comportamiento en plantas de soja de los aislados más y menos sensibles frente al fungicida más potente (objetivo 6), la inoculación artificial mediante la metodología utilizada permitió infectar exitosamente las plantas de soja con *C. soja*. La incidencia lograda por el aislado más sensible con el menor valor medio (232-10) tuvo diferencias significativas con el menos sensible de

mayor valor medio (172-09) (Tabla 3.12). Esto permite corroborar que el comportamiento de los aislados *in vivo* fue similar al observado *in vitro* (hipótesis 5).

Finalmente, para conocer una posible vía de respiración alternativa *in vitro* como escape a la acción de fungicidas estrobilurinas (objetivo 4), se utilizaron los aislados con menor y mayor CI_{50} obtenidos en el capítulo 3. Para ello se ensayó el ingrediente activo puro azoxystrobina y SHAM (ácido que inhibiría el mecanismo alternativo de respiración). Si bien, los resultados indican una notoria disminución del diámetro de las colonias al agregar SHAM (Tabla 4.2, Tabla 4.3), los aislados resultaron altamente sensibles a azoxystrobina (Edgington *et al.*, 1971). Comportamiento observado también, frente a las mezclas comerciales de estrobilurinas más triazoles (Tabla 3.11). Por lo tanto, no se puede afirmar que el patógeno presente una vía de respiración alternativa que le confiera resistencia a los fungicidas estrobilurinas (hipótesis 4). Estos resultados difieren de los de Zhang *et al.* (2012) quienes reportaron cepas resistentes al obtener CI_{50} mayores (3.16 $\mu\text{g/ml}$) para azoxystrobina y significativamente menores con el agregado de SHAM, indicando que *C. sojina* podría tener la capacidad de utilizar una vía de respiración alternativa.

5.3 Avances logrados en el conocimiento

Como base para analizar la sensibilidad del agente causal de la enfermedad MOR a fungicidas utilizados para su control, la caracterización micro morfológica del patógeno realizada constituye un importante aporte para el conocimiento de *C. sojina* y contribuye a lograr un diagnóstico certero de la enfermedad.

La determinación de la sensibilidad *in vitro* a los fungicidas estrobilurinas más triazoles, pyraclostrobina + epoxiconazole, picoxystrobina + cyproconazole, trifloxystrobina + cyproconazole, azoxystrobina + cyproconazole y bencimidazol

carbendazim, servirá de herramienta para conocer cambios del comportamiento del patógeno a esos fungicidas en el tiempo. Asimismo, determinar que el comportamiento de los aislados más y menos sensible *in vitro* fue similar al observado *in vivo* bajo condiciones semi controladas, constituye un avance importante que será de utilidad para lograr una detección temprana de posible pérdida o disminución de sensibilidad y evitar el surgimiento de poblaciones de hongos resistentes (Ishii, 2015).

En este trabajo se probó que el patógeno resulta muy sensible al fungicida azoxystrobina y que no demuestra una vía de respiración alternativa *in vitro*. Estos resultados son un avance preliminar en el conocimiento de posibles mecanismos de escape al efecto de fungicidas estrobilurinas (Kubiuk *et al.*, 1980).

La información obtenida en esta tesis, constituye un aporte relevante ya que son prácticamente nulos los estudios realizados sobre el comportamiento de este hongo frente a fungicidas utilizados comúnmente para su control y sobre una posible vía de respiración alternativa como mecanismo de resistencia.

5.4 Aplicaciones futuras

De acuerdo a los resultados obtenidos en el capítulo 3, los grupos químicos comúnmente usados para el control de MOR resultaron efectivos (Formento, 2007; Carmona *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2010; Sillón, 2011). Por lo tanto, se lograría controlar la enfermedad bajo un manejo integrado adecuado utilizando rotación de cultivos, variedades resistentes a la enfermedad, uso de semilla libre o erradicada de *C. sojina* y aplicaciones de esos fungicidas basadas en un umbral de daño económico (UDE) (Carmona *et al.*, 2015).

En función de lo obtenido anteriormente, todos los aislados del patógeno de distinta procedencia geográfica resultaron sensibles a los fungicidas ensayados. Este

hallazgo, establece la base para nuevas investigaciones que ratifiquen la sensibilidad del hongo mediante el uso de más aislados.

El desarrollo de una vía de respiración alternativa para escapar al efecto de fungicidas estrobilurinas puede darse en cepas resistentes de *C. soja* (Zhang *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en el capítulo 4 demuestran alta sensibilidad de los aislados utilizados para ese estudio, y sirve de precedente para futuros ensayos de este tipo.

Estos descubrimientos son de utilidad como base para futuras investigaciones que profundicen acerca del conocimiento de la sensibilidad de *C. soja* y el posible surgimiento de resistencia a los controles químicos utilizados a campo.

5.5 Implicancias para investigaciones futuras

Se considera necesario continuar con la caracterización de *C. soja*, mediante investigaciones moleculares que permitan conocer razas del patógeno no descritas hasta el momento.

Por otra parte, resultaría conveniente reiterar los ensayos de sensibilidad *in vitro* con un mayor número de repeticiones de los mismos y otros aislados del patógeno, como así también otros fungicidas de grupos químicos como carboxamidas, para ampliar el espectro del análisis y de ese modo aumentar la precisión de estos resultados. Asimismo, sería interesante diagramar otra escala de sensibilidad que contemple valores menores de CI_{50} que los propuestos por Edgington *et al.* (1971), debido a que las CI_{50} obtenidas en este trabajo tuvieron diferencias significativas entre algunos fungicidas. La inoculación del patógeno resultó exitosa pero con bajos niveles de incidencia y severidad, por lo que resulta imprescindible realizar ensayos futuros bajo condiciones

controladas adecuadamente, un mayor número de aislados y con mayor producción de conidios.

Por otro lado, si bien el patógeno no demuestra una vía de respiración alternativa *in vitro*, se podría aumentar el número de aislados para corroborarlo.

Finalmente, sería necesario trasladar los ensayos aquí presentados a mini parcelas a campo, considerando diferentes variables como precipitaciones, humedad, rastrojo presente, entre otros, con el fin de ratificar los datos resultantes en este trabajo

BIBLIOGRAFÍA

- Akem, C.N., Dashiell, K.E., 1994. Effect of planting date on severity of frogeye leaf spot and grain yield of soybeans. *Crop Protection*, Volume 13, Issue 8, pág. 607- 610.
- Arduim, G.S., 2009. Sensibilidade de raças de *Puccinia triticina* a fungicidas. Tese (Doutorado em agronomia). Universidades de Passo Fundo/UPF. Passo Fundo/RS.
- Avozani, A., 2011. Sensibilidade de *Corynespora cassicola*, isolados da soja a fungicidas *in vitro*. Tesis de Maestría. Faculdade de Agronomia e medicina veterinaria. Universidade De Passo Fundo.
- Barreto, D., Botta, G.L., Chavarría, A., Formento, N., Giorda, L. M., Ivancovich, A.J., Laguna, I.G., Ploper, L.D., Vallone, S., Vicentini, R., 1997. Enfermedades de la soja en la Argentina. Córdoba. Ediciones INTA. Pp. 1-2.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr- Dobrzanski, B., 2002. The Strobilurin Fungicides. *Pest Manage. Sci.* 58: 649-662.
- Beckerman, J.L., 2013. Detection of Fungicide Resistance. Chapter 11. In: Mizinho Nita (Ed.) *Fungicides – Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*. ISBN 978-953-51-1130-6. Publisher: Intech, Chapters published May 15, 2013 under CC By 3.0 license pp. 281-310.
- Bradley, C. A., Pedersen, D. K., 2011. Baseline sensitivity of *Cercospora zea-maydis* to quinone outside inhibitor fungicides. *Plant Dis.* 95:189-19
- Bradley, C.A., 2014. University of Illinois. Principles of Fungicide Resistance: Focusing on Soybean and Corn Production. Focus on Corn. Plant Management Network.
- Brent, K.J., Hollomon, D.W., 2007. Fungicide Resistance the Assesment of Risks. FRAC. Monograph 2. 2nd Ed. Brussels, Crop Life International: 52.

- Brunelli, K.R., Fazza, A.C., Sobrinho, C.A., Camargo, L.E.A., 2006. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zae-maydis*. Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 32, n.1, p. 92-94.
- Camera, J.N., 2012. Patogenicidades, esporulação e interação entre temperatura e período de molhamento foliar na intensidade da mancha olho-de-rã, em soja. Dissertação de mestrado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinaria da Universidade de Passo Fundo.
- Camera, J.N., Deuner, C.C., Ghissi, V.C., Reis, E.M., Koefender, J., 2017. Inoculum production and evaluation of temperature and leaf wetness for *Passalora sojina* inoculation in soybean. Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 44, n. 2, p. 122-126.
- Cañeda, V., Ames, T., 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP). Perú. ISBN 92-9060-238-4.
- Carmona, M., Scandiani, M., 2009. Epidemias de la mancha ojo de rana en la región pampeana. Caracterización y manejo. XVII Congreso de AAPRESID: “La era del ecoprogreso”. Rosario. Agosto 2009.
- Carmona, M., Scandiani, M., Luque, A., 2009. Severe Outbreaks of Soybean Frogeye Leaf Spot Caused by *Cercospora sojina* in the Pampean Region, Argentina. Plant Dis. 93: (9) 966.
- Carmona, M., 2010. Fitosanidad/Preocupación entre los productores. Mancha ojo de rana, el principal enemigo de la soja. 27/02/2010. Suplemento Campo La Nación, p. 4. http://www.lanacion.com.ar/nota.asp?nota_id=1237465
- Carmona, M., Formento, N., Scandiani, M., 2010. Mancha ojo de rana. Ed. Horizonte A. 48 pp.

- Carmona, M. A., Abello, A., Sautua, F., 2011. Resistencia de los hongos a los fungicidas. Guia de Productos Fitosanitarios, pp161-168, CASAFE.
- Carmona, M.A., Reis, E.M., 2013. Classification of fungicides. Fungicides. Classification, Role in Disease Management and Toxicity Effects. PP 91-104 Editorial Nova Science Publishers, Inc. 400 Oser Avenue, Suite 1600 Hauppauge, NY 11788 2013.
- Carmona, M.A., 2014. Enfermedades de fin de ciclo y mancha ojo de rana en el cultivo de soja: desarrollo y validación de un sistema de puntuación y determinación del umbral de control. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales: Doctor de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. La Plata. Bs. As. Argentina.
- Carmona, M.A., Sautua; F., Perelman, S., Gally, M., Reis, E., 2015 *a*. Development and validation of a fungicide scoring system for management of late season soybean diseases in Argentina. Crop Protection 70: 83-91.
- Carmona, M.A., Sautua, F., Reis, E.M., 2015 *b*. Soybean frog-eye leaf spot (*Cercospora sojina*): First economic damage threshold determination. Advance in Applied Agricultural Sciences. Vol 3: 01-07.
- Carmona, M.A., Reis, E.M., Sautua, F.J., 2017. Chapter 9. Sustainable Chemical Control of Main Soybean Diseases in South America 203-245 pp In: Fletcher, B. (Ed.). Soybeans: Cultivation, Nutritional Properties and Effect on Health. Editors. Nova ISBN 978-1-63485-866-3.
- Carmona, M., Sautua, F., Scandiani, M., Bello, R., Lopez, V., Luque, A., 2017. In vitro sensitivity assessment of late season soybean pathogens to fungicide mixtures. Australasian Plant Dis. Notes (2017) 12:20. DOI 10.1007/s13314-017-0244-7

- Carnauba, J.P., Sobral M.F., Rocha Amorin, E.P., Silva, J.C., Santos, V.B., Solva, F.K., 2007. Avaliação de diferentes melos da cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. Summa. Phytopathologica 33(2): 199-200.
- Chupp, C., 1953. A monograph of the fungus genus *Cercopora*. Ithaca, New York, 667 pp.
- Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (Fungicide Resistance Action Comitee; FRAC). 2014- Resistance overview. <http://www.frac.info/resistance-overview>.
- Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (Fungicide Resistance Action Comitee; FRAC) FRAC Code List 2017: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering) http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2017-final.pdf?sfvrsn=fab94a9a_2
- Couretot, L., Mousegne, F., Ferraris, G., 2009. Caracterización de la respuesta a la aplicación de fungicidas foliares para el control de Mancha marrón de la hoja y Mancha ojo de rana en soja bajo un ambiente de stress hídrico Campaña 2008/09, Proyecto Regional Agrícola Desarrollo Rural. INTA EEA Pergamino.
- Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabañes, F.J., 2000. Evaluation of Different Preservation and Storage Methods for *Malassezia* spp. Journal of Clinical Microbiology. 38(10): 3872-3875.
- Davidse, L.C., 1986. Benzimidazole fungicides: mechanisms of action and biological impact. Annu. Rev. Phytopathol. 24:43-65.
- De María, M.R., 2008. Cambios en la cobertura de Pastizales Pampeanos Semiáridos en San Luis (Argentina) y su relación con variables climáticas y ambientales. Análisis multitemporal mediante teledetección y Sig. Tesis Doctoral. Facultad de Filosofía y Letras. Departamento de Geografía. Universidad de Alcalá. Madrid. España.
- Deising, H.B., Reimann, S., Pascholati, S.F., 2008. Mechanism and significance of fungicide resistance. Brazilian Journal of Microbiology 39:286-295.

- Diccionario de la lengua Española (23ª edición). Madrid. Espasa. ISBN 978-84-670-4189-7
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, L., Gonzalez, L., Tablado, H., Robledo, C.W.,
2011. InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
URL <http://www.infostat.com.ar>
- Distéfano, S. 2010. Conferencia en Simposio Nacional de Mancha en ojo de Rana. Rosario,
Julio 2010.
- Distéfano, S.G., Gadbán, L.C., 2009. Diseño de escala y evaluación de la reacción de
cultivares de soja a “mancha ojo de rana” (*Cercospora sojina* Hara). XIII Jornadas
Fitosanitarias Argentinas.
- Edgington, L.V., Khew, K.L., Barrow, G.L., 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole
compounds. *Phytopathology* 61:42-44.
- Estimaciones agrícolas 2019.
<http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>
- FAOSTAT, 2017. www.fao.or/faostat/en/#data/QC
- Farmacopea Nacional Argentina, Codex Medicamentarius Argentino, Séptima Edición,
volumen1. 2003. Control Microbiológico de Productos no Obligatoriamente
Estériles.
- Fehr, W.R., Caviness, C.E., 1977. Stages of Soybean development. Iowa St. Univ. Special
Report 80.11p.
- Ferri, M., Scandiani, M.M., Carmona, M.A., Formento, A.N., Tartabini, M.L., Lo Piccolo,
M, Luque, A.G., 2011. Aislamiento, características morfológicas y preservación de
Cercospora sojina. Libro de Resúmenes del 2º Congreso Argentino de
Fitopatología. Mar del Plata, 1-3 de junio 2011. p.382.

- Flores, W., Chico, J., Cerna, L., 2015. Actividad antagónica *in vitro* de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinérea*. Revista Rebiol. Vol. 35. N 1.
- Formento, N., 2007. Enfermedades foliares de la soja: momento de aplicación de fungicidas y rendimiento. En: INTA (Ed.), “Información técnica de cultivos de verano, campaña 2007”. INTA EEA Rafaela (Argentina) 108.
- Formento, A., Luque A., Ferrari, B., Ferri, M., Carmona, M., Lo Piccolo, M., Tartabini, M., Ballati, P., Scandiani, M., 2011. Avances en el conocimiento de *Cercospora sojina*, hongo causal de la mancha ojo de rana de la soja en Argentina. 5° Congreso de la soja del Mercosur. 1° foro de la soja Asia-Mercosur. Mercosoja. Rosario
- Formento, A. N., Mainez, H.J., Penco, R., Scandiani, M.M., Carmona, M.A., 2016. Calidad sanitaria de las semillas de soja 2016 y su efecto sobre el poder germinativo. Ediciones INTA. Serie Extensión INTA Paraná. N° 79: 81-89.
- FRAC. Fungicide Resistance Action Committee, 2017. FRAC Code List 2017: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Online publication. http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2017-final.pdf?sfvrsn=fab94a9a_2
- Gato Cárdenas, Y., 2010. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* rifai. Fitosanidad. V. 14. N 3. Versión online ISSN 1816-1686. Ciudad de la Habana.
- Georgopoulos, S.G., 1982. Genetical and biochemical background of fungicide resistance. Pp. 46-52. In: Fungicide Resistance in Crop Protection, J. Dekker and S.G. Georgopoulos, eds. Wageningen, Netherlands. Centre for agricultural Publishing and Documentation.

- Ghini, R., Kimati, H., 2002. Resistencia de fungos a fungicidas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 78 p.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., McCaffey, A., 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to QOI inhibitor fungicides. *Pest. Manage. Sci.* 58-859-867.
- Gómez, D.E., Reis, E. M., 2011. *Cercospora sojina*: Produção de esporos, densidade de inoculo e reação de cultivares de soja. Teses de mestre. Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Mestre em Agronomia – Área de concentração em Fitopatologia. Passo Fundo, Brasil.
- Gómez, G., Batista, C., 2006. Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos tropicales*, vol. 27, n 3. Pp 17-24. La Habana, Cuba.
- Groenewald, J.Z., Nakashima, C., Nishikawa, J., Shin, H.D., Park, J. H., Jama, A.N., Groenewald, M., Braun, U., Crous, P.W., 2012. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 75: 115-170. Hewit, H. 1998. Fungicides in crop protection. Chapter 4. Fungicide Performance. pp 87- 153. England, CABI.
- Guirong, Z., Dianne, K. P., Daniel V., Phillips, B., Bradley, C.A., 2011. CROP Protection. Sensitivity of *Cercospora sojina* isolates to quinone outside inhibitor fungicides.
- Hernandes, A.A., Roson, C., 2005. Evaluación del crecimiento y esporulación de *Aschersonia aleyrodis* (Webber) en medios de cultivo convencionales. *Fitosanidad* 9(3): 61-63. Cuba.
- Hewit, H., 1998. Fungicides in crop protection. Chapter 4. Fungicide Performance. pp 87- 153. England, CABI.
- Hino, T., Hasime, T., 1978. Some pathogens of cercoporiosis collected in Brazil. *Technical Bulletin TARC No. 11*, 1-130. Japan.

- Hobbelen, P.H.F., Paveley, N.D., van den Bosch F., 2014. The emergence of Resistance to Fungicides. PloS ONE 9(3):e91910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone0091910>
- Hollomon, D.W., 2015. Fungicide resistance: facing the challenge. Plant Protect. Sci., 51:170-176.
- Hong-Jie L., Ya-Li, D., Jin-Li, L., Hong, Y., and Fu-Xing, Z., 2015. Baseline Sensitivity of Pyraclostrobin and Toxicity of SHAM to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 99: 267-673.
- Ishii, H., 2015. Stability of Resistance. 35-48. In: Ishii, H., Hollomon, D.W., 2015. Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8>
- Imazaki, I., Ilizumi, H., Ishikawa, K., Sasahara, M., Yesuda, N., Kaizumi, S., 2006. Effects of thiophanate methyl and azoxystrobin on the composition of *Cercospora kikuchii* population with thiophanate methyl-resistant strains. J. General Plant Pathol. 72:292-300.
- Ivancovich, A., 2011. Enfermedades de soja: Diagnóstico y Manejo. Buenos Aires. Ediciones INTA. Pp. 5-6.
- Kantolic, A. G., Reis, E.M., Casa, R.T., 2012. Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado. Berthier. Passo Fundo, 2012.
- Kenneth Retana, J.A., Ramirez Coché, O., Castro, M.B., 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporium* f. sp. Appi asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. Agronomía costarricense. Revista de ciencias agrícolas, ISSN 0377-9424. Vol. 42, N 1, pg. 115-126.
- Kretschmer, M., 2012. Emergence of Multi- Drug Resistance in fungal Pathogens: A potential threat to fungicide performance in agriculture. 20: 251-268. In: Tarlochan,

- S.T. Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management. CABI. ISBN 1845939069, 9781845939069.
- Kubiuk, C.P., Zehentgruber, O., El- Kalak, H., Rohr, M., 1980. Regulation of citric acid production by oxygen: effect of dissolved oxygen tension on adeny late levels and respiration in *Aspergillus niger*. Enr. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9:101-115.
- Lago, M.E., Gamundi, J.C., Meyer, A., 2010. Aplicación oportuna de fungicidas para control de mancha en ojo de rana en soja. Para mejorar la producción 45. INTA EEA Oliveros. 127-130.
- Lartey, R. T., Weiland, J. J., Panella, L., 2010. A Brief History of Cercospora Leaf Spot of Sugar beet. Pages 1- 5, In: (eds. R. T. Lartey, J. J. Weiland, L. Panella, P. W. Crous, and C. E. Windels) Cercospora Leaf Spot of Sugar Beet and Related Species. APS Press Minneapolis. MN, USA.
- Latorre Rapela, M.G., Maumary, R., Marcipar, I., Lurá M.C., 2013. Modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de *Cercospora*. Revista FABICIB. Vol. 7, p. 66 - 73.
- Leadbeater, A., 2012. Resistance Risk to QoI Fungicides and Anti-Resistance strategies. 12: 141-154. In Tarlochan, S.T. Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management. CABI. ISBN 1845939069, 9781845939069.
- Lo Piccolo, M., Scandiandi, M., Formento N., Carmona, M., Tartabini, M., Biasoli, M., Ramadán, S., Luque, A., 2013. Preservation of isolates of *Cercospora sojina*. Research Conference World Soybean. Durban South Africa. WRSC IX. 2013.
- Lovato Echeverría, A.D., Gutiérrez, S.A., Carmona, M.A., 2015. Evaluación de métodos de cultivos en el crecimiento de *Alternaria padwickii*. Fitosanidad vol 19, num 1, pp 69-71. La Habana, Cuba.

- Lucas, J.A., Hawkins, N., Fraaije, B.A., 2015. The evolution of fungicide resistance. *Advances in Applied Microbiology*.
- Luque, A., 2010. Simposio Nacional MANCHA OJO DE RANA. Características morfológicas y aislamientos de *Cercospora sojina*. http://www.acsoja.org.ar/images/cms/contenidos/621_b.pdf
- MacFaddin, 1985. Media for isolation-cultivation-identification- maintenance of medical bacteria, vol 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- March, G.J., Oddino, C.M., García, J., Marinelli, A.D., Rago, A.M., 2011. Umbral de Daño Económico del maní según eficiencia fungicida y potencial de rendimiento. Ediciones INTA. ISSN 1851-4987.
- Martínez Alvarez, D., 2012. Historia de la soja en Argentina: introducción y adopción del cultivo, en: Baigorri, H. E. J. y Salado Navarro, L. R. 2012. El cultivo de soja en Argentina. pp. 11-31. I.S.B.N. 978-987-27584-I-7.
- Martins, S., Gravina, A., Sedyama, C.S., 2002. Genetic control of soybean resistance to race 4 of *Cercospora sojina* Hara in Northeast China. *Acata Phytopathologica Sinica* 27(2): 180.
- Mattio, M. C., 2006. Condiciones de desarrollo y esporulación *in vitro* de cepas de *Cercospora* que infectan soja. XIV Jornadas de Jovens Perquisadores da AUGM – Empreendedorismo, Inovacao Tecnologica e Desenvolvimento Regional. Universidad Estadual de Campinas. 2006.
- Melchers, L.E., 1925. Diseases of cereal and forage crops in the United States in 1924. *Plant Dis.* 40.186.
- Mengistu, A., Kurtzweil, N.C., Grau, C.R., 2002. First Report of Frogeye Leaf Spot (*Cercospora sojina*) in Wisconsin. *Disease Notes*, v. 86, n. 11.

- Mian, M.A.R., Missauoi, A.M., Walker, D.R., Phillips, D.V., Boerma, H.R., 2008. Frogeye leaf spot of soybean: A review and proposed race designations for isolates of *Cercospora sojina* Hara. *Crop Science*. 48:14-24.
- Miller, T.C., Gubler, W.D., 2004. Sensitivity of California isolates of *Uncinula necator* to trifloxystrobin and spiroxamine and update on triadimefon sensitivity. *Plant Dis*. 88: (11) 1205-1212.
- Minagawa, N. and Yoshimoto, A. 1987. The induction of cyanide- resistan respiration in *Hansenula Anomala*. *J. Biol Chem*. 101:1141-1146.
- Ministerio de Agroindustria, 2017. <http://www.agroindustria.gob.ar/datosagroindustriales> (consulta realizada en febrero de 2017).
- Molina Vargas, L.E., Melo Martinez, S.E., 2010. Importance of the statistical method applied to calculate the EC₅₀ and EC₉₅ of some isothiocyanates evaluated against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomía Colombiana*. 28(2), pp 235-244.
- Odetto, S., H. Baigorri., 2010. Taller Nacional Sobre la Mancha ojo de rana. EEA INTA Marcos Juárez.
- Oliver, R.P., Hewitt, G., 2014. *Fungicides in Crop Protection*, 2nd edition. CABI. ISBN 1780641664, 9781780641669
- Openstax College, *Biología* (CC BY 3.0), 2013. Chapter 7. Cellular respiration. 7.4. Oxidative Phosphorylation. https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:7oTVAgrZ@7/Oxidative-Phosphorylation
- Patel, J.S., Gudmestad, N.C., Meinhardt, S., Adhikari, T.B. 2012. Pyraclostrobin sensitivity of baseline and fungicide exposed isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Crop Protection*. 34(2012) 37-41.
- Peretti, L., Bracho, G., Argaraña, M.F., González, A.M., Vaira, S., Pioli, R., Lurá, M.C., 2012. Ensayos *in vitro* de fungicidas frente a aislamientos regionales de los hongos

- fitopatógenos *Cercospora kikuchii* y *Cercospora sojina*. Revista FABICIB. Volumen 16. Págs. 93 a 104.
- Phillips, D.V., 1999. Frogeye leaf spot. In: Compendium of Soybean Diseases. 4th ed. Hartman, G.L., Sinclair, J.B., Sinclair, J.C., Rupe, J.C. APS Press, St. Paul, MN. P. 20-21.
- Pinzon Gutiérrez, Y.A., Bustamante, S.L., Buitrago, G., 2009. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp.). Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XI No. 2. 8-18.
- Ploper, L.D., Devani, M., Zamorano, M.A., Gálvez, R., González, V., 2000. Prevalencia de la mancha ojo de rana en cultivos de soja del noroeste argentino y estrategias para su manejo. EEAOC- Avance Agroindustrial. 13-17.
- Ploper, L. D., González, V., Gálvez, M. R., Devani, M. R., Ledesma, F., Zamorano, M. A., 2001. Frogeye Leaf Spot of Soybean Caused by *Cercospora sojina* in Northwestern Argentina. Plant Dis. 85 (7): 801.
- Ploper, L.D., 2010. El virus de la desatención. Suplemento Rural, Diario Clarín, 24/07/2010, pág. 28.
- Pontón, J., 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev. Iberoam. Micol. 2008; 25: 78-82.
- Price, P.P. III., 2013. Sensitivity and resistance of *Cercospora kikuchii*, causal agent of *Cercospora* leaf blight and purple seed stain of soybean to selected fungicides. A Dissertation Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in The Department of Plant Pathology and Crop Physiology.

- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Recalde Rodríguez, X., Sanchez Rodriguez, A., 2017. Caracterización molecular y conservación de hongos del suelo asociados con la respuesta al estrés por Nitrogeno. Bionatura. Vol 2. N 4. Pág. 442. ISSN: 1390-9347.
- Reis, E.M., 1974. Mancha “olho-de ra” em soja. Revista Instituto Rio Grandense do arroz, Lavoura Arrozeira, v. 279, p. 4-8.
- Reis, A., Ribeiro, F.H.S., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., 2005. Sensitivity of brazilian isolates of *Phytophthora infestans* to commonly used fungicides in tomato and potato crops. Plant Dis. 89:(12)1279-1289.
- Reis, E.M., Reis, A.C., Carmona, M., 2010. Manual de fungicidas. Controle químico de doenças de plantas. 1ra Ed. Editorial Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil.
- Reis, E.M., Reis Camargo, A., Casa Trezzi, R., 2012. Mancha foliar olho-de-ra. En: Kantolic, A.G.; Reis, E.M.; Casa, R.T. 2012. Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado. 436 p. ISBN 978-85-7912-082-4
- Reis, E. M., Carmona, M. 2012. Fungicidas características, clasificación y principales usos. Seminario Técnico Internacional manejo de enfermedades en cereales de invierno y cultivos de verano Criterios para el uso de fungicidas en trigo cebada y Soja. 1-4 pp. Paysandú, Uruguay, ISBN 978-9974-0-0852-6 Ed Hemisferio Sur, Organizador: Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Paysandú Uruguay.
- Reis, E. M., Zanatta, M., Carmona, M., Menten, J. O. M., 2015. Relationship between IC50 determined in vitro/in vivo and the fungicide rate used in the field. Summa Phytopathologica, v.41, n.1, p.49-53, 2015

- Remussi, C., Pascale, A. J., 1966. El cultivo de la soja en la Argentina. Revista IDIA-INTA N° 225. Setiembre de 1966- pp. 13-16.
- Reyes Ramírez, A., Sánchez Ruiz, E., Chimal Yam, C., Chan Dzul, M., 2011. Selección de *Bacillus* spp. con actividad antagónica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en distintos medios de cultivo. Fitosanidad. Publicación electrónica. ISSN: 1818-1686. Vol. 15. N 2.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard D., 2015. Dose-Response Analysis Using R. PLoS ONE 10(12): e0146021. doi:10.1371/journal.pone.0146021.
- Russell, P., 2003 Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Ed: FRAC. 60 pp.
- Sadras, V.O., Ferreiro, M., Gutheim, F., Kantolic, A.G., 2002. Desarrollo fenológico y su respuesta a temperaturas y fotoperiodo. En: Andrade, F.H.; Sadras, V.O. 2012. Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja. ISBN: 987-521-047-1
- Salado Navarro, L.R., 2012. Ecofisiología de soja. Pp. 83-104. En: Baigorri, H. E. J. y Salado Navarro, L. R. 2012. El cultivo de soja en Argentina. ISBN 978-987-27584-1-7
- Sanchez Torres, P., 2007. Desarrollo de resistencia a fungicidas durante la postcosecha. Phytoma 189.
- Sánchez, R.A., 1980. La respiración insensible al cianuro y su relación con la productividad de las plantas. Rev. Facultad de Agronomía. 1(1): 109-116. 1980.
- Satorre, E.H., Bennech, A. R.L., Slafer, G.A., de la Fuente, E.B., Miralles, D.J., Otegui, M.E., Savin, R., 2003. Producción de granos. Bases funcionales para su manejo. ISBN 950-29-0713-2

- Sautua, F.J., Scandiani, M.M., Gordo, M., Carmona, M.A., Tartabini, M.L., Luque, A.G., 2018. Detection and chemical control of *Cercospora sojina* on soybean seed in Argentina. *Tropical Plant Pathology*. (En prensa).
- Scandiani, M.M., A.G. Luque., 2009. Identificación de Patógenos en Semillas de Soja. Análisis de Semillas. Suplemento Especial N°2. 148 pp. ISSN 1852-5024.
- Scandiani, M.M., Ferri, M., Carmona, M.A., Ruberti, D.S., Tartabini, M., Luque, A., 2009. Evaluación de fungicidas para el control de *Cercospora sojina* Hara. en semillas de soja. XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Santiago del Estero.
- Scandiani, M.M.; Ferrari, B.; Formento, N.; Luque A.; Carmona, M.; Tartabini, M. y Ferri, M., 2010. Evaluación de la resistencia y susceptibilidad de genotipos de soja (*Glycine max*) a la mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*). *Revista Análisis de Semillas* 4(14):67-72. ISSN 1851-1678.
- Scandiani, M., Ferri, M., Ferrari, B., Formento, N., Carmona, M., Luque, A., Balatti, P., 2012. First Report of races 11 and 12 of *Cercospora sojina*, the causal agente of Soybean Frogeye Leaf Spot in Argentina. *Plant Dis.* 96 (7): 1067.
- Schmitz, H.K., Medeiros, C.A., Craig, I.R., Stammler, G., 2013. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Manag. Sci.* 70:378-388.
- Sepulcri, G., Moschini, R., Carmona, M., 2015. Soybean Frogeye Leaf Spot (*Cercospora sojina*): first weather based prediction models developed from weather station and satellite data. *Advances in Applied Agricultural Science*. Volume 03. Issue 06, 01-13.
- Seyran, M., Brenneman, T. B., Stevenson, K. L., 2010. In vitro toxicity of alternative oxidase inhibitors salicylhydroxamic acid and propyl gallate on *Fusicladium effusum*. *J. Pestic. Sci.* 83:421-427.

- Sholberg, P.L., Bedford, K.E., Stoker, S., 2003. Effect of preharvest application of cyprodinil on postharvest decay of apples caused by *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 87, 1067-1071.
- 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 la roya de la soja.
- Smatnik, E., Weber, L., Dorrance, A., 2017. First Report of Frogeye Leaf Spot in Ohio. Is it sensitive?. Agronomic Crops Network. Ohio State University Extension. The Ohio State University – College of Food, Agricultural and Environmental Sciences. <http://agcrops.osu.edu/newsletter/corn-newsletter/2017-21/first-report-frogeye-leaf-spot-ohio---it-sensitive>.
- Standish, J.R., Tomaso - Peterson, M., Allen, T.W., Sabanadzovic, S., Aboughanem-Sabanadzovic, N., 2015. Occurrence of QoI Resistance in *Cercospora sojina* from Mississippi Soybean. Plant Dis. Vol. 99. N 10. P. 1347-1352.
- Stefanova, M., Leiva, A., Larringa, L., Coronado, M.F., 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16:509-516.
- Suárez-Contreras, L.Y., 2006. Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis en municipios del nororiente colombiano y ensayos preliminares para su control biológico. Respuestas vol. 11, n 1. ISSN: 0122-820x. E-ISSN: 2422-5053.
- Taylor, R.J., Salas, B., Secor, G.A., Rivera, U., Gudmestad, N.C., 2002. Sensitivity of North America isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefenoxam (metalaxyl). Plant Dis. 86:(7)797-802.
- Tonin, R.B., Reis, E.H., Gómez, D.E., 2011. Métodos *in vivo* e *in vitro* para determinar a sensibilidade de fungos a fungicidas. <http://ppct.caicyt.gov.ar/RIA>.

- Tonin, R.F.B. Avozani, A., Durante Danelli, A.L., Reis, E.M., Zoldan, S.H., Garcés-Fiallos, F.R., 2013. *In vitro* micelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. *Pesq. Agropec. Trop.*, 43(4):460-466.
- Twizeyimana, M., Hartman, G.L., 2017. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates to Fungicides and Reduction of Fungal Infection Based on Fungicide and Timing of Application. *Plant Dis.* 101(1): 121-128.
- Walker, A., Auclair, C., Gredt, M., Leroux, P., 2009. First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains. *Pest Manage. Sci.* 65:906-915
- Wise, K. A., Bradley, C. A., Pasche, J. S., Gudmestad, N. C., Dugan, F. M., Chen, W., 2008. Baseline sensitivity of *Ascochyta rabiei* to azoxystrobin, pyraclostrobin, and boscalid. *Plant Dis.* 92:295-300.
- Wrather, J.A., Anderson, T.R., Arsyad, D.M., Gai, J., Ploper, L.D., Porta-Puglia, A., Ram, H.H., Yorinori, J.T., 1997. Soybean Disease Loss Estimate for the Top 10 Soybean Producing Countries in 1994. Special Report. *Plant Disease*. Vol. 81, number 1, pp 107-110.
- Xu, T., Wang, Y. T., Liang, W. S., Yao, F., Li, Y.H., Li, D. R., Wang, H., Wang, Z. Y., 2013. Involvement of alternative oxidase in the regulation of sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* to the fungicides azoxystrobin and procymidone. *J. Microbiol.* 51:352-358.
- Yorinori, J.T., 1989. Frogeye Leaf Spot of Soybean (*Cercospora sojina* Hara). En: *Actas de la IV Conferencia Mundial de Investigación en Soja*. 5-9 marzo, Buenos Aires, Argentina. pp. 1275-1283.

- Yorinori, J.T., 1992. Management of foliar fungal diseases in Brazil. p. 185-193. In: L.G. Copping *et al.* (ed.) Pest management in soybean. Elsevier Applied Science, London, England.
- Yorinori, J.T., Klingelfuss, L.H., 1999. Novas racas de *Cercospora sojina* em soja. Fitopatologia Brasileira, 24:509-512.
- Zeng, F., Arnao, E., Zhang, G., Olaya, G., Wullschleger, J., Sierotzki, H., Ming, R., Bluhm, B.H., Bond, J.P., Bradley, C.A., 2015. Characterization of quinone outside inhibitor fungicide resistance in *Cercospora sojina* and development of diagnostic tools for its identification. Plant Dis. 99: 544 - 550.
- Zhang, G.R., Newman, H.A., Bradley, C.A., 2012. First report of the soybean frogeye leaf spot fungus (*Cercospora sojina*) resistant to quinone outside inhibitor fungicides in North America. Plant. Dis. 96: (5)767.
- Zhang, G., Bradley, C.A., 2017. Comparison of quinone outside inhibitor fungicide – resistant and sensitive isolates of *Cercospora sojina*. Crop Protection 97 (2017) 59-63.
- Zhao, L., Chen Y., Schaffner, D.W., 2001. Comparison of logistic regression and linear regression in modeling percentage data. Appl. Envirom. Microbiol. 67(5), 2129-21358

APÉNDICE

Cálculos estadísticos

Cálculos estadísticos

Tabla 6.1: Test no paramétrico de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5% para los modelos de ajuste log-logístico de cuatro parámetros (LL.4), asimétrico Weibull tipo I (W1.4) y II (W2.4).

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Fungicidas	Modelo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
CI50	azoxystrobin + cyproconazo..	LL4	1	0,03	0,00	0,03	14,00	0,4497
CI50	azoxystrobin + cyproconazo..	W1	1	0,01	0,00	0,01		
CI50	azoxystrobin + cyproconazo..	W2	1	0,02	0,00	0,02		
CI50	carbendazim	LL4	1	0,03	0,00	0,03		
CI50	carbendazim	W1	1	0,03	0,00	0,03		
CI50	carbendazim	W2	1	0,02	0,00	0,02		
CI50	picoxystrobin + cyproconaz..	LL4	1	0,01	0,00	0,01		
CI50	picoxystrobin + cyproconaz..	W1	1	4,1E-03	0,00	4,1E-03		
CI50	picoxystrobin + cyproconaz..	W2	1	0,01	0,00	0,01		
CI50	pyraclostrobin + epoxiconaz..	LL4	1	0,01	0,00	0,01		
CI50	pyraclostrobin + epoxiconaz..	W1	1	1,2E-03	0,00	1,2E-03		
CI50	pyraclostrobin + epoxiconaz..	W2	1	0,01	0,00	0,01		
CI50	trifloxystrobin + cyprocon..	LL4	1	2,6E-03	0,00	2,6E-03		
CI50	trifloxystrobin + cyprocon..	W1	1	8,0E-04	0,00	8,0E-04		
CI50	trifloxystrobin + cyprocon..	W2	1	0,01	0,00	0,01		

Tabla 6.2: Test no paramétrico de Kruskal Wallis con un nivel de significancia del 5% de las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) en promedio de los cinco fungicidas ensayados: pyraclostrobina + epoxiconazole; picoxystrobina + cyproconazole; trifloxystrobina + cyproconazole y azoxystrobina + cyproconazole y carbendazim

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Fungicida	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
CI50	azoxystrobina + cyproconaz..	6	0,02	0,03	0,01	13,88	0,0077
CI50	carbendazim	6	0,02	0,03	0,01		
CI50	picoxystrobina + cyprocona..	6	4,1E-03	4,3E-03	2,7E-03		
CI50	pyraclostrobina + epiconaz..	6	1,2E-03	1,7E-03	4,9E-04		
CI50	trifloxystrobina + cyproco..	6	8,0E-04	1,1E-03	1,5E-04		

Trat.	Ranks
trifloxystrobina + cyproco..	7,50 A
pyraclostrobina + epiconaz..	10,00 A
picoxystrobina + cyprocona..	16,00 A B
carbendazim	21,67 B
azoxystrobina + cyproconaz..	22,33 B

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

Tabla 6.3: Análisis de la varianza y test de Tukey de la sensibilidad a fungicidas de seis aislados de *C. sojina*.**Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CI50	30	0,32	0,18	202,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,8E-03	5	9,5E-04	2,24	0,0831
Aislado	4,8E-03	5	9,5E-04	2,24	0,0831
Error	0,01	24	4,3E-04		
Total	0,01	29			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04032

Error: 0,0004 gl: 24

Aislado	Medias	n	E.E.	
232-10	2,5E-03	5	0,01	A
278-10	2,8E-03	5	0,01	A
234-10	0,01	5	0,01	A
269-10	0,01	5	0,01	A
243-10	0,01	5	0,01	A
172-09	0,04	5	0,01	A

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

Tabla 6.4: Análisis de la varianza y test de Tukey para ensayo de sensibilidad in vivo. Incidencia de *C. sojina* sobre los tratamientos T1 (testigo sin inoculación ni fungicida), T2 (testigo sin inoculación más fungicida), T3 (aislado más sensible sin fungicida), T4 (aislado menos sensible sin fungicida), T5 (aislado más sensible con fungicida) y T6 (aislado menos sensible con fungicida)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Incidenia	30	0,25	0,16	92,52

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3750,95	3	1250,32	2,84	0,0573
Tratamiento	3750,95	3	1250,32	2,84	0,0573
Error	11435,71	26	439,84		
Total	15186,67	29			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=29,77646

Error: 439,8352 gl: 26

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
T5	8,57	7	7,93	A	
T3	17,50	8	7,41	A	B
T4	25,00	8	7,41		B
T6	40,00	7	7,93		B

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

Tabla 6.5: Análisis de la varianza y test de Tukey para ensayo de sensibilidad in vivo. Severidad de *C. sojina* sobre los tratamientos T1 (testigo sin inoculación ni fungicida), T2 (testigo sin inoculación más fungicida), T3 (aislado más sensible sin fungicida), T4 (aislado menos sensible sin fungicida), T5 (aislado más sensible con fungicida) y T6 (aislado menos sensible con fungicida)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	32	0,33	0,26	30,24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12,50	3	4,17	4,67	0,0091
Tratamiento	12,50	3	4,17	4,67	0,0091
Error	25,00	28	0,89		
Total	37,50	31			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,28995

Error: 0,8929 gl: 28

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
T3	2,50	8	0,33	A
T5	2,50	8	0,33	A
T6	3,75	8	0,33	A
T4	3,75	8	0,33	A

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