



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

TESIS DOCTORAL

**Sensibilidad y resistencia a fungicidas de *Cercospora kikuchii*,
agente causal del tizón de la hoja y mancha púrpura de la
semilla de la soja**



Ing. Agr. Mg. Francisco José Sautua

**Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor de la Facultad de
Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata**

Tesista: Ing. Agr. Mg. Francisco José Sautua

Director de tesis: Dr. Marcelo Aníbal Carmona

Codirectora de tesis: Dra. Mercedes Scandiani

Asesor académico: Dra. Cecilia Mónaco

Jurado de tesis

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Dr. Juan Manuel Palazzini

Dr. Diego Alejandro Sampietro

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, a mis padres Ángel y Filo por su apoyo incondicional y porque permitieron que esta tesis sea posible, a mi hermano Fede, a mis tías y tíos, primos.

A Haydeé

Un especial agradecimiento al Dr. Marcelo Carmona por su constante acompañamiento y apoyo a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Mercedes Scandiani por toda su ayuda.

A la Dra. Cecilia Mónaco por su ayuda.

A todos los investigadores que colaboraron con el proyecto, Vinson Doyle, Trey Price, Oscar Pérez Hernández, Paula Fernandez, Sergio Gonzalez, Sebastián Moschen, Marcelo Berretta, Máximo Rivarola, Susana Perelman, Virginia López, Ricardo Bello, Alicia Luque, Norma Formento, Silvia Graciela Distéfano, Daniel Ploper, Vicente De Lisi, Sebastian Reznikov.

A todos los técnicos que colaboraron con el proyecto, Alejandro Porfiri, Hernán Ghiglione, Diego Alvarez, Belén Bravo, Andy Rosso, Carlos Grosso, Lucas Vettorello, Barbarina Milanesio, Gustavo Duarte, Cristian Brambilla, Manuela Gordó, Julián García, Lucrecia Couretot, Ernesto Sakima, Fabricio Mock, Esteban Bilbao, Agustín Bilbao, Natali Lazzaro, Pablo Pasqualini, Gastón Collova, Agustín Rocha.

A los jurados de tesis y evaluadores de proyecto por su tiempo y dedicación.

A la empresa BASF por la ayuda económica. A las empresas NOVA SA y Agrofina SA por proveer los fungicidas grado técnico.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

REVISTAS INTERNACIONALES

Sautua FJ, Doyle VP, Price PP III, Porfiri A, Fernandez P, Scandiani MM, Carmona MA (2020) Fungicide resistance in *Cercospora* species causing cercospora leaf blight and purple seed stain of soybean in Argentina. Plant Pathology 69: 1678-1694. <https://doi.org/10.1111/ppa.13261>

Sautua FJ, Searight J, Doyle VP, Scandiani MM, Carmona MA (2020) *Cercospora* cf. *nicotianae* is a causal agent of Cercospora Leaf Blight of soybean. European Journal of Plant Pathology 156: 1227–1231. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01969-z>

Sautua FJ, Gonzalez SA, Doyle VP, Berretta MF, Gordó M, Scandiani MM, Rivarola ML, Fernandez P, Carmona M (2019) Draft genome sequence data of *Cercospora kikuchii*, a causal agent of Cercospora leaf blight and purple seed stain of soybeans. Data in Brief 27, 104693. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104693>

Sautua FJ, Searight J, Doyle VP, Price PP III, Scandiani MM, Carmona MA (2019) The G143A mutation confers azoxystrobin resistance to soybean *Cercospora* leaf blight in Bolivia. Plant Health Progress 20(1): 2-3. <https://doi.org/10.1094/PHP-10-18-0060-BR>

CONGRESOS

Sautua FJ, Doyle VP, Price PP III, Porfiri A, Fernandez P, Scandiani MM, Carmona MA (2021) Sensibilidad y resistencia a fungicidas de *Cercospora kikuchii* en soja en Argentina. 5º Congreso argentino de fitopatología, 59th Meeting of the APS Caribbean división. 22 y 23 de septiembre de 2021 (modalidad virtual).

Sautua FJ, Doyle V, Scandiani M, Carmona M (2021) Hospedantes alternativos de especies de *Cercospora* spp. causantes de tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla de soja en argentina. 5º Congreso argentino de fitopatología, 59th Meeting of the APS Caribbean división. 22 y 23 de septiembre de 2021 (modalidad virtual).

Sautua FJ, Sommantico SN, Carmona MA (2020) ¿Es el método de la cámara húmeda efectivo para la detección temprana de *Cercospora kikuchii* en el cultivo de soja? 1er Congreso Argentino de semillas, “germinando nuevas ideas”, 3 y 4 de noviembre 2020 (modalidad virtual).

Sautua FJ, Perez-Hernandez O, Carmona M, Scandiani M, Ziegler V (2018) Characterization of the temporal progress of soybean cercospora leaf blight using a tactical on-plant-canopy method. APS North Central Division Meeting, June 12-14, 2018 at the Radisson Hotel Fargo in Fargo, North Dakota.

Pérez-Hernández O, **Sautua FJ**, Ziegler V, Scandiani M, Carmona MA (2018) Novel, practical, and reliable method to assess intensity of *Cercospora* leaf blight in soybean. APS North Central Division Meeting, June 12-14, 2018 at the Radisson Hotel Fargo in Fargo, North Dakota.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----|
| RESUMEN | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| CAPÍTULO 1 | 10 |
| Introducción General | 10 |
| 1. El cultivo de soja en Argentina, importancia económica y principales enfermedades | 10 |
| 2. Tizón de la hoja (TH) y mancha púrpura de la semilla (MPS) | 11 |
| 3. Relación hospedante-patógeno: factores de patogenicidad/virulencia y resistencia..... | 20 |
| 4. Manejo integrado del TH y la MPS | 24 |
| 5. Objetivos e hipótesis de la tesis | 28 |
| 5.1. Objetivo general..... | 28 |
| 5.2. Objetivos específicos: | 28 |
| 6. Diagrama de tesis..... | 29 |
| CAPÍTULO 2 | 31 |
| Aislamiento, caracterización morfológica y filogenética de cepas de <i>Cercospora</i> spp. causantes de tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla de soja en Argentina | 31 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 31 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 51 |
| 3. RESULTADOS | 78 |
| 4. DISCUSIÓN | 175 |
| CAPÍTULO 3 | 189 |
| Análisis de la sensibilidad y resistencia de aislados argentinos de <i>Cercospora</i> spp. causantes de tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla de soja a fungicidas | 189 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 189 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 211 |
| 3. RESULTADOS | 227 |
| 4. DISCUSIÓN | 288 |
| CAPÍTULO 4 | 295 |
| 1. DISCUSIÓN GENERAL | 295 |
| 2. CONCLUSIONES | 301 |
| 3. CONSIDERACIONES FINALES..... | 303 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 305 |
| ANEXO I..... | 351 |
| ANEXO II..... | 371 |
| ANEXO III | 391 |

NOTA: en la presente tesis se ha optado por el uso de acrónimos en Inglés debido a su amplia difusión en la literatura internacional.

RESUMEN

En Argentina, diferentes especies de *Cercospora* causan el tizón de la hoja (TH) y la mancha púrpura de la semilla (MPS) en soja. Debido a que no hay variedades de soja resistentes disponibles en el mercado, el manejo de TH/MPS depende en gran medida de aplicaciones de fungicidas. En este estudio se determinó la sensibilidad de 62 cepas de *Cercospora* argentinas a fungicidas inhibidores de la desmetilación (DMI), carbamato de metilbenzimidazol (MBC), inhibidores de la quinona externa (QoI), inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHI) y mancozeb. Todos los aislados fueron sensibles a difenoconazole, epoxiconazole, protioconazole, tebuconazole y cyproconazole (los valores de EC_{50} variaron de 0,006 a 2,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Por el contrario, la mitad (51%) de los aislados fueron sensibles (los valores de EC_{50} variaron de 0,003 a 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y la mitad (49%) altamente resistentes ($EC_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) a carbendazim. Todos los aislados fueron completamente resistentes a azoxystrobina, trifloxystrobina, pyraclostrobina e insensibles a boscalid, fluxapyroxad y pydiflumetofen ($EC_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). La mutación G143A se detectó en el 82% de los aislados resistentes a QoI y la mutación E198A en el 97% de los aislados resistentes a carbendazim. No se detectaron mutaciones de resistencia aparentes en los genes que codifican para las subunidades B, C y D de la succinato deshidrogenasa. Mancozeb inhibió completamente el crecimiento micelial de los aislados evaluados a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todos los aislados argentinos de *Cercospora* fueron sensibles a los fungicidas DMI evaluados, pero se reporta por primera vez resistencia a los fungicidas QoI y MBC. Otro mecanismo(s) además de la modificación del sitio objeto de control del fungicida podrían ser responsable(s) de la resistencia de *Cercospora* a los fungicidas QoI y MBC. Además, debido a la reciente introducción de fungicidas SDHI en soja en Argentina, se especula que las especies de *Cercospora* que causan TH/MPS son insensibles (naturalmente resistentes) a este grupo de fungicidas. La insensibilidad debe confirmarse en condiciones de campo.

ABSTRACT

In Argentina, *Cercospora* species cause Cercospora leaf blight (CLB) and purple seed stain (PSS) on soybean. Because there are no resistant soybean varieties available, CLB/PSS management relies heavily upon fungicide applications. Sensitivity of 62 Argentinean *Cercospora* isolates to demethylation inhibitor (DMI), methyl benzimidazole carbamate (MBC), quinone outside inhibitor (QoI), succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicides and mancozeb was determined in this study. All isolates were sensitive to difenoconazole, epoxiconazole, prothioconazole, tebuconazole and cyproconazole (EC_{50} values ranged from 0.006 to 2.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). In contrast, half (51%) of isolates were sensitive (EC_{50} values ranged from 0.003 to 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and half (49%) highly resistant ($EC_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) to carbendazim. Most interestingly, all isolates were completely resistant to azoxystrobin, trifloxystrobin, pyraclostrobin and insensitive to boscalid, fluxapyroxad and pydiflumetofen ($EC_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). The G143A mutation was detected in 82% of the QoI-resistant isolates and the E198A mutation in 97% of the carbendazim-resistant isolates. No apparent resistance mutations were detected in the succinate dehydrogenase genes (subunits *sdhB*, *sdhC* and *sdhD*). Mancozeb completely inhibited mycelial growth of the isolates evaluated at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. All Argentinean *Cercospora* isolates were sensitive to DMI fungicides tested, but we report for the first time resistance to QoI and MBC fungicides. Other mechanism(s) than fungicide target-site modification may be responsible for resistance of *Cercospora* to QoI and MBC fungicides. Moreover, due to the recent introduction of SDHI fungicides on soybean in Argentina, we speculate *Cercospora* species causing CLB/PSS are insensitive (naturally resistant) to this group of fungicides. Insensitivity must be confirmed under field conditions.

CAPÍTULO 1

Introducción General

1. El cultivo de soja en Argentina, importancia económica y principales enfermedades

Dentro de los cultivos extensivos de grano, la soja [*Glycine max* (L.) Merrill] es uno de los más importantes de la Argentina en relación a la superficie sembrada, producción, rentabilidad e ingresos de divisas extranjeras a la economía nacional (Senesi et al., 2016). Durante los últimos 11 ciclos agrícolas (2009/2010 a 2019/2020), este cultivo ocupó anualmente en promedio 18 millones de hectáreas sembradas/cosechadas con un rendimiento de 2.8 tn ha⁻¹, totalizando una producción de 51 millones de toneladas (MINAGRI, 2020).

El cultivo de la soja es afectado por enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y nematodos (Laguna et al., 2008; Carmona et al., 2015a; Hartman et al., 2015). Numerosas enfermedades fúngicas, económicamente importantes, afectan hojas, tallos, vainas y semillas. En Argentina, al igual que en otras regiones productoras de soja como Brasil, Paraguay, Uruguay, Bolivia y en los Estados Unidos (EE. UU.), la combinación de la siembra directa (**SD**) con el monocultivo, el cambio climático y la difusión de genotipos susceptibles, generaron durante las dos últimas décadas condiciones óptimas para el desarrollo epidémico de varios patógenos necrotróficos (Carmona et al., 2017a). Éstos sobreviven en rastrojos y semillas, causando importantes enfermedades responsables de daños y pérdidas significativas todos los años. Dentro de este grupo de enfermedades deben destacarse, por su prevalencia e intensidad, las denominadas “enfermedades de fin de ciclo” (**EFC**) de la soja. Este grupo o complejo de enfermedades afectan hojas, tallos, vainas y semillas, expresando sus síntomas y signos hacia etapas reproductivas avanzadas del cultivo de soja (Díaz et al., 2005; Formento et al., 2009; Distéfano y Gadbán 2009, Marinelli et al., 2011a). En general, se estima que las EFC causan daños anuales promedio de 10%, con un máximo de 30%, dependiendo de las condiciones ambientales de cada año en particular (Wrather et al., 2010; Carmona et al., 2015b; Carmona et al., 2017a). Las EFC más frecuentes en Argentina son: el **tizón de la hoja (TH)** y la **mancha púrpura de la semilla (MPS) de la soja**, causados por *Cercospora kikuchii* (T. Matsumoto & Tomoyasu) M.W. Gardner, la antracnosis causada por *Glomerella glycines* (Hori) Lehman & Wolf (teleomorfo) y *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrews & WD Moore, *Colletotrichum* spp. (anamorfos) (Ramos et al., 2013), la mancha marrón (MM) causada por *Septoria glycines* Hemmi, el tizón de la vaina y el tallo causada por *Phomopsis* spp. (anamorfo) y *Diaporthe* spp. (teleomorfo), el tizón bacteriano causado por *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* y la pústula bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (propuesta de reclasificación como *Xanthomonas citri* pv. *glycines* (Nakano 1919), Constantin et al. 2016) (Carmona, 2014; Carmona et al., 2015a,b).

Dentro del complejo de las EFC, la MM y el TH/MPS son las enfermedades de mayor prevalencia en Argentina (Distéfano & Giorda 1997; Ivancovich & Botta, 2000; Ploper et al., 2001; Carmona et al., 2004; Distéfano & Gadbán, 2007; Couretot, 2011, Carmona, 2014; Carmona et al., 2015a,b; Carmona et al., 2017a). En relevamientos efectuados en Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe desde 2003 a 2008, la MM estuvo presente en el 100% de los lotes evaluados con una severidad entre 17 y 46%, mientras que el TH se presentó en el 53% de los mismos, con una severidad máxima del 38% (Carmona et al., 2010). En Tucumán, las enfermedades prevalentes fueron MM, TH, roya asiática de la soja (RAS) causada por *Phakopsora pachyrhizi* (Carmona et al., 2007), pústula bacteriana y mancha anillada (*Corynespora cassiicola*), con incidencias entre 40 y 100% y severidades entre 5 y 80% (De Lisi et al., 2014). En la región pampeana, el TH/MPS es la enfermedad que más creció en prevalencia e intensidad en el cultivo de soja durante los últimos años (Carmona, 2014; Carmona et al., 2015a,b; Carmona et al., 2017a).

2. Tizón de la hoja (TH) y mancha púrpura de la semilla (MPS)

Actualmente, el TH y la MPS son enfermedades de distribución mundial, presentes en todas las regiones en las que se cultiva la soja, especialmente en aquellas con lluvias frecuentes durante la maduración del cultivo (Roy y Abney, 1976). El TH/MPS son enfermedades económicamente importantes y pueden causar pérdidas sustanciales de rendimiento en muchos países (Chen et al., 1979a; Wrather et al., 1997, 2001, 2010; Ward et al., 2015). En el estado de Louisiana, EE. UU., en donde el TH/MPS es una de las principales enfermedades que afectan el cultivo de soja, se han estimado pérdidas de rendimiento desde 20% hasta 100%, considerándola una enfermedad devastadora (Cai et al., 2009; Ward et al., 2013; Silva et al., 2014a,b; Ward, 2015). En Argentina, aún no se disponen de estimaciones de daños y pérdidas a campo específicas para esta enfermedad. Una de las razones de esta deficiencia es la complejidad y dificultad de estimar estos parámetros solamente para el TH/MPS, ya que estas enfermedades siempre se encuentran a campo en conjunto con otras enfermedades del complejo de las EFC. Sin embargo, como referencia, en los EE. UU. los daños promedio anuales por esta enfermedad se estimaron entre 2012 y 2014 en EE. UU. y Ontario (Canadá) en 178,000 toneladas (Allen et al., 2017). Recientemente, Bandara et al. (2020) estimaron pérdidas económicas anuales promedio debido a TH/MPS en 28 estados de los EE. UU. entre 1996 y 2016 en 85 millones de dólares.

El agente causal de estas enfermedades, el hongo hemibiotrófico *C. kikuchii*, causa síntomas en hipocótilos, hojas, tallos, pecíolos, vainas y semillas (Matsumoto y Tomoyasu, 1925; Lehman, 1950; Murakishi, 1951; Kilpatrick, 1956; Jones, 1968). Si bien históricamente fueron descritas como dos enfermedades distintas conocidas por sus síntomas típicos en hojas y semillas, el tizón de la hoja (TH) y la mancha púrpura de la semilla (MPS) (Ward et al., 2015), respectivamente, conforman una única enfermedad causada por *C. kikuchii*. En un primer momento, su importancia fue vinculada

exclusivamente a las semillas. Sin embargo, Lehman (1950) observó en plantas inoculadas que el patógeno también afectaba otras partes de las plantas de soja: semillas, tallos, hojas y vainas. Varias especies de *Cercospora* spp., incluyendo *C. kikuchii*, producen una fitotoxina inespecífica de coloración rojiza, denominada **cercosporina**, que juega un papel importante en la patogenicidad, expresión de síntomas y virulencia (Assante et al., 1977; Goodwin et al., 2001; Upchurch et al., 1991; Velicheti y Sinclair, 1994). Históricamente, se ha hipotetizado que la pigmentación púrpura a morada, típica de las plantas afectadas por TH/MPS, es el resultado de la acumulación de cercosporina (Walters, 1980). Por ejemplo, Velicheti et al. (1994) demostraron una correlación positiva entre la intensidad de la MPS y la cantidad de cercosporina en tegumento. Sin embargo, esta aseveración aún no se ha demostrado experimentalmente en otros tejidos vegetales.

La primera referencia a la MPS en el cultivo de soja se realizó en Corea en 1921 (Suzuki, 1921), luego en Japón en 1924 (Kikuchi, 1924), mientras que en Argentina se encontró en semillas en 1981 (Barreto et al., 1981). Los síntomas de esta enfermedad se caracterizan por manchas irregulares de color rosa claro a púrpura oscuro, que cubren desde una pequeña mancha a toda la superficie de la cubierta seminal, acompañadas en ocasiones por un agrietamiento del tegumento (Murakishi, 1951) (Figura 1). *C. kikuchii* se puede transmitir tanto por semillas con síntomas como asintomáticas, con diferentes porcentajes de transmisión (Sinclair, 1991; Formento & de Souza, 2007; García et al., 2009; Marinelli et al., 2011b). En las semillas en formación, *C. kikuchii* coloniza inicialmente la cubierta seminal o tegumento donde produce cercosporina y las hifas penetran a través de los poros pudiendo infectar también los tejidos embrionarios de la semilla, produciendo necrosis de las células de cotiledones y elementos vasculares (Ilyas et al., 1975; Chen et al., 1979a; Singh y Sinclair, 1986; Velicheti et al., 1994). La MPS es una enfermedad agrónomicamente importante porque reduce el valor de mercado, la calidad de procesamiento y el vigor de la semilla (Lehman, 1950; Murakishi, 1951; Wilcox y Abney, 1973; Roy y Abney, 1976; Pathan et al., 1989; Lee et al., 2015). Sin embargo, la MPS no afecta el poder germinativo de las semillas, la madurez, cobertura y altura de la planta (Wilcox y Abney, 1973; Galli et al., 2005).



Figura 1. Síntomas típicos de la mancha púrpura de la semilla (MPS) causado por *C. kikuchii*. La muestra fue tomada en un campo de soja en madurez fisiológica (R8) en Villa Mercedes, San Luis, en abril 2016. Fotos: Sautua F.

El TH, también conocido como tizón morado de la soja, se caracteriza por producir tizón (tejido necrótico) y coloración púrpura en las hojas (Chupp, 1954; Ward et al., 2015). Las lesiones son variables, angulares a irregulares, donde la aparición de rugosidad y un color morado a púrpura bronceado es la característica típica (Figura 2). El desarrollo de los síntomas del TH comienza como una apariencia coriácea y un color bronce morado en la superficie adaxial de las hojas y, a medida que la enfermedad progresa, las hojas moradas se vuelven necróticas, lo que provoca síntomas de tizón y

defoliación en el tercio superior del canopeo de los cultivos de soja (Walters, 1980). A medida que progresa el tizón, se observan áreas necróticas de color marrón, gris y negro oscuro, correspondientes al tejido necrótico (Figura 2). Se cree que las hojas del tercio superior del canopeo manifiestan los síntomas con mayor intensidad ya que la cercosporina es fotoactiva (Daub, 1982; Lurá et al., 2007; 2011). Los síntomas típicos del TH se observan en etapas reproductivas avanzadas del cultivo de soja, principalmente desde el inicio del llenado de las semillas (R5), pasando por el final del llenado (R6), hasta el inicio de la madurez fisiológica (R7) (Walters, 1980; Sautua, 2005; Kudo et al., 2011; Carmona et al., 2010; Carmona et al., 2011a), según la escala de Fehr y Caviness (Fehr et al., 1971; Fehr y Caviness; 1977). Numerosas infecciones causan una rápida clorosis y necrosis de tejido foliar, y las infecciones severas pueden causar defoliación o senescencia prematura en estadios avanzados del cultivo (Walters, 1980).





Figura 2. Síntomas típicos del tizón de la hoja (TH) causado por *C. kikuchii*. Fotos: Sautua F.

En las vainas se observa un manchado generalizado de color morado, que luego se torna de color negro oscuro en correspondencia con la esporulación del patógeno (Fotografía 3). Una vez infectadas las vainas, el patógeno coloniza sus tejidos y desde allí infecta las semillas en formación. Además, *C. kikuchii* se aisló en un 87 a 99% a partir de semillas con síntomas de MPS y en un 3 a 11% a partir de semillas asintomáticas (Murakishi, 1951; Wilcox, 1973; Walters, 1980; Imazaki, 2006b).



Figura 3. Síntomas típicos del TH/MPS causado por *C. kikuchii* en vainas y semillas de soja. Notar las manchas oscuras, negras, en el interior (b) y exterior (c) de las vainas, las cuales se comprobó durante el desarrollo de esta tesis que corresponden al TH/MPS, causadas por *C. kikuchii*. Las flechas blancas (c) señalan las manchas oscuras en el exterior de las vainas, que se corresponden con las manchas del interior (b) y semillas púrpuras. Fotos: Sautua F.

El patógeno sobrevive durante prolongados períodos de tiempo en semillas y restos culturales (rastros) en el campo, constituyendo las principales fuentes de inóculo primario (Kilpatrick, 1956; Jones, 1968; Orth and Schuh 1994; Baird et al., 1997; Almeida et al., 2001). Si bien el autor y directores de esta tesis nunca han observado rastrojo esporulado a campo (sin incubación de laboratorio) en Argentina, Price P.P. III (com. pers.) ha confirmado la presencia de rastrojo esporulado en Louisiana, siendo “bastante común visualizar a campo hojas esporuladas de color grisáceo sobre restos culturales, luego de la cosecha en el sur de EE. UU.”. Cabe aclarar que con unas pocas horas de incubación en cámara húmeda, el autor y directores han confirmado abundante esporulación a partir de rastros recolectados en campos de Argentina y Bolivia. En un experimento llevado a cabo en Mississippi, E.E. U.U., en 1951, tallos infectados se dejaron a la intemperie (simulando un rastrojo infestado) y porciones del mismo se fueron examinando a intervalos de 6 meses. La esporulación observada fue abundante hasta los 18 meses, disminuyendo en cada examinación. Luego de 3 ½ años aún se pudo aislar el patógeno (permaneció viable en el rastrojo) (Nance, 1957). Asimismo, se ha confirmado que especies de *Cercospora* spp. agentes causales de TH/MPS pueden infectar numerosos hospedantes secundarios, por lo que muchas malezas son consideradas fuente de inóculo primario de la enfermedad (McLean & Roy, 1983; Borges et al., 2018). La mayoría de las especies del género *Cercospora*, incluyendo *C. kikuchii*, poseen estado sexual desconocido (Goodwin et al., 2001; Groenewald et al., 2013). Los conidios de origen asexual son, por lo tanto, las esporas que se dispersan durante la infección inicial y en infecciones secundarias (Figura 4). Éstos son transportados por el viento desde rastros o desde tejidos verdes infectados de soja u hospedantes secundarios, cuando la superficie de los órganos esporulantes se encuentra seca (Imbusch et al., 2021). La coincidencia de alta humedad relativa (> 90%), temperaturas entre 20 y 30°C con un óptimo de 25°C y la ocurrencia de horas de mojado foliar (> 18hs) favorece la infección (Schuh, 1991, 1992, 1993). A diferencia del resto de los agentes causales de EFC, que requieren de la energía cinética de las salpicaduras de gotas de agua de lluvia para su dispersión por poseer fructificaciones hidrofílicas (Carmona et al., 2015b), *C. kikuchii* no requiere agua para la dispersión ya que sus conidios (considerados secos) se forman en conidióforos libres y son dispersados por el viento (Kudo et al., 2011; Ward et al., 2015; Galagedara et al., 2020). En este caso, la dispersión ocurre a cortas distancias debido al gran tamaño y peso de los conidios (Imazaki et al., 2007; Yorinori, 2011; Reis et al., 2012). Una vez que los conidios se depositan sobre la superficie del hospedante (deposición o inoculación), este patógeno requiere de agua libre sobre la superficie foliar (horas de mojado) para poder completar los procesos de germinación de conidios, penetración y establecimiento de la relación de parasitismo con el hospedante (infección). La combinación de una determinada cantidad de horas de mojado a una determinada temperatura influye en el desarrollo de todos estos procesos tomados en conjunto y se denomina período crítico de infección (Bergamin Filho et al., 1995; Agrios, 2005). En este sentido, Schuh (1991, 1992) determinó que *C. kikuchii* requiere un mínimo de

18 horas de mojado foliar o de vainas para infectar hojas y vainas de soja. Este investigador observó un incremento de la incidencia de la enfermedad al incrementarse los períodos de mojado de vainas hasta 30 horas; y que la temperatura óptima de infección fue de 25°C, no observando infección a 15°C ni a 30°C (hojas) o 35°C (vainas), cuando se inocularon hojas o vainas de soja con una suspensión de conidios. Varios autores han confirmado que las condiciones ambientales óptimas para la infección de la soja por *C. kikuchii* se encuentran entre 20 y 30°C cuando la cantidad de horas de mojado foliar se encuentra entre 8 y 24 h (Martin y Walters, 1982; Walters, 1980; Boyette, 1985). Los conidios de *C. kikuchii* germinan y las hifas penetran a través de los estomas sin formar apresorios o en forma directa, ya que también se ha observado penetración directa de la cutícula después de la formación de apresorios (Fujita, 1990). Se ha reportado la infección de vainas jóvenes y cubiertas seminales (Roy, 1976; Chen, 1979a; Fujita, 1990; Velicheti, 1994), pero se desconoce acerca de la infección de las flores (Kilpatrick, 1956; Roy, 1976). Debido a que los síntomas se manifiestan hacia el final del ciclo del cultivo, el TH/MPS se considera una enfermedad monocíclica (Carmona et al., 2015; Ward et al., 2015). Sin embargo, es probable que ocurran algunos pocos ciclos de infecciones secundarias hacia el final de la estación de crecimiento del mismo cultivo de soja (enfermedad oligocíclica). Una vez cosechado el cultivo, el patógeno permanece sobreviviendo sobre rastrojos infestados, en semillas infectadas y en hospedantes secundarios u alternativos previamente infectados o infectados a partir de patógenos de cultivos de soja, reiniciándose el ciclo primario de la enfermedad (Figura 4).

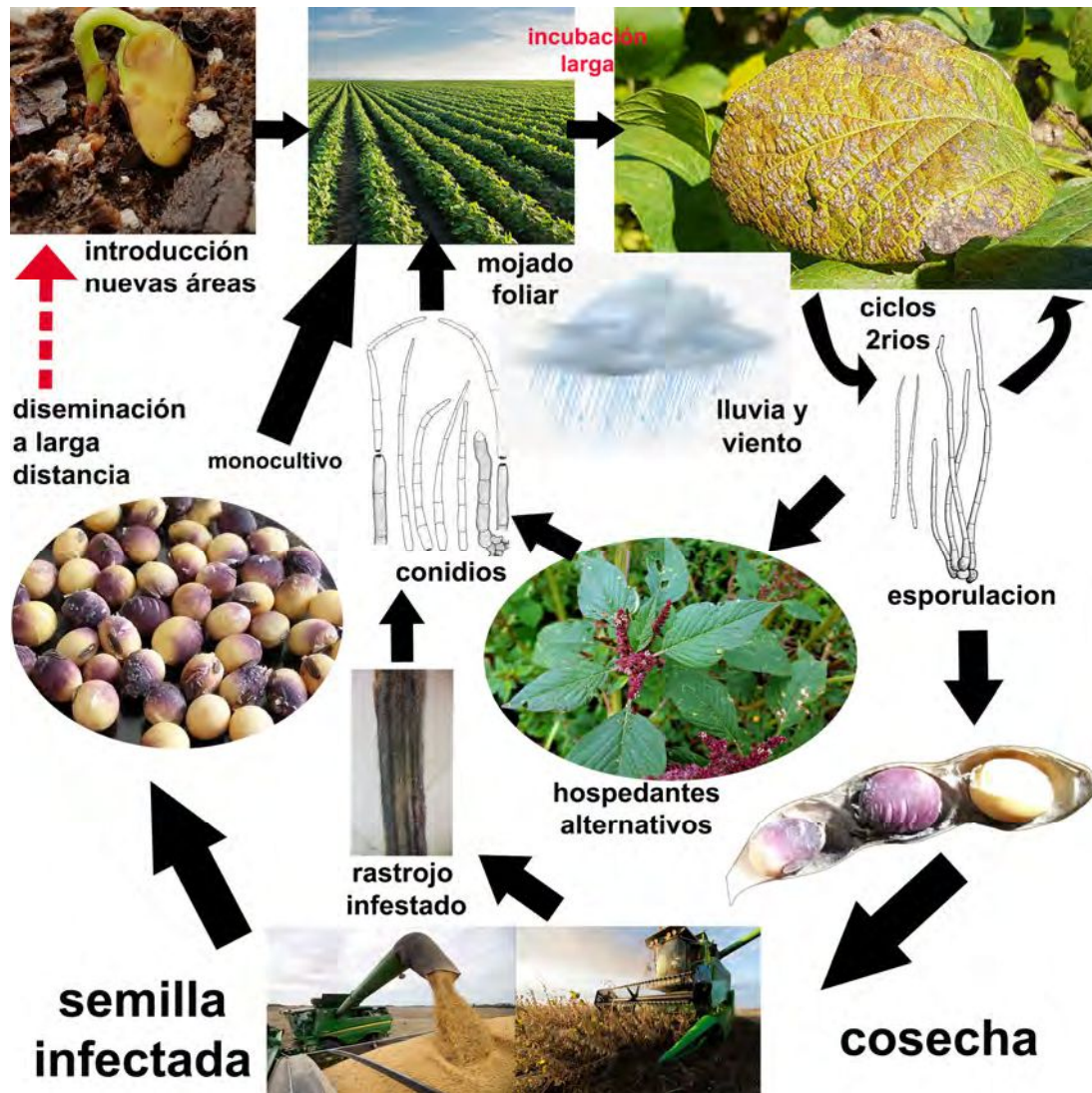


Figura 4. Ciclo del tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla de la soja causado por *C. kikuchii*. El TH/MPS es una típica enfermedad de fin de ciclo, oligocíclica, que en términos prácticos se la considera monocíclica (Autores: Sautua F, Scandiani M y Carmona M).

El TH/MPS es causado por *C. kikuchii*, un hongo que, al igual que otras EFC, posee un prolongado período de incubación y latencia. Esta es la causa por la cual los síntomas foliares se manifiestan en estadios reproductivos avanzados del cultivo de soja, a partir de R5-R6. Uno de los primeros investigadores en notar esta característica fueron Orth y Schuh (1992), al observar que el patógeno comienza con la penetración de las células epidérmicas seguida de la colonización de las células circundantes, y que luego las hifas infectantes latentes reanudaron el crecimiento seguido de la caída de las hojas y la senescencia y muerte del tejido del hospedante. Estos hallazgos sugirieron que las plantas de soja se infectan en las primeras etapas de crecimiento, pero la expresión de los síntomas se desencadena durante las últimas etapas de crecimiento reproductivo. Una planta de soja puede no

manifestar síntomas durante 90 o más días después de haber sido infectada. Investigaciones en EE. UU. han detectado mediante PCR real time (qPCR) la presencia del patógeno en hojas asintomáticas de soja en el estadio vegetativo V4, a solo 22 días después de la siembra (Chanda et al., 2014). *Cercospora* está casi siempre presente en las hojas, pero en forma asintomática. La biomasa del patógeno aumenta bruscamente durante el crecimiento reproductivo del cultivo, luego de la floración, cuando generalmente aparecen los síntomas típicos de la enfermedad (Chanda et al. 2014). Orth y Schuh (1992) observaron infecciones latentes de *C. kikuchii* resultantes de la penetración activa de la pared celular de células epidérmicas de plantas de soja, seguido por la posterior colonización de pocas células durante los estados fenológicos V2-R4. Estos autores basaron sus conclusiones en un procedimiento en el que usaron hojas asintomáticas desecadas durante 48 horas o sumergidas en una solución del herbicida paraquat al 11,64%. Luego, las hifas infectantes latentes reanudaron el crecimiento y la esporulación durante la fase de senescencia (R7) del cultivo. Pero no se observaron síntomas discernibles antes de R5. Complementarios a estos datos, experimentos de captura de esporas durante el cultivo de soja revelaron dos picos en la concentración aérea de esporas, uno al comienzo de la estación de crecimiento del cultivo y la otra al comienzo del llenado de los granos (R5). El segundo pico de esporulación, en ausencia de síntomas visibles o residuos de cultivos de la temporada anterior, correspondió a infecciones latentes en las hojas (Kudo et al., 2011; Ward et al., 2015). Actualmente, Galagedara et al. (2020) están desarrollando un protocolo de qPCR basado en sondas TaqMan para detectar, diferenciar y cuantificar *Cercospora* spp. asociadas con el TH a partir de muestras de conidios dispersados por el viento, recolectadas a través de muestreadores pasivos ubicados en el campo.

3. Relación hospedante-patógeno: factores de patogenicidad/virulencia y resistencia

El género *Cercospora* es conocido por su fotobiología, ya que muchas especies de *Cercospora* producen la fitotoxina **cercosporina**, de naturaleza fotoactiva y fotosensibilizante (Yamazaki et al., 1975; Daub 1982, 1987; Daub y Hangarter, 1983; Daub y Ehrenshaft, 2000). Esta toxina es una perilenquinona caracterizada por un cromóforo conjugado pentacíclico central que da lugar a su fotoactividad (Figura 5) (Daub y Ehrenshaft, 2000; Daub y Chung, 2009). Cuando se expone a la luz ambiental, la cercosporina es un potente productor de especies reactivas de oxígeno en presencia de oxígeno (Daub y Hangarter, 1983), con una eficiencia cuántica de formación de oxígeno singlete (1O_2) >80% (Dobrowolski y Foote, 1983). Esta pequeña molécula es lipofílica o liposoluble (sólo posee solubilidad limitada en agua) y puede penetrar fácilmente las hojas de las plantas, lo que provoca un daño celular no selectivo a los pocos minutos de la exposición (Daub, 1982). De hecho, la cercosporina es casi universalmente tóxica para una amplia gama de organismos, incluidas bacterias, mamíferos, plantas y la mayoría de las especies de hongos, con la excepción clave de los hongos productores de cercosporina, que exhiben resistencia a esta molécula. Se conocen al menos 23 especies de *Cercospora* spp., incluyendo *C. kikuchii*, que producen esta toxina (Assante et al., 1977; Goodwin et al., 2001). La

cercosporina es una fitotoxina que posee una toxicidad casi universal (no específica) y juega un papel significativo en el parasitismo de sus hospedantes (Callahan et al., 1999; Daub y Ehrenshaft, 2000; Shim y Dunkle, 2002; Daub et al., 2005). Su importancia como factor de patogenicidad en *C. kikuchii* es crucial y quedó demostrada por Upchurch et al. (1991a,b), al identificar cepas mutantes de *C. kikuchii* alteradas en su capacidad de síntesis de cercosporina, que fueron incapaces de provocar lesiones necróticas cuando fueron inoculados en plantas de soja. Asimismo, Velicheti et al. (1994) encontraron una correlación positiva de hasta el 96% entre la intensidad de la MPS y la cantidad de cercosporina cada 100 µg de cubierta seminal o tegumento, *in situ*. Recientemente, se han logrado desarrollar por un lado plantas de tabaco transgénicas con incorporación de genes aislados de *Cercospora nicotianae* y que proveen autoresistencia a cercosporina, y por otro lado plantas transformadas que pueden provocar el silenciamiento génico de enzimas de la ruta biosintética de cercosporina, que confirieron resistencia a la enfermedad (Thomas et al., 2020). Estos estudios confirman la importancia que tiene esta fitotoxina como factor de patogenicidad y virulencia para especies fitopatógenas de *Cercospora*.

La cercosporina es un pigmento púrpura-rojizo (tiene un color rojo sangre llamativo) que fue aislado por primera vez al ser extraído a partir de micelios secos de *C. kikuchii* en la década de 1950 (Kuyama y Tamura, 1957); y su estructura y propiedades químicas se caracterizaron entre principios de los años 1960 y 1970 (Kuyama, 1962; Lousberg et al., 1971; Yamazaki y Ogawa, 1972; Yamazaki et al., 1975). Esta molécula fue químicamente identificada como una quinona de perileno (perilenquinona) de origen policétido, es decir, producto del metabolismo secundario, de peso molecular (masa molar relativa) equivalente a 534 (Figura 5) (Lousberg et al., 1971; Yamazaki y Ogawa, 1972; Ebert et al., 2019). La cercosporina es estrictamente dependiente de la luz con respecto tanto a su producción como a su modo de acción. La biosíntesis de cercosporina es inducida por la luz, y la molécula misma de cercosporina es fotoactivada por luz de longitud de onda azul (Daub y Hangarter, 1983). Por lo tanto, la luz es el factor más crítico no sólo en cuanto a la toxicidad, sino también para la producción de la toxina (Ehrenshaft y Upchurch, 1991), ya que, en ambos casos, las longitudes de onda de luz visible (aproximadamente 400 a 600 nm) que son absorbidas por la molécula de cercosporina son responsables tanto de la inducción de la producción como de causar toxicidad. La producción de cercosporina se suprime completamente bajo oscuridad, y una breve exposición a la luz desencadena inmediatamente su biosíntesis (Rollins et al., 1993). Otros parámetros fisiológicos tales como la temperatura, las condiciones nutricionales, el pH, la fuente de carbono o nitrógeno y la relación carbono:nitrógeno, afectan la producción cercosporina (Daub y Ehrenshaft, 2000; You et al., 2008). Por ejemplo, la producción se inhibe a altas temperaturas (30°C), se sintetiza sólo en cultivos que favorecen solo el crecimiento vegetativo, y se reprime bajo condiciones nutricionales que inducen la formación de conidios, tales como el crecimiento en un medio V8. Los medios de cultivo como el agar papa glucosa (APG) reducen drásticamente la producción de cercosporina bajo luz. Además, la producción de

cercosporina en un cultivo *in vitro* es muy variable entre las especies e incluso entre cepas de la misma especie.

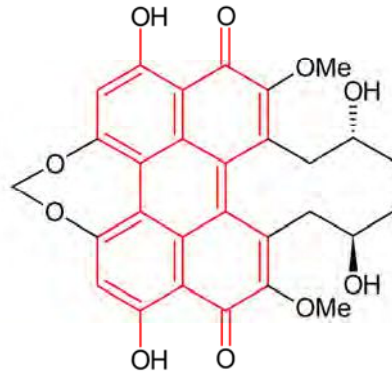


Figura 5. Molécula de cercosporina (Mulrooney et al., 2012; Ebert, 2018).

La molécula de cercosporina posee la propiedad de absorber la energía de la luz solar y convertirse en un estado triplete activado energéticamente, que puede reaccionar con el oxígeno y generar especies tóxicas de oxígeno reactivo (**ROS**, del inglés: *reactive oxygen species*). Es decir, cuando la cercosporina se activa por la absorción de energía solar, reacciona con las moléculas de oxígeno produciendo moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno, tóxicas para las células vegetales, como por ejemplo oxígeno singlete (un átomo de oxígeno en un estado excitado = $^1\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radicales libres de oxígeno tales como aniones superóxido o hiperóxido (O_2^-), grupo hidroxilo (HO^\cdot), etc. (Daub y Chung, 2007). Estos compuestos a su vez pueden causar la peroxidación lipídica (oxidación de los lípidos) de la membrana citoplasmática, resultando en su ruptura (lisis) y posterior muerte de las células hospedantes (Daub, 1982, 1987; Daub y Hangarter, 1983; Daub y Ehrenshaft, 2000). Daub y Chung (2007) hipotetizaron que el daño de la membrana permite la fuga de nutrientes hacia los espacios intercelulares de los tejidos foliares (Figura 6), lo que promueve el crecimiento y la propagación de las hifas fúngicas de *C. kikuchii* y su esporulación. Por lo tanto, la cercosporina se considera un factor de virulencia importante y se ha asociado con la formación de lesiones necróticas en las hojas de soja (Walters, 1980; Upchurch et al., 1991a).

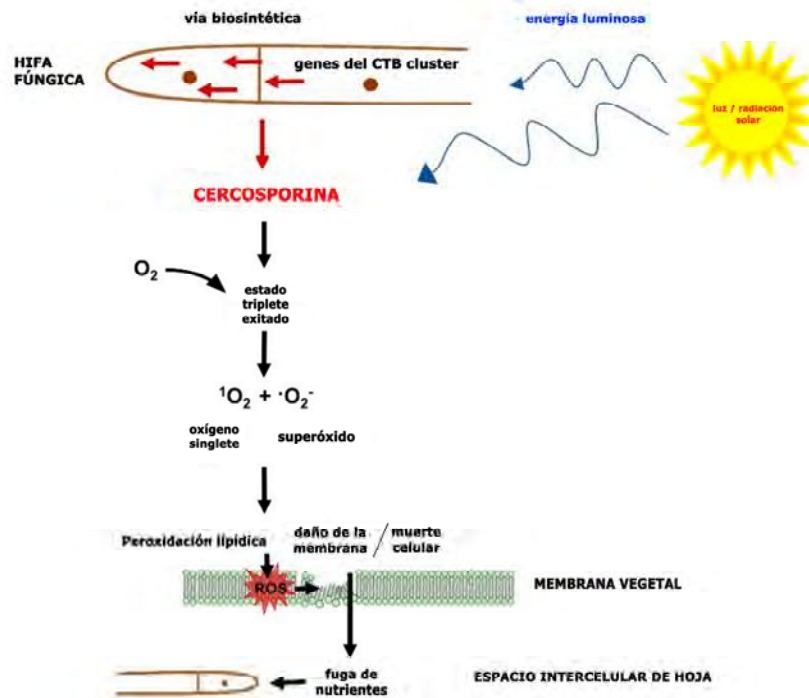


Figura 6. Esquema de acción (simplificado) de la cercosporina (Adaptado de Świdarska-Burek et al., 2020).

El modelo actual propuesto de autoresistencia a la cercosporina se basa en la capacidad de *Cercospora* spp. para mantener la cercosporina en un estado químicamente reducido dentro de las hifas, evitando la producción interna de ROS. Adicionalmente, de acuerdo con estudios preliminares de Costa de Novaes et al. (2020), la toxina podría “secuestrarse” específicamente dentro de gotitas de lípidos (LD, del inglés: *lipid droplets*) para prevenir la producción de ROS. Estos autores confirmaron la presencia uniforme de cercosporina en un estado químicamente reducido en el citoplasma y también en vesículas de hifas más delgadas. Otros mecanismos fueron sugeridos para la autoresistencia de *Cercospora* spp. a cercosporina. Entre estos se encuentra la síntesis de piridoxina (vitamina B6), ya que se evidenció que mutantes deficientes en su biosíntesis fueron sensibles y la piridoxina y sus vitámeros son inhibidores efectivos de ¹O₂ (Bilski et al., 2000). También, el gen CRG1, que codifica para un factor de transcripción que regula otros genes implicados en la detoxificación de compuestos nocivos, transportadores de membrana de múltiples fármacos y enzimas biosintéticas antioxidantes y policétidos, así como en ATPasas y ATP sintasas, es necesario para la autoresistencia, ya que mutantes *crg1* fueron sensibles a la cercosporina (Chung et al., 1999, 2003; Herrero et al., 2007). Otros estudios implicaron otras proteínas en la resistencia a cercosporina en *C. nicotianae*, incluyendo un transportadores de membrana ABC (ATR2) (Beseli et al., 2015a) y una proteína con dominio DUF1348 de la superfamilia similar a NTF2 con función desconocida (Beseli et al., 2015b).

Las plantas de soja poseen, a su vez, mecanismos de defensa complejos para contrarrestar los ataques de fitopatógenos. Por ejemplo, varios genes de defensa como PR3 (quitinasa 1), PR10 (proteína similar a la ribonucleasa) y PPO (polifenol oxidasa) se expresan significativamente tanto en hojas como semillas, durante un período de 48 h después de la inoculación/infección (Upchurch y Ramirez, 2010). Entre los múltiples mecanismos de defensa que posee la soja, otro ejemplo es la toxina de la soja (**SBTX**, del inglés: *soybean toxin*), que es una proteína antifúngica con una amplia actividad inhibidora contra el crecimiento y la filamentación de muchos hongos fitopatógenos (Vasconcelos et al., 2008). Recientemente, se demostró que SBTX inhibió *in vitro* el crecimiento micelial de *C. kikuchii* (Arantes et al., 2020). Adicionalmente, se verificó mediante RT-qPCR que los genes SBTX17 y SBTX27 (que codifican las cadenas polipeptídicas de 17 y 27 kDa) fueron sobreexpresados en hojas secundarias de plantas de soja de 35 días inoculadas con *C. kikuchii* o tratadas con ácido salicílico en comparación con los controles. Estos hallazgos sugieren fuertemente que SBTX tiene roles defensivos contra *C. kikuchii* (Arantes et al., 2020). Otro ejemplo lo constituyen las fitoalexinas, que son moléculas que tienen propiedades antimicrobianas y que son derivados de isoflavonoides, producto del metabolismo secundario, siendo el pterocarpan el esqueleto isoflavonoide más abundante, y que se sintetizan después de una infección o por efecto del daño mecánico (Dixon, 1999; Ringuelet et al., 2013). En soja se han descubierto varias fitoalexinas, como por ejemplo las **gliceolinas** I, II, III y IV (isómeros formados a partir del precursor común, glicinol), y el cumestrol (Boué et al., 2000). Se ha demostrado que la rápida acumulación de gliceolina durante la infección contribuye a la respuesta innata de defensa de la soja (Lygin et al., 2013). Asimismo, se ha demostrado una inhibición significativa del crecimiento *in vitro* en APG modificado con gliceolina de varios patógenos de soja, incluido *Cercospora sojina* (Lygin et al., 2010).

4. Manejo integrado del TH y la MPS

El TH/MPS es parte del complejo de EFC de la soja y, por lo tanto, el manejo integrado se realiza en conjunto, abordándolo como grupo o complejo de enfermedades con características comunes. Si bien la resistencia genética a enfermedades es la medida de manejo preferencial por excelencia, la resistencia a las EFC en las variedades de soja comercialmente disponibles, especialmente a TH/MPS, es escasa o nula. Además, las empresas semilleras de Argentina actualmente no poseen un programa de mejoramiento específico para incorporar resistencia a estos agentes causales (Federico Rizzo, com. pers.). De todas maneras, algunos estudios han detectado potenciales fuentes de resistencia a TH/MPS que podrían ser incorporadas a las variedades comerciales de soja (Alloatti et al., 2015a,b; Li et al., 2019; Ward et al., 2021).

En varios trabajos de investigación se han observado diversos grados de tolerancia al TH/MPS en diferentes cultivares de soja en lotes de producción. Sin embargo, no existe una fuerte correlación

entre la incidencia observada de estas enfermedades, las cuales son altamente dependientes de las condiciones climáticas favorables para su desarrollo epidemiológico (Orth y Schuh, 1994; Carmona et al., 2015b; Mehl et al., 2015) y las variedades sembradas. Orth y Schuh, 1994 evaluaron 17 cultivares de soja en invernáculo y a campo, sin encontrar correlación entre la predicción del comportamiento a campo según los resultados en invernadero. Tampoco encontraron correlación entre la incidencia de la MPS y el desarrollo foliar del TH. No hubo diferencias significativas en la susceptibilidad de los cultivares a infecciones latentes, detectadas tanto en el campo como en invernadero. Solamente el cultivar Resnick fue resistente a la infección foliar tanto en invernáculo como a campo. Kudo y Blum (2010) evaluaron 86 genotipos de soja convencional y 30 genotipos de soja convencional y genéticamente modificados (GM), en dos ensayos distintos respectivamente, en cuanto a su reacción al TH. Estos investigadores no detectaron diferencia en la intensidad de la enfermedad entre genotipos convencionales y GM. Sin embargo, la intensidad del TH en los experimentos fue baja (severidad de 0 a 1,5% e incidencia de 0 a 20%). En EE. UU. por ejemplo, en ensayos estandarizados de cultivares realizados en el año 2002, de los 62 cultivares evaluados 59 (95%) fueron susceptibles (Schneider et al., 2003), mientras que en 2005 los 285 cultivares evaluados fueron susceptibles (100%) (Schneider et al., 2005). Cai (2004) determinó que los cultivares AG5701 y TV59R85 fueron significativamente más resistentes que otros cultivares. Cai et al. (2009) evaluaron 11 variedades en condiciones de invernadero y a campo para la búsqueda de resistencia a TH/MPS, encontrando sólo 2 variedades, las anteriormente identificadas AG5701 y TV59R85, con un nivel de resistencia moderado. Sajeesh et al. (2014) evaluaron 55 variedades de soja, de las cuales la mayoría se comportaron como moderadamente susceptibles (46%) y susceptibles (25%). Los genotipos NRC 77, RAUS 5, SL 525 y JS 335 tuvieron una reacción resistente. Posteriormente, Alloatti et al. (2015) analizaron la incidencia de TH/MPS en 123 introducciones de plantas (PI, del inglés: *plant introductions*) de 28 países diferentes, de grupos de madurez III, IV y V, durante las cosechas 2007 y 2008, encontrando 4 y 10 IP resistentes en los grupos de madurez III y IV respectivamente, en total. Recientemente, Li et al. (2019) reportaron un estudio en el que evaluaron 42 genotipos de soja en 2010, 2011 y 2012. Diecisiete líneas tuvieron un porcentaje significativamente menor de infección de semillas por *Cercospora* spp. que los controles susceptibles y otros genotipos evaluados. Estos autores concluyeron que estos genotipos de soja se pueden usar en el desarrollo de cultivares o líneas de germoplasma con resistencia al TH/MPS y para el mapeo genético de los genes de resistencia. Pocos estudios se han realizado para identificar en genotipos resistentes al TH/MPS los correspondientes genes de resistencia. Por un lado, la resistencia raza-específica en la interacción *C. kikuchii* y soja es desconocida, lo que sugiere que la resistencia observada es cuantitativa (parcial). Por otro lado, solamente se han encontrado y estudiado en detalle dos variedades de soja resistentes, la PI 80837 (Wilcox et al., 1975) y SJ.2 (Srisombun y Supapornhem, 1993). Wilcox et al. (1975) investigaron la heredabilidad de la resistencia a la MPS en la variedad PI 80837 usando el cruzamiento “Amsoy” x PI 80837. Las heredabilidades fueron de 0,91 en la F2 y 0,51 en la F3, sugiriendo que la resistencia en PI 80837 se encuentra bajo un fuerte control genético. Otros estudios confirmaron que la

PI 80837 tiene un nivel alto de resistencia a la MPS (Roy y Abney, 1976; Ploper et al., 1992). En la variedad SJ.2 se determinó que la resistencia a la MPS está controlada por un único gen dominante (Srisombun y Supapornhemin, 1993). Por otro lado, Jackson et al. (2006, 2008) usando una población F2 derivada de un cruce entre los cultivares AGRIPRO 350 y PI 80837, y marcadores microsatélites o de repeticiones de simple secuencia (**SSRs**, del inglés: *simple sequence repeats*), mostraron que la resistencia al TH/MPS en PI 80837 fue controlada por un solo gen dominante, *Rpss1*, mapeado entre Sat_308 (6,6 cM) y Satt594 (11,6 cM) en la soja grupo de enlace molecular G. Asimismo, Alloatti et al. (2015b) identificaron una región cromosómica en la proximidad de Satt115 y Satt340 en el cromosoma 18, asociada con el gen de resistencia *Rpss1*. Estos resultados confirman la presencia de un gen de resistencia mayor, *Rpss1*, en PI 80837 y también indican un supuesto gen adicional para la resistencia a MPS. Se espera que en el futuro se avance en la identificación de genes de resistencia adicionales en el genoma de la soja, para luego ser incorporados en los programas de mejoramiento genético (Zaccaron et al., 2015; Alloatti et al., 2015b). Recientemente, Ward et al. (2021) han evaluado 568 líneas de accesión de soja en el sur de E.E. U.U., representando los grupos de madurez III a VII. Estos investigadores evaluaron la presencia y severidad de infecciones naturales de TH durante 2016 y 2017 en base a múltiples escalas de evaluación. Los investigadores lograron identificar 50 accesiones que mostraron resistencia constante a la enfermedad. A partir de estos resultados, en Louisiana, EE. UU., actualmente se están desarrollando variedades de soja con resistencia específica a TH en líneas públicas y comerciales (Price P.P. III, pers. com.).

Por lo tanto, las principales estrategias para el manejo de las EFC incluyen el uso de semilla de buena sanidad (incidencia no mayor al 5%), el tratamiento de semillas con fungicidas (si es necesario, de acuerdo con el análisis sanitario de la semilla) y productos biológicos o biofungicidas, rotación de cultivos, manejo nutricional, prácticas culturales (siembras tempranas, uso de variedades de ciclo corto, etc.) y eventualmente la aplicación de fungicidas foliares (Hartman, 2007; Carmona, 2014; Carmona et al., 2015b). Los patógenos agentes causales de EFC sobreviven en semilla y rastrojo, por lo tanto, el manejo sanitario de la semilla y la rotación de cultivos son las medidas preferenciales de control ante la ausencia de variedades resistentes. La semilla es el vehículo a través del cual ingresan los patógenos causantes de las EFC en países y lotes donde nunca antes se había cultivado soja (Figura 4)(Agarwal et al., 2006). El análisis sanitario de las semillas es una medida importante que permite definir el destino final de la partida y determinar el tratamiento adecuado con fungicidas (ingrediente activo y dosis a ser aplicados). La rotación de cultivos permite la descomposición de los restos culturales infestados por patógenos necrotróficos, permitiendo la eliminación de inóculo remanente en el rastrojo por inanición (Reis et al., 2011; Zhang, 2012). Cabe destacar que, bajo monocultivo, el tratamiento de semillas no será relevante ya que, en este caso, la principal fuente de inóculo serán los rastrojos infestados que anularán el efecto de los fungicidas aplicados a las semillas. Por lo tanto, la rotación complementa necesariamente el manejo sanitario de la semilla, evitando el establecimiento de los hongos necrotróficos en los lotes de

producción. Estas dos medidas de manejo son consideradas imprescindibles cuando se realiza el cultivo de soja por primera vez y cuando se decide utilizar la SD. Durante los últimos años, muchos lotes se han manejado con un esquema de SD bajo monocultivo de soja lo que, en consecuencia, ha causado el aumento de la intensidad de las EFC. De acuerdo con la problemática descrita, durante las últimas campañas agrícolas se ha observado en el campo un aumento en el número de cultivares de soja susceptibles a TH/MPS, tanto en EE. UU. como en Sudamérica (Argentina, Brasil, Bolivia, Paraguay, etc.) (Almeida et al., 2005; Carmona et al., 2015a,b, 2017a; Li et al., 2016, 2019; Sautua et al., 2019a; de Mello et al., 2021a).

Actualmente, debido a que todos los cultivares de soja comercialmente disponibles en Argentina son susceptibles al TH/MPS, cuando la SD no se realiza bajo un esquema de rotaciones que garantice la descomposición de los rastrojos de soja infestados con *C. kikuchii*, la aplicación de fungicidas es una de las pocas prácticas disponibles para el manejo de esta enfermedad en condiciones de campo. Esto ha provocado un aumento de la necesidad de control químico y el uso de fungicidas, lo que la ha convertido en una práctica de mayor difusión en el país. Bajo esta situación, la sustentabilidad económica y ecológica solamente podría ser alcanzada si la aplicación de fungicidas para el control de una enfermedad específica es orientada con fundamentos científicos, económicos y ecológicos sustentables (Carmona et al., 2015b). En Argentina, los fungicidas se han comenzado a utilizar para el manejo de enfermedades de soja desde 2002, pero su uso se expandió significativamente a partir de 2004 por el advenimiento de la RAS detectada en Argentina en 2003 (Rossi, 2003). Luego, desde 2009 ocurrió otro pico de máxima expansión de uso por la aparición de la mancha ojo de rana (MOR) afectando gran parte de la superficie sojera (Carmona et al., 2009). Actualmente, las estimaciones indican que aproximadamente la mitad del área sembrada con soja anualmente en Argentina (en promedio durante las últimas 11 campañas agrícolas equivalente a 18 millones de hectáreas) se trata con fungicidas una vez por temporada de cultivo (MINAGRI, 2020). Desde hace varias campañas agrícolas, se utilizan en el cultivo de soja fungicidas mezclas de los siguientes ingredientes activos (i.a.): inhibidores de la quinona externa (**QoIs**, del inglés: *quinone outside inhibitor fungicides*), inhibidores de la desmetilación (**DMIs**, del inglés: *demethylation inhibitor fungicides*) e inhibidores de la succinato deshidrogenasa (**SDHIs**, del inglés: *succinate dehydrogenase inhibitor fungicides*). Históricamente, los inhibidores de la β -tubulina (**MBC**, del inglés: *methyl benzimidazole carbamates*) se han utilizado como i.a. único, es decir, sin estar en mezcla con otros i.a. fungicidas.

El primer paso para desarrollar una estrategia de manejo antiresistencia a fungicidas consiste en determinar la sensibilidad de una población de patógenos a un i.a. fungicida específico (Brent y Hollomon, 2007). En Argentina no existen estudios previos sobre la sensibilidad a fungicidas de aislados de *Cercospora* que causan TH/MPS. En EE. UU. se ha estudiado esta problemática para este patosistema, donde Price et al. (2015) informaron la detección de resistencia a fungicidas QoI y MBC en aislados de *Cercospora* spp del estado de Louisiana. Estos investigadores informaron que los

fungicidas QoI comenzaron a usarse en Louisiana en el año 2000 y las fallas de control del TH comenzaron a registrarse desde 2005, hasta que en 2012 se generalizaron. Posteriormente, Albu et al. (2016a) informaron que la mutación G143A en el gen del citocromo b en aislados de *Cercospora* cf. *flagellaris* fue la causa de la resistencia a fungicidas QoI en Luisiana. Recientemente, Mello et al. (2021) informaron la detección de resistencia a fungicidas QoI y MBC en varios estados de Brasil. En forma similar, en Argentina han comenzado a observarse fallas de control del TH en muchos campos de soja en todo el país desde aproximadamente seis años. En estas parcelas de campo, la intensidad del TH se mantuvo alta incluso después de ser tratadas con fungicidas MBC o mezclas QoI + DMI o QoI + DMI + SDHI. Estas observaciones motivaron el presente estudio desarrollado a lo largo de esta tesis.

5. Objetivos e hipótesis de la tesis

5.1. Objetivo general

Generar información sobre la identidad filogenética y el nivel actual de sensibilidad a fungicidas de las poblaciones de especies de *Cercospora* causantes de Tizón de la Hoja y Mancha Púrpura de la Semilla, provenientes de diferentes regiones de la Argentina.

5.2. Objetivos específicos:

- (1) Recolectar muestras de hojas y semillas de soja que presenten síntomas de tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla, respectivamente, a partir de diferentes regiones de Argentina, y aislar patógenos cercosporoides.
- (2) Determinar la identidad de los aislados mediante métodos morfológicos tradicionales.
- (3) Determinar la identidad de los aislados utilizando un enfoque filogenético multilocus.
- (4) Determinar el comportamiento (sensibilidad o resistencia fenotípica) de los aislados de *Cercospora* a fungicidas con diferente modo o mecanismo bioquímico de acción.
- (5) Identificar las mutaciones asociadas con la resistencia de campo.

5.3 Hipótesis

- 1) Los diferentes aislados de *Cercospora* spp. causantes de tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla recolectados en Argentina no presentan diferencias filogenéticas moleculares. Tanto los aislados de *Cercospora* spp. provenientes de hoja, causantes de tizón de la hoja, como los provenientes de semilla, causantes de la mancha púrpura de la semilla, no presentan diferencias filogenéticas moleculares.
- 2) El tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla está causado en Argentina solamente por la especie *C. kikuchii*.
- 3) La sensibilidad *in vitro* de los diferentes aislados de *Cercospora* a los diferentes fungicidas es variable en función de la procedencia geográfica de las cepas.
- 4) La sensibilidad *in vitro* de los diferentes aislados a los diferentes fungicidas es variable en función de la especie de *Cercospora* spp.
- 5) Todos los aislados evaluados son sensibles a los diferentes ingredientes activos fungicidas.
- 6) Siempre que hay resistencia a un ingrediente activo fungicida, la resistencia está asociada a una mutación no sinónima en una posición puntual de un gen en particular.

6. Diagrama de tesis

Para una mejor presentación, lectura y comprensión de los temas a abordar, esta tesis se dividió en cuatro capítulos.

En el actual capítulo 1 se presentó el patosistema bajo estudio y la problemática general, así como los antecedentes mundiales y de Argentina. Se plantearon el objetivo general y los objetivos específicos y se enunciaron las hipótesis. En el Anexo I se detallan los trabajos publicados derivados de esta tesis.

El capítulo 2 comprende la recolección de aislados para el presente estudio, su caracterización morfológica e identificación de las especies de *Cercospora* spp. mediante análisis filogenético.

El capítulo 3 comprende la evaluación de la sensibilidad de una muestra de aislados a diferentes fungicidas.

Los objetivos específicos 1, 2 y 3 fueron desarrollados en el capítulo 2 y los objetivos 4 y 5 en el capítulo 3.

En el capítulo 4 se desarrolla la discusión general, las conclusiones, los aportes significativos de esta tesis y las consideraciones finales.

Hacia el final se adicionan anexos con la descripción completa del total de aislados recolectados y el anexo estadístico.

CAPÍTULO 2

Aislamiento, caracterización morfológica y filogenética de cepas de *Cercospora* spp. causantes de tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla de soja en Argentina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Caracterización morfológica de *Cercospora kikuchii*

El género *Cercospora* (del latín cerc- + -spora, “esporas largas”, esporas multiseptadas largas y delgadas), fue establecido por Fuckel en 1863 y a continuación en el mismo año Fresenius publicó una descripción del mismo, pero sin una clara definición del género (Braun y Crous, 2016). Más tarde, Saccardo (1876) definió a *Cercospora* por tener conidióforos marrones y conidios marrones, oliváceos o, en ocasiones, subhialinos y vermiformes. A principios del siglo XX, Spegazzini (1910) fue el primero en dividir el género y distinguir el género *Cercosporina*, en el que colocó especies con conidios hialinos, incluida *C. apii*. Posteriormente, el primer estudio monográfico completo del género *Cercospora* fue publicado por Chupp (1954). Este investigador consideró que las especies de *Cercospora* eran específicas del hospedante infectado, y utilizó este argumento para formular el concepto de que cada género o familia de plantas hospedantes tendría su propia especie de *Cercospora*. Adicionalmente, los conceptos de especie y la taxonomía se basaron en caracteres morfológicos, como el engrosamiento de hila y la pigmentación de conidios sencillos o encadenados. En 2003, Crous y Braun llevaron a cabo una importante revisión morfológica de 5720 nombres de este grupo. Las más de 3000 especies publicadas en el género *Cercospora* y 550 en *Passalora* se redujeron a 940, de las cuales 281 se colocaron en el complejo *C. apii* como morfológicamente indistinguibles. Consideraron a *Cercospora*, *Passalora*, *Pseudocercospora* y *Stenella* como verdaderos géneros. Los géneros individuales se distinguieron en función de una combinación de dos rasgos, es decir, la estructura de las cicatrices de conidios e hila y la presencia o ausencia de coloración de conidióforos y conidios (Crous y Braun, 2003).

Las especies de *Cercospora* se caracterizan por presentar conidios hialinos a subhialinos, aciculados, cilíndrico-filiformes, multiseptados; loci conidiógenas e hila conidiales conspicuamente engrosados y oscurecidos; y conidióforos fasciculados y pigmentados (Figura 7) (Crous et al., 2000). Las especies caracterizadas por conidióforos pigmentados, loci conidiógenos espesados y oscurecidos y conidios incoloros formados individualmente se identifican como *Cercospora sensu stricto* (Ellis, 1971, 1976; Jayawardena et al., 2020).

El crecimiento de las especies del género *Cercospora* causantes de TH/MPS en medios artificiales es uniformemente denso, con pliegues profundos que irradian desde el centro. Las colonias son de color blanco en los bordes y oliva grisáceo hacia los centros (Schuh, 1999). El color del medio por debajo de la colonia varía, pero a menudo es de color púrpura oscuro a rojo (Schuh, 1999; Murakishi, 1951; Roy, 1982). Las hifas jóvenes en medios de cultivo son hialinas, septadas, con un espesor promedio de 2 a 4 μm ; mientras que las hifas de mayor edad son de color marrón pálido, con un espesor promedio de 3 a 5 μm , y estrechamente septadas (Schuh, 1999). Las especies del género *Cercospora* que causan enfermedades diferentes pueden diferenciarse hasta cierto punto mediante algunas características morfológicas. Estas son: conidióforos (ej. uniforme, irregular, atenuados, truncados, largo o corto, obconical truncado), las células conidiógenas (terminales, intercaladas), loci (apical, lateral, etc., alrededor de la célula conidiógenas); uni-local (locus único, terminal), multilocal (múltiples loci); espesor (ausencia de loci protuberante) y conidios (dimensiones, forma, morfología del hilum) (Chupp, 1954; Schuh, 1999). Sin embargo, no es posible distinguir entre ciertas especies dentro del género *Cercospora* solamente mediante caracteres morfológicos (Groenewald et al., 2013; Bakhshi et al., 2015a,b).

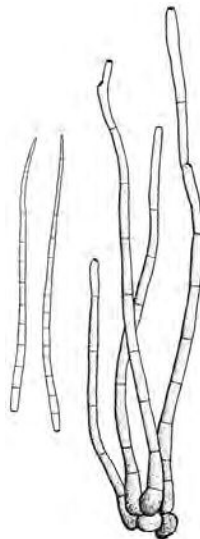


Figura 7. Representación de conidios (izquierda) y conidióforos (derecha) de *C. kikuchii* (Hsieh y Goh, 1990).

La especie *C. kikuchii* esporula en tejidos vegetales infectados bajo condiciones de alta humedad relativa y temperaturas entre 25 y 30°C, en estados reproductivos avanzados del cultivo de soja (Kudo et al., 2011; Chanda et al., 2014). Sin embargo, Murakishi (1951) observó que *C. kikuchii* crece lentamente y esporula escasamente o no esporula en la mayoría de los medios de cultivo universales como el APG. Este investigador probó 15 tipos diferentes de medios de cultivos, pero no observó esporulación en los aislados evaluados. Otros autores han observado una mayor esporulación *in vitro* en

medios que contenían agar con decocción de hojas de zanahoria (**CLDA**, del inglés: *carrot leaf-decoction agar*) o agar con jugo de vegetales V8 (V8) (Kilpatrick, 1956; Laviolette et al., 1972). Posteriormente, El-Gholl et al., (1982) probaron diferentes medios de cultivo para evaluar la intensidad de esporulación de *C. kikuchii*, incluyendo APG, V8, agar con decocción de hojas de soja (**SLDA**, del inglés: *soybean leaf decoction agar*) y agar con decocción de bayas de *Lagerstroemia* (**CMA**, del inglés: *crape myrtle agar*). Estos investigadores determinaron la cantidad de conidios por caja de Petri, y detectaron que *C. kikuchii* raramente esporuló en APG, pero si esporuló, aunque nunca abundantemente, en todos los otros medios de cultivo, en cajas de Petri de vidrio o de plástico. De todos los medios evaluados, *C. kikuchii* esporuló más en V8. Notaron que, para el aislado utilizado, hubo variabilidad en la cantidad de esporulación entre diferentes repeticiones de un determinado medio de cultivo. Asimismo, detectaron que aislados de 15 meses de antigüedad esporularon significativamente menos que aislados de 10 meses de antigüedad. Yeh y Sinclair (1980) concluyeron que el medio agar con polvo de rastrojo de soja, CLDA o V8 fueron los medios que más propiciaron la esporulación. Por lo tanto, todas estas investigaciones concluyeron que para que se produzca la esporulación *in vitro* de *C. kikuchii* en medios artificiales, la adición de caldo de hojas verdes de soja, zanahoria, V8 o polvo de rastrojo de soja y la incubación bajo alternancia de fotoperíodos de luz/oscuridad son requisitos esenciales (Kilpatrick, 1956; Chen, 1979b; El-Gholl et al., 1982; Vathakos y Walters, 1979; Yeh y Sinclair, 1980).

La luz también influye en el desarrollo morfológico de muchas especies de *Cercospora*. Por ejemplo, la exposición a la luz continua reprime fuertemente la formación de conidios de *Cercospora zea-maydis* (Bluhm et al., 2008). De manera similar, bajo oscuridad continua la esporulación de *C. kikuchii* fue escasa, mientras que la producción de conidios fue máxima bajo ciclos alternativos de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad (Yeh y Sinclair, 1980). Bluhm et al. (2010) identificaron un ritmo biológico que gobierna la melanización de hifas de *C. kikuchii*. Estos autores, basándose en la periodicidad de este fenómeno, la insensibilidad a los cambios de temperatura y la persistencia en ausencia de estímulos ambientales, concluyen que el ritmo es circadiano. Este es el primer estudio que documenta la existencia de un reloj circadiano subyacente a la melanización de hifas vegetativas en *C. kikuchii*. Los esfuerzos actuales se centran en la identificación y caracterización de genes que comprenden el reloj circadiano en especies de *Cercospora*.

1.2. Caracterización taxonómica de *Cercospora kikuchii*

La ubicación taxonómica actual del género *Cercospora* dentro del Reino Fungi y del phylum Ascomycota se observa en las Figuras 8 y 9. El género *Cercospora* incluye muchas e importantes especies de hongos fitopatógenos y es uno de los más grandes dentro de la clase Dothideomycetes. Dentro de esta clase, *Cercospora* spp. se considera dentro del subgrupo de los Hyphomycetes o Dothideomycetes anamórficos (antiguamente ubicados dentro del ex filo formal Deuteromycota). Cabe

aclarar que los hongos imperfectos (fungi imperfecti), antiguamente llamados deuteromicetos (Deuteromycetes) o deuteromicotas (Deuteromycota), comprenden más de 15.000 especies diferentes que se agrupan juntas porque no se les conoce la fase de reproducción sexual).

- Eukaryota (SuperReino)
 - › Opisthokonta
 - › **Fungi (Reino)**
 - › Dikarya (Subreino)
 - › **Ascomycota (Phylum)**
 - › saccharomyceta
 - › **Pezizomycotina (Subphylum)**
 - › leotiomyceta
 - › dothideomyceta
 - › **Dothideomycetes (Clase)**
 - › Dothideomycetidae (Subclase)
 - › **Capnodiales (Orden)**
 - › **Mycosphaerellaceae (Familia)**
 - › **Cercospora (Género)**
 - kikuchii (especie)**

Figura 8. Ubicación taxonómica del género *Cercospora* dentro del reino Fungi (Agris, 2005).

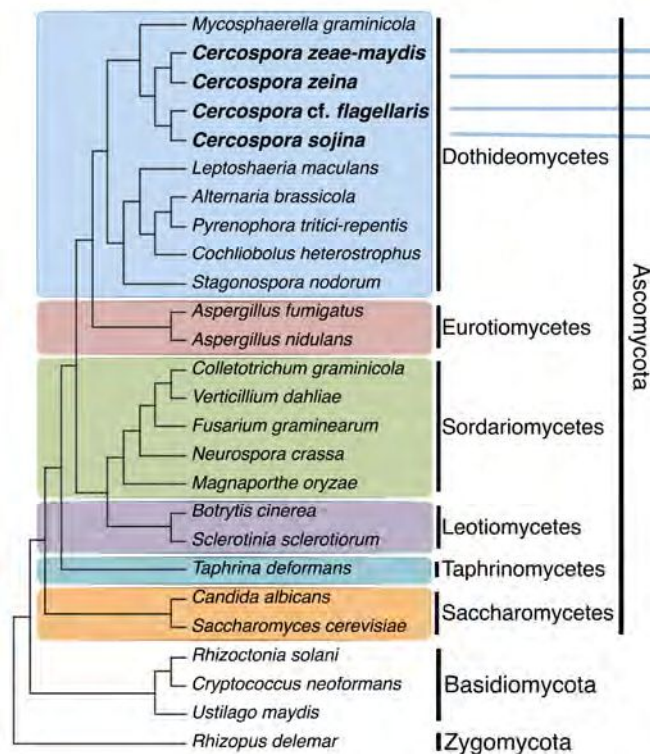


Figura 9. Relación filogenética entre la clase Dothideomycetes con otras clases y phylum dentro del reino Fungi. En el ejemplo se muestra la especie *C. cf. flagellaris*, uno de los agentes causales del TH/MPS (Zaccaron et al., 2015).

Las especies de *Cercospora* fueron tradicionalmente nombradas de acuerdo con el hospedante del cual eran aisladas, a tal punto que cada vez que se aislaba una cepa por primera vez de un nuevo hospedante, se consideraba una nueva especie. Sin embargo, muy frecuentemente existe un solapamiento significativo de las características morfológicas entre especies, lo que complica la taxonomía de este género. De acuerdo con Crous y Braun (2003), muchas especies morfológicamente indistinguibles, genéticamente uniformes o heterogéneas, poseen diferentes grados de especialización biológica, formando diferentes razas según el rango de hospedantes que pueden infectar. Para este grupo de especies propusieron el término “especies compuestas” (del inglés: *compound species*), significando un grupo de especies estrechamente relacionadas que son muy similares morfológicamente a tal punto que los límites entre ellas son a menudo poco claros. También se usan como sinónimos, pero con significados más precisos: “especies crípticas” (del inglés: *cryptic species*) para dos o más especies ocultas bajo un mismo nombre de la especie; “especies hermanas” (del inglés: *sibling species*) para denominar dos especies crípticas que son los parientes más cercanos uno del otro; y las “especies rebaño” (del inglés: *species flock*) para un grupo de especies estrechamente emparentadas que viven en el mismo hábitat. Estos autores también propusieron que cuando las taxas son claramente distinguibles en forma morfológica y genética deberían ser tratadas como especies separadas. Debido a que la especiación no siempre se acompaña de cambios morfológicos, el verdadero número de especies biológicas es probable que sea superior a la cifra actual descripta de especies nominales, la mayoría de las cuales están delineadas por motivos puramente morfológicos (Bickford et al., 2006).

1.3. Reproducción sexual de *Cercospora kikuchii*

Actualmente, *Cercospora* es considerado un género holomórfico (hongo completo, incluyendo todas las formas anamorfos y teleomorfos). Sin embargo, para la mayoría de las especies de este género el estado sexual no se conoce, o ha sido reportado, pero no confirmado (Goodwin et al., 2001). Solamente algunas especies tienen la capacidad de formar estructuras teleomórficas similares a las del género *Mycosphaerella*. Se sabe muy poco sobre la ocurrencia o importancia de la reproducción sexual en especies aparentemente asexuales del género *Cercospora*.

En ascomycetes, el locus *MAT* define el tipo sexual (del inglés, *mating type*). Es decir, es un mecanismo molecular que regula la compatibilidad en ascomycetes que se reproducen sexualmente (Conde-Ferrández, 2007). Para la mayoría de las especies de ascomycetes heterotálicas estudiadas hasta el momento, sólo un locus de tipo de apareamiento (*MAT1*), con dos alelos alternativos, está presente. Las diferentes variantes que puede tener el locus *MAT* se llaman idiomorfos, en lugar de alelos, debido a que no muestran homología entre cepas de tipo de apareamiento opuesto que pertenecen a la misma especie (Metzenberg y Glass, 1990). La reproducción sexual en hongos generalmente ocurre entre dos

individuos o aislados de tipo de apareamiento opuesto, donde cada uno alberga un conjunto diferente de genes de tipo de apareamiento (*MAT*) (heterotalismo); o dentro de un solo aislado que posee todos los genes *MAT* necesarios (homotalismo primario) (Wilson et al., 2021). En los hongos ascomycetes, estos genes *MAT* se clasifican como del tipo *MAT1-1* o *MAT1-2*, los cuales confieren las identidades de apareamiento *MAT1-1* y *MAT1-2*, respectivamente. Los dos genes *MAT* primarios, *MAT1-1-1* y *MAT1-2-1*, codifican proteínas altamente conservadas que están presentes en la mayoría de los Dikarya. La proteína *MAT1-1-1* alberga el dominio alfa, mientras que la proteína *MAT1-2-1* tiene un dominio de caja HMG. Se sabe que ambos dominios conservados se unen al ADN. La función específica de las proteínas de “tipo de apareamiento” codificadas por el gen *MAT* aún no ha sido identificada, pero lo más probable es que sean factores de transcripción que controlan vías metabólicas de especiación celular y morfogénesis sexual (Turgeon, 1998). Se cree que estos factores de transcripción controlan la expresión de varios cientos de genes relacionados con el sexo, a menudo de forma dependiente de *MAT*. Los ascomycetes heterotálicos producen gametos que presentan un único idiomorfo *MAT* y la singamia sólo es posible entre los gametos que llevan tipos de apareamiento complementarios. Por otro lado, los ascomycetes homotálicos producen gametos que se fusionan con cualquier otro gameto en la población (incluyendo sus propios descendientes mitóticos), lo que es muy común debido a que cada haploide contiene las dos formas alternativas del locus *MAT* en su genoma. En los hongos homotálicos, genes homólogos de ambos idiomorfos *MAT1-1* y *MAT1-2* frecuentemente están presentes dentro del mismo núcleo, en contraste con las especies heterotálicas que tienen genes *MAT* alternos en diferentes núcleos, lo que hace que este fenómeno sea mucho más complejo que el heterotalismo. Aunque la reproducción sexual está ausente en un gran número de ascomycetes filamentosos, las secuencias del gen *MAT* se han identificado y secuenciado en varios hongos aparentemente asexuales, tales como *Alternaria alternata* (Arie et al., 2000), *Zymoseptoria passerinii* (Goodwin et al., 2003) y varias especies del género *Cercospora* (Groenewald et al., 2006b). El hallazgo de que los ascomycetes asexuales también contienen genes de tipo de apareamiento (*MAT*) hace sospechar de la existencia de un ciclo sexual que también podría estar activo en los miembros de algunas de estas especies supuestamente asexuales, y de que este ciclo aún no haya sido identificado. Otra posibilidad es que los hongos asexuales que llevan genes de tipo de apareamiento (*MAT*) pueden haber perdido o carecen de otros atributos que son necesarios para apareamiento (Sharon et al., 1996; Arie et al., 2000). Algunas especies de hongos sin fase sexual conocida están estrechamente emparentadas con especies que tienen ciclos sexuales altamente activos y para las cuales ya se han caracterizado los genes de tipo de apareamiento (*MAT*). Este es el caso para la mayoría de las especies del género anamorfo *Cercospora*, relacionadas con las especies sexuales del género *Mycosphaerella* tales como *M. graminicola* (anamorfo *Zymoseptoria tritici*) (Waalwijk et al., 2002), para las que ambos genes de tipo de apareamiento (*MAT1-1-1* y *MAT1-2-1*) se han caracterizado. Recientemente, los genes de tipo de apareamiento (*MAT*) de algunas especies de *Cercospora* aparentemente asexuales fueron secuenciados y caracterizados. De esta manera, se descubrió que *Cercospora beticola*, *C. zae-maydis* y *Cercospora zeina* son heterotálicos, pero sólo uno de los mating

type estaba presente en las poblaciones de *Cercospora apii* (*MAT1*) y *Cercospora apiicola* (*MAT2*), y por lo tanto es posible que estas dos especies carezcan de la capacidad de reproducirse sexualmente debido a la ausencia del tipo de apareamiento opuesto (Groenewald et al., 2006a,b). Estos investigadores usaron primers específicos para el género *Cercospora* para detectar la presencia de los genes *MAT1-1-1* y *MAT1-2-1* en muchos aislados diferentes de *C. beticola*, una especie emparentada y cercana a *C. kikuchii*. Los resultados mostraron que tanto el gen *MAT1-1-1* como el gen *MAT1-2-1* estaban presentes en un único aislamiento, indicando que *C. beticola* es heterotálico. Analizando poblaciones de *C. beticola* colectadas en Europa Occidental, Irán y Nueva Zelanda, determinaron que los dos tipos de apareamiento de *C. beticola* se distribuyeron aproximadamente por igual (Groenewald et al., 2008). La distribución equitativa de los tipos de apareamiento en la mayoría de las poblaciones analizadas (excepto Italia) encontrada por Groenewald et al. (2008), sugiere la selección dependiente de la frecuencia y por lo tanto apareamiento al azar (del inglés: *random mating*). Por lo tanto, los altos niveles de diversidad genotípica junto con proporciones iguales de tipo de apareamiento (*MAT*) indicarían que *C. beticola* se reproduce sexualmente, y que estos genes podrían de hecho estar activos, indicando la existencia de sexo críptico. Por otro lado, más recientemente, se informó una distribución asimétrica de tipos de apareamiento de *C. beticola* en campos de remolacha azucarera de diferentes localidades en Irán, encontrando en algunos campos ambos tipos de apareamiento y en otros sólo uno de ellos (Bakhshi et al., 2011). Sin embargo, otro estudio llevado a cabo durante un período de 3 años en los EE. UU., analizó la frecuencia y distribución de los genes *MAT* de 1024 aislados de *C. beticola*, verificando aproximadamente una distribución equitativa de los tipos de apareamiento para cada año de muestreo. Estos investigadores también concluyeron que los datos de campo sugieren que *C. beticola* tiene potencial para la reproducción sexual (Bolton et al., 2012a). Un estudio similar fue realizado por Kim et al. (2013a), al analizar 132 aislados de *C. sojina* provenientes del estado de Arkansas, EE. UU., determinando que 68 aislados tuvieron el idiomorfo *MAT1-1* y 64 aislados tuvieron el idiomorfo *MAT1-2*. En este estudio, si bien ambos idiomorfos fueron aislados incluso de lesiones separadas en una misma hoja, ningún aislamiento tuvo ambos idiomorfos. Estos investigadores confirmaron que los *loci* de tipo de apareamiento (*MAT*) estaban presentes aproximadamente en iguales proporciones en todas las poblaciones analizadas, sugiriendo que *C. sojina* también estaría experimentando reproducción sexual críptica en el campo. De todas maneras, si bien estos estudios genéticos realizados en *C. beticola* (Groenewald et al., 2006a, 2006b, 2008; Bolton et al., 2012a) y *C. sojina* (Kim et al., 2013) sugieren que algunas poblaciones se reproducen sexualmente, el estado sexual de *C. kikuchii* es hasta el momento desconocido (Chupp, 1954; Groenewald et al., 2006b). Recientemente, Albu et al. (2016b) investigaron el potencial de reproducción sexual en *C. cf. flagellaris*, agente causal del TH/MPS en Luisiana, EE. UU., al determinar la frecuencia de los idiomorfos de tipo de apareamiento *MAT1-1/MAT1-2* dentro de la población estudiada. Aunque el idiomorfo *MAT1-2* fue significativamente más común, la presencia de ambos tipos de apareamiento sugiere que existe el potencial de reproducción sexual.

1.4. Variabilidad genética de *Cercospora kikuchii*

De acuerdo con varios estudios preliminares de caracterización genética de poblaciones de *C. kikuchii* de todo el mundo, utilizando las técnicas de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificadas, más conocidos por su acrónimo inglés **AFLP** (*amplified fragment length polymorphism*), y amplificación aleatoria de ADN polimórfico, más conocida por el acrónimo inglés **RAPD** (*randomly amplified polymorphic DNA*), se ha confirmado que esta especie posee una amplia variabilidad genética en sus poblaciones naturales. Por ejemplo, Imazaki et al. (2006b) utilizando la técnica AFLP en un total de 178 aislados de Japón, recolectados durante 2003, determinaron alta variabilidad genética existente en la población muestreada. Los mismos autores analizaron 160 aislados de *C. kikuchii* provenientes de 26 variedades de soja, cultivadas en 2 provincias argentinas (Córdoba y Santa Fe), y de 4 variedades cultivadas en 4 estados brasileros (Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Paraná), durante 1996 y 2004 (148 aislados provinieron de cultivos de soja de la cosecha 2004), encontrando variabilidad genética en la población, si bien el 85% de los aislados pertenecían al linaje I. Estos investigadores especulan y proponen que *C. kikuchii* fue introducido en Sudamérica, directa o indirectamente, desde Asia Oriental, a través de semillas de soja infectadas. Los resultados de este estudio sugieren que la diversidad genotípica de la población del linaje I de América del Sur es menor que la de Japón, debido al efecto fundador, es decir, la pérdida de la variación genética que se produce cuando una nueva población se establece a partir de un número muy pequeño de individuos de una población mayor. En base a sus resultados, estos autores apoyan la teoría de que *C. kikuchii* es un hongo asexual, debido a la división en linajes, y que, por lo tanto, la diferencia en la diversidad genotípica de poblaciones del linaje I entre Sudamérica y Japón no es atribuible a la reproducción sexual. Otros estudios también han demostrado que esta especie presenta una gran variabilidad (Almeida et al., 2005; Imazaki et al., 2006b; Lurá et al., 2007; Lurá et al., 2011). En Argentina, Lurá et al. (2007) detectaron polimorfismo en 5 aislados provenientes de un único lote de producción de soja de la localidad de San Jerónimo, Santa Fe, con 5 de un total de 7 oligonucleótidos ensayados. Resultados similares fueron encontrados por Bradley et al. (2012), al analizar 62 aislados de la especie emparentada *C. sojina*, provenientes de Brasil (10 aislados), China (7 aislados), Nigeria (1 aislamiento) y EE. UU. (44 aislados), usando la técnica AFLP, confirmado un elevado grado diversidad genética intraespecífica. Sin embargo, si bien estas metodologías basadas en AFLP y RAPD han logrado dividir el pool genético de *C. kikuchii* en distintos grupos, no poseen el suficiente poder de resolución para distinguir relaciones filogenéticas más precisas, de manera de permitir el reconocimiento de arreglos de especies múltiples dentro de linajes genealógicos independientes. Por ejemplo, Almeida et al. (2005) no pudieron encontrar una relación entre los grupos separados por RAPD y el origen geográfico o el contenido de cercosporina entre 72 cepas de *C. kikuchii* provenientes de diferentes regiones de Brasil. De manera similar, Imazaki et al. (2006b) tampoco pudieron detectar diferenciación geográfica significativa en la frecuencia del linaje I en aislados de *C.*

kikuchii de Sudamérica (Argentina y Brasil) y los de Japón. Asimismo, Lurá et al. (2011), de un total de 37 aislados de *C. kikuchii* de diferentes regiones de la provincia de Santa Fe, recolectados durante los años 2005, 2006 y 2007, no pudieron correlacionar los grupos separados por el método de análisis de huella de ADN (*fingerprinting*) usando secuencias amplificadas por ISSR PCR (*ISSR-PCR DNA Fingerprint Profiling*), con el contenido de cercosporina u origen geográfico de los aislados.

1.5. Caracterización filogenética de *Cercospora kikuchii*

Si bien dentro del género *Cercospora* hay descritas más de 650 especies (Crous y Braun, 2003), son pocos los estudios que las han caracterizado mediante secuencias de ADN (Groenewald et al., 2013). Uno de los primeros estudios filogenéticos basado en secuencias parciales de ADN de la región espaciador interno transcrito (**ITS**, del inglés: *internal transcribed spacer*) confirmó que la taxa *Cercospora* se agrupa en un clado monofilético bien diferenciado dentro de la familia *Mycosphaerella*, a diferencia de otros géneros polifiléticos como por ejemplo *Septoria*, *Pseudocercospora*, *Passalora* y *Zasmidium* (Goodwin et al., 2001). Sin embargo, la región ITS (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2) carece de la resolución necesaria para distinguir entre la mayoría de las especies de *Cercospora* (Groenewald et al., 2013). Por ejemplo, Price et al. (2015a) analizaron 274 aislados del estado de Louisiana (166 recolectadas durante el año 2000, 65 en el año 2011, 36 en 2012 y 7 en 2013), secuenciando la región ITS incluyendo la región 5.8S. De acuerdo con el algoritmo y programa **BLASTn** (del inglés: *Basic Local Alignment Search Tool*), solo pudieron confirmar que los aislados estudiados pertenecen a *Cercospora* spp., sin poder distinguir entre especies. Por otro lado, Groenewald et al. (2006b) fueron los primeros en llevar a cabo un análisis filogenético con secuencias del gen *MAT* para determinar si tienen suficiente resolución discriminatoria entre las especies de *Cercospora* estrechamente relacionadas. Estos investigadores encontraron que las regiones conservadas de este gen carecen de la resolución necesaria para distinguir entre especies estrechamente relacionadas. Las secuencias del gen *MAT1-1-1* no lograron resolver la filogenia de especies distintas tales como *C. apii*, *C. beticola*, *C. polygonaceae*, *C. penzigii* o *C. kikuchii*. El análisis de acuerdo con la secuenciación del gen *MAT1-2-1* tampoco proporcionó resolución en el árbol filogenético entre las especies de *Cercospora* estrechamente relacionadas. Por lo tanto, las secuencias del locus *MAT* no pueden ser utilizadas con éxito en el análisis filogenético para distinguir entre especies de *Cercospora* spp. (Groenewald et al., 2010).

Subsiguientes estudios filogenéticos comenzaron a utilizar tipificación multilocus de secuencias (**MLST**, del inglés: *multilocus sequence typing*). MLST es una técnica de genotipado o genotipificación basada en la secuenciación del ADN de genes que están bajo presión selectiva estable, los llamados genes *housekeeping* o constitutivos. Aunque la técnica originalmente se ha propuesto y se ha utilizado para el genotipado de bacterias (Maiden et al., 1998), se ha convertido cada vez más popular para el genotipado de los hongos (Taylor y Fisher, 2003). MLST tiene varias ventajas sobre otras técnicas de

genotipificación tales como RAPD. En primer lugar, se basa en datos de secuenciación y puede por lo tanto fácilmente ser compartida entre laboratorios (Maiden et al., 1998). En cambio, los datos de RAPD necesitan ser codificados exactamente de la misma manera entre los laboratorios o las fotos de gel tienen que ser compartidas. En segundo lugar, las secuencias son altamente reproducibles entre diferentes laboratorios. En tercer lugar, los datos se pueden registrar y almacenar en bases de datos públicas tales como GenBank del NCBI (del inglés: *National Center for Biotechnology Information*, U.S. National Library of Medicine), a las cuales se puede acceder fácilmente. De todas maneras, la técnica MLST también tiene algunas desventajas como, por ejemplo, necesitar secuenciar múltiples *loci* para lograr una resolución óptima (Maiden et al., 1998), lo que requiere más tiempo y eleva los costos con cada *locus* adicional incluido. No todos los *loci* se amplifican fácilmente o son igualmente convenientes, incluso entre especies del mismo género (Crous y Groenewald, 2005).

La primera asociación entre el género *Cercospora* spp. y la MPS fue informada por R. Kikuchi en 1922 (Matsumoto y Tomoyasu, 1925). Molecular y filogenéticamente, la especie *C. kikuchii* se define por la cepa “tipo” CBS 128.27 / CPC 5068, aislada por T. Matsumoto a partir de plantas de *Glycine soja* o soja silvestre (anteriormente *G. ussuriensis*) en Japón (Matsumoto y Tomoyasu, 1925, 1927). Las primeras secuencias de ADN para varios *loci* de la especie *C. kikuchii* fueron generadas por Lartey et al. (2010). Sin embargo, el primer estudio en colocar la especie *C. kikuchii* en una filogenia molecular para comprender su relación con otras especies del género *Cercospora* fue realizada por Groenewald et al. (2013). Este estudio incluyó secuencias de 4 aislados de *C. kikuchii*, tres recuperados a partir de síntomas de TH/MPS en plantas de *Glycine soja* de Japón y un aislado recuperado a partir de *Glycine max* de Argentina. Estos autores utilizaron secuencias de 5 *loci*: ITS (incluyendo el gen ITS1, 5.8S ARNm y ITS2), factor de elongación de la transducción 1-alfa (*tef1*, del inglés: *translation elongation factor 1-alpha*), actina (*actA*, del inglés: *actin*), calmodulina (*cmdA*, del inglés: *calmodulin*) y la histona H3 (*his3*, del inglés: *histone H3*); para estudiar los límites entre las especies y la diversidad en el género *Cercospora*. Posteriormente, en los últimos años, diferentes estudios que utilizaron un análisis filogenético multilocus de hongos cercosporoides aislados de soja en Argentina, Brasil y EE. UU., han confirmado que el TH/MPS están asociados con varias especies crípticas. Por ejemplo, Albu et al. (2014a,b) utilizaron el mismo conjunto de genes (*ITS*, *actA*, *cmdA*, *his3*, *tef1*), para analizar aislados a partir de hojas sintomáticas con TH del estado de Luisiana. Estos autores concluyeron que el estudio filogenético multilocus demostró que ninguno de los aislados se agrupó dentro del clado que contiene la cepa tipo de *C. kikuchii*. Luego, Soares et al. (2015) realizaron un análisis filogenético con MLST de poblaciones de hongos aislados de plantas de soja con síntomas de TH/MPS. El estudio fue similar al realizado por Groenewald et al. (2013) y Albu et al. (2014a,b), adicionando secuencias de parte de otros 3 genes, dos nucleares: *cpf* (del inglés: *cercosporin facilitator protein*) y *tub2* (del inglés: β -*tubulin*), y uno mitocondrial: *cyb* (del inglés: *cytochrome b*); es decir, totalizando 8 genes: *ITS*, *actA*, *cmdA*, *his3*, *tef1*, *cpf*, *tub*, *cyb*. Se incluyeron aislados provenientes del estado de Arkansas, E.E. U.U. (22 aislados),

Brasil (40 aislados) y Argentina (45 aislados). En ese estudio se tomó como base de comparación el aislado tipo de *C. kikuchii*, anteriormente mencionado. El análisis reveló un patrón notable de variación genética, con secuencias agrupadas en cuatro subconjuntos y mostrando una distribución altamente congruente para los genes *cfp* y *tub*. Uno de los principales hallazgos fue que lograron identificar varias especies causantes de TH/MPS. Algunos aislados parecen representar especies de *Cercospora* aún no descritas. En el análisis filogenético que consideró los 7 *loci* nucleares, el clado I contuvo a la cepa tipo de *C. kikuchii* y correspondió al linaje I, con aislados de Argentina (5) y Brasil (2). Un clado hermano comprendió 6 aislados de Argentina (2) y Brasil (4) que pertenecieron al linaje II. Estos clados tuvieron a *C. sojina* como grupo hermano. Un tercer clado contuvo solamente aislados de Brasil que correspondió al linaje III. El cuarto y más amplio clado comprendió 6 aislados de E.E. U.U., todos pertenecientes al linaje IV, con una relación hermana respecto de los otros clados. Cruzando todos los análisis filogenéticos se obtuvo evidencia convincente para apoyar la monofilia de los linajes I y IV. De esta manera, se pudo precisar de que el linaje I contenía la cepa tipo de *C. kikuchii*, era monofilético y fue aislado en Argentina y Brasil. Este linaje fue el más frecuente en la colección (57,4%). En contraste, el linaje II (aislados de Argentina y principalmente Brasil) y el linaje III (exclusivamente Brasil) eran polifiléticos y contenían complejos de especies con un amplio rango de hospedantes, incluyendo la soja. Los autores concluyeron que estudios taxonómicos y filogenéticos adicionales son necesarios para confirmar el grado en que se han producido eventos de especiación y definir los límites de las especies dentro de los linajes II y III. Incluso dos aislados brasileños fueron agrupados junto con dos especies no descritas, *C. sp. Q* y *C. sp. P*, como taxas hermanas; los rangos de hospedantes de estas dos especies son amplios y abarcan una gran variedad de familias de plantas filogenéticamente relacionadas, incluyendo Fabaceae, Euphorbiaceae, Dioscoreaceae, Rutaceae y Rubiaceae, entre otras. El linaje 4 fue monofilético, y contuvo 26 aislados de los E.E. U.U., e incluyó a la especie *C. cf. flagellaris*. Este linaje fue el segundo más frecuente de la colección (24,5%). Estos autores concluyen que, en América del Sur, *C. kikuchii* se encuentra en asociación con estas enfermedades. Por último, Albu et al. (2016b) determinaron que *C. cf. flagellaris* (200 de 205 aislados evaluados) y *Cercospora cf. sigesbeckiae* (5 de 205 aislados evaluados) están asociados con el TH/MPS en varios estados del sur de EE. UU. (Louisiana, Arkansas, Mississippi, Missouri y Kansas). De esta manera, la presencia de *C. kikuchii* en EE. UU. sigue siendo incierta, por lo que estudios con muestreos más amplios, incluyendo aislados de otros estados, son necesarios para concluir sobre las especies de *Cercospora* causantes de TH/MPS que predominan en E.E. U.U. Recientemente, *C. cf. nicotianae* ha sido identificada como una de varias especies en asociación con el TH en Bolivia (Sautua et al., 2019a) y por primera vez se ha confirmado que es un agente causal del TH en la soja (Sautua et al., 2020a).

Estas investigaciones confirman la existencia de especies crípticas de *Cercospora* agentes causales del TH/MPS en las diferentes poblaciones de América. Por lo tanto, es necesario profundizar

estos estudios utilizando un mayor número de aislados de diferentes regiones productoras de soja de Argentina para confirmar la identidad de las especies que causan TH/MPS.

1.6. Genoma de *Cercospora kikuchii*

Actualmente, escasos recursos genómicos están públicamente disponibles y pueden usarse para el mejoramiento genético de cultivos en búsqueda de resistencia contra enfermedades como por ejemplo el TH/MPS. Las últimas investigaciones genéticas han avanzado en la secuenciación completa del genoma de especies fitopatógenas del género *Cercospora*. Zaccaron et al. (2015) secuenciaron el genoma de *C. cf. flagellaris* y Albu et al. (2017) el de *C. cf. sigesbeckiae*, ambas especies causantes de TH/MPS en EE. UU. Otras especies fitopatógenas del género *Cercospora* han sido recientemente secuenciadas, como por ejemplo *C. sojina*, causante de la MOR de la soja (Luo et al., 2018; Gu et al., 2020), *C. beticola*, patógeno de remolacha, *C. nicotianae*, patógeno de tabaco (de Jonge et al., 2018), *Cercospora brassicicola*, causante de manchas foliares en Brassicaceae (Wilken et al., 2020), *C. zeina*, patógeno de maíz (Wingfield et al., 2017), *Cercospora arachidicola*, patógeno de maní (Orner et al. 2015) y *Cercospora canescens*, patógeno de legumbres como el poroto (Chand et al., 2015). Estos trabajos proporcionaron nuevos recursos genómicos para patógenos clave del género *Cercospora*, y han comenzado a clarificar los mecanismos de patogénesis que pueden compartirse entre aquellas.

1.7. Genes de patogenicidad y virulencia en *Cercospora*

Los parásitos virulentos pueden infectar y dañar a un hospedante. Por lo tanto, la virulencia es la propiedad clave de los patógenos, y comprender la evolución de la virulencia ha sido un objetivo importante en fitopatología. La evolución de la virulencia puede determinar fenómenos importantes como la aparición y reemergencia de patógenos, el cambio de hospedantes, la expansión del rango de hospedantes y la superación de la resistencia del hospedante (Sacristán et al., 2008). De acuerdo con las definiciones propuestas por Vanderplank (1968), el efecto negativo cuantitativo de un patógeno sobre su hospedante se denominó **agresividad**, mientras que el término virulencia se utilizó para describir la capacidad de un patógeno para infectar un genotipo particular del hospedante, lo que en biología evolutiva se suele denominar **infectividad**. Sin embargo, la Sociedad Estadounidense de Fitopatología (American Phytopathological Society) ha adoptado la convención de definir la **patogenicidad** como la capacidad de un patógeno para causar una enfermedad en un hospedante en particular (es decir, una propiedad cualitativa) y la **virulencia** como el grado de daño causado al hospedante (es decir, una propiedad cuantitativa) (D'Arcy et al., 2001). De hecho, estas eran las definiciones tradicionales de patogenicidad y virulencia en fitopatología, que se remontan al menos a H.H. Whetzel (Hunt, 1994). Entonces, la patogenicidad se define como la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad y consecuente daño en un hospedante, mientras que la virulencia se considera un término relativo y se

define como la capacidad relativa de un microorganismo para causar daño en un hospedante (Casadevall y Pirofski, 1999). Se define virulencia como el grado de daño causado a un hospedante por la infección del parásito, y patogenicidad la capacidad cualitativa de un parásito para infectar y causar enfermedad en un hospedante. La selección puede actuar tanto sobre la virulencia como sobre la patogenicidad, y su cambio en las poblaciones de parásitos puede impulsar la evolución del parásito y la coevolución hospedante-parásito. Desde este punto de vista, la patogenicidad y la virulencia son propiedades del patógeno, pero están moduladas por la susceptibilidad y la resistencia del hospedante. Los factores de virulencia son de gran interés en la patogénesis microbiana porque a menudo son el objetivo de la respuesta inmunitaria, y las respuestas que neutralizan la acción de los factores de virulencia suelen ser protectoras. Es importante destacar que el daño del hospedante puede ocurrir como resultado de la acción microbiana directa sobre los tejidos, como resultado de la respuesta inmune al microbio o ambos. Un ejemplo de daño fúngico directo en los tejidos es la secreción de toxinas fúngicas.

De acuerdo con la evidencia acumulada, se asume que la secreción de determinantes de patogenicidad/virulencia denominados “**efectores**”, es el factor rector clave que determina la infección y colonización del hospedante. Las proteínas efectoras secretadas por hongos fitopatógenos son capaces de suprimir las respuestas de defensa de las plantas y alterar su fisiología para facilitar la invasión e infección (Stergiopoulos y de Wit, 2009; Giraldo y Valent, 2013; Lo Presti et al., 2015; Selin et al., 2016). Los efectores de patógenos filamentosos alteran el destino de las proteínas del hospedante a las que se dirigen, cambiando su estabilidad, su actividad, su ubicación y las proteínas asociadas con las que interactúan. Estas interacciones son complejas y se están empezando a dilucidar progresivamente (He et al., 2020). Algunos efectores inhiben la actividad de las proteínas que son su objetivo, mientras que otros la potencian o la utilizan, y algunos interactúan con múltiples proteínas del hospedante.

Varios son los efectores conocidos secretados por hongos fitopatógenos. Por ejemplo, el efector NIS1 (necrosis-inducing secreted protein 1) se identificó por primera vez en el hongo causante de antracnosis en pepino, *Colletotrichum orbiculare*, como una proteína secretada que causa la muerte celular (necrosis) en tabaco (*Nicotiana benthamiana*) (Yoshino et al., 2012). Posteriormente, Irieda et al. (2018) elucidaron que el efector NIS1 de múltiples patógenos interactúa comúnmente con las quinasas BAK1 y BIK1 asociadas con receptores de reconocimiento de patrón (**PRRs**, del inglés: *pattern recognition receptors*), inhibiendo así sus actividades quinasas y la interacción BIK1-NADPH oxidasa. De esta manera, este efector suprime las respuestas de defensa de las plantas interactuando con los componentes de las células hospedantes que transmiten la señalización desencadenada por los PRR en las plantas. En tabaco, el NIS1 suprimió la respuesta de hipersensibilidad y el estallido oxidativo, ambos inducidos por moléculas derivadas de patógenos. Estos estudios revelaron que el efector NIS1 se encuentra ampliamente conservado a lo largo de una amplia gama de hongos filamentosos, incluyendo *Colletotrichum* spp. y *Magnaporthe oryzae*, los que mantienen y utilizan este efector central para establecer la infección en sus plantas hospedantes al interactuar con quinasas

conservadas y centrales, asociadas a PRR, que también se sabe que son atacadas por efectores bacterianos. Este efector es un efector candidato involucrado en la producción de síntomas foliares del síndrome de la muerte súbita de la soja (SMS), causado principalmente por *Fusarium tucumaniae* y *F. virguliforme* (Ku et al., 2020). La sobreexpresión de FvNIS1 utilizando el sistema de expresión transitoria mediado por soybean mosaic virus (SMV) imita los síntomas foliares de SDS observados en la soja cultivada en el campo (Chang et al., 2016). Sin embargo, este efector no se ha reportado en *Cercospora* spp.

Son pocos los efectores conocidos para especies del género *Cercospora*. Al secuenciar el genoma de *C. sojina* raza 1 de China, Luo et al. (2018) identificaron aproximadamente 750 proteínas secretadas, incluidos 141 efectores patógenos putativos. Recientemente, se ha reportado sobre unos pocos genes que codifican para efectores en especies de *Cercospora* spp.

El efector fúngico AVR4 fue originalmente identificado en el hongo patógeno de tomate *Cladosporium fulvum* como una pequeña proteína lectina, conservada, rica en cisteína de unión a quitina (van Esse et al., 2007). Este gen codifica una proteína precursora de 135 aminoácidos que se dirige al espacio extracelular, donde se procesa en los extremos N y C. Después de la eliminación del péptido señal para el direccionamiento extracelular, la proteína es procesada en el extremo N por proteasas vegetales y / o fúngicas, dando como resultado una proteína de 105 aminoácidos que contiene ocho residuos de cisteína. La secuencia de la forma más abundante del AVR4 maduro de 86 aminoácidos no contiene una secuencia intrónica (Joosten et al., 1997). Se encontró que Avr4 se une específicamente a la quitina presente en las paredes celulares de los hongos en la planta (van den Burg et al. 2006) y se ha sugerido que, a través de esta unión, Avr4 puede proteger las hifas de los hongos contra la hidrólisis de las quitinasas de las plantas que se acumulan en el apoplasto durante la infección. Esto se ha demostrado en *Trichoderma viride* y *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* en presencia de quitinasa y β -1,3-glucanasa *in vitro* (van den Burg et al., 2006), y también para *C. apii* y *C. beticola* (Mesarich et al., 2016). Además, el silenciamiento de Avr4 en *C. fulvum* da como resultado una virulencia claramente comprometida, lo que demuestra que Avr4 es una proteína efectora que contribuye a la virulencia del patógeno. La producción *in planta* de Avr4 por *C. fulvum* no solo protege la quitina en la pared celular de los hongos contra la hidrólisis por las quitinasas del hospedante, sino que también puede reducir la liberación de fragmentos de quitina que podrían desencadenar respuestas inmunes del hospedante (funcionando como elicitador). Posteriormente, Stergiopoulos et al. (2010) encontraron que este efector está altamente conservado entre otras especies de *Cercospora*, como *C. beticola*, *C. apii*, *C. nicotianae* y *C. zeina*, que contienen un homólogo de AVR4 en sus genomas. Esta naturaleza ampliamente conservada de las secuencias de AVR4 en hongos con estilos de vida diversos indica que este efector puede haber conservado funciones de virulencia que desregulan la inmunidad del hospedante y facilitan la infección en un amplio rango de hospedantes (Kohler et al., 2016). Recientemente, Santos Rezende et al. (2020) clonaron el gen Avr4 a partir de aislados de *C. flagellaris* (agente causal de TH/MPS en EE. UU.), y

produjeron mutantes $\Delta avr4$ con marcada disminución de producción de cercosporina y con significativa reducción en la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de la toxina. Estos autores concluyeron que los mutantes también fueron más sensibles a las quitinasas de la soja y mostraron una virulencia reducida en este hospedante en comparación con el tipo salvaje, probablemente debido a la reducción de la biosíntesis de cercosporina. La producción de cercosporina de mutantes $\Delta avr4$ en placas con PDA fue aproximadamente el 10% de la cantidad de cercosporina producida por el tipo salvaje. Por otro lado, se observaron reducciones de 19% y 30% en la actividad de quitinasa de soja en presencia de 15 μM de cercosporina en la placa después de 2 y 3 días, respectivamente, cuando los pocillos contenían 0.25 U de quitinasa. De esta manera, estos investigadores demostraron por primera vez, a través de dos enfoques independientes, la participación directa de AVR4 en la biosíntesis de cercosporina. La cercosporina se considera un factor de virulencia muy importante y se ha asociado con la formación de lesiones (tejido necrótico) en las hojas de soja (Upchurch et al., 1991a). La cercosporina puede absorber energía luminosa y convertirse al estado de triplete activado energéticamente, que puede reaccionar con el oxígeno y dar como resultado la generación de especies tóxicas de oxígeno reactivo, como el oxígeno singlete y el superóxido (Daub y Chung, 2007). La cercosporina fotosensibilizada puede causar la peroxidación de los lípidos de la membrana, lo que lleva a su ruptura, contribuyendo a la pérdida de nutrientes y la muerte celular; y en última instancia promoviendo el crecimiento y la propagación de hifas fúngicas intracelularmente (Figura 6) (Daub, 1982; Daub y Briggs, 1983; Daub y Ehrenshaft, 2000). La producción de cercosporina se redujo drásticamente en los mutantes $\Delta avr4$ en comparación con el hongo de tipo salvaje en ensayos *in vitro* e *in planta*. Además, los mutantes de disrupción $\Delta avr4$ tuvieron niveles de expresión más bajos de los genes de biosíntesis de cercosporina (CTB) en condiciones de luz y oscuridad. La quitinasa inhibió el crecimiento micelial de mutantes de $\Delta avr4$ *in vitro*, mientras que el hongo de tipo salvaje no fue afectado por la enzima. Además, el crecimiento y la virulencia de los mutantes $\Delta avr4$ se vieron claramente comprometidos en hojas de soja, lo que sugiere que los mutantes son más vulnerables a los efectos deletéreos de las quitinasas del hospedante. Curiosamente, también se encontró que la cercosporina inhibe la actividad de la quitinasa *in vitro*. Estos resultados sugieren que AVR4 contribuye a la virulencia de *C. flagellaris* en la soja al proteger las hifas de hongos y afectar la biosíntesis de cercosporina (Rezende et al., 2020). La reducción en la producción de cercosporina se asoció con la regulación a la baja de la expresión de los genes CTB1 y CTB8 en los mutantes $\Delta avr4$. Este resultado concuerda con estudios anteriores que muestran que la expresión de genes CTB se correlacionó con la producción de toxinas (Chen et al., 2007). La reducción en la producción de cercosporina y la supresión significativa de la expresión de los genes de la ruta biosintética de la cercosporina se confirmaron de forma independiente mediante la supresión *in vitro* de Avr4 mediada por dsRNA en el tipo salvaje. Estos datos combinados demostraron de manera concluyente un papel directo de AVR4 en la expresión génica de la vía biosintética de la cercosporina y la producción de cercosporina. Por lo tanto, esta proteína efectora fúngica suprime las defensas del

hospedante al afectar la expresión de los genes de la vía biosintética de la cercosporina y la producción de esta toxina.

Otros pocos efectores adicionales fueron identificados en especies patógenas de *Cercospora*. El efector Cs_07324 fue inicialmente encontrado en *C. sojina* (Calegari Fagundes, 2018). El gen Cs_07324 codifica una pequeña proteína secretada, de 167 aminoácidos, sin dominios conservados. Los efectores CBET3_03921 y CB0940_10646 fueron inicialmente identificados y descritos en *C. beticola* (Ebert, 2018). El primero se denominó Nip1 (efector 1 inductor de necrosis) y representa el primer factor de virulencia fitotóxico de naturaleza proteica identificado en *C. beticola* (Ebert et al., 2021). Esta proteína puede inducir la muerte de la célula hospedante en la oscuridad y, por tanto, puede complementar la acción de las fitotoxinas cercosporina y beticolina dependientes de la luz.

Por otro lado, las **fitotoxinas** sintetizadas por hongos fitopatógenos son también considerados factores de patogenicidad y virulencia clave para la patogenicidad, es decir, juegan un papel en causar o exacerbar la enfermedad de la planta (Hof, 2008). Se ha demostrado que las micotoxinas contribuyen a la patogenicidad, agresividad y / o virulencia de los hongos (Möbius y Hertweck, 2009). Las estrategias para ejercer la virulencia pueden ser múltiples: en general, los patógenos necrotróficos utilizan toxinas para provocar la muerte de las células vegetales y obtener nutrientes del tejido muerto. Las fitotoxinas pueden interactuar con una variedad de objetivos celulares, alterar la expresión génica o socavar la integridad de la membrana. Varias fitotoxinas inhiben la actividad de las enzimas vegetales, interrumpiendo así la biosíntesis de metabolitos cruciales. Finalmente, las células vegetales pueden resultar dañadas por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las micotoxinas son moléculas de bajo peso molecular (es decir, moléculas pequeñas), producto del metabolismo secundario, que poseen diversas funciones y naturaleza química. Por un lado, funcionan como armas químicas, al ser tóxicas a las células del hospedante, desempeñando un papel en la facilitación del crecimiento y la propagación del hongo en un hospedante determinado, de modo que la cepa productora se beneficia directamente de sus metabolitos. Por otro lado, ciertas micotoxinas son capaces de atacar y neutralizar los mecanismos de defensa de una planta como por ejemplo las fitoalexinas. Por lo tanto, las micotoxinas en este caso juegan el papel como factores de virulencia. Por lo general, estos metabolitos secundarios de hongos por sí solos reproducen algunos o incluso todos los síntomas de la enfermedad.

En *Cercospora* spp. se conocen la toxina **cercosporina**, aislada por primera vez de *C. kikuchii*, (Kuyama y Tamura, 1957) y las **beticolinas**, aisladas de *C. beticola* (Milat et al., 1992, 1993; Milat y Blein, 1995; Ducrot et al., 1994a,b, 1996; Simon-Plas et al., 1996; Goudet et al., 2000; Rangel et al., 2020). Ambas fitotoxinas se consideran metabolitos secundarios con capacidad de provocar la muerte celular en sus hospedantes, que solo son activas en presencia de luz y no muestran especificidad con el hospedante. En múltiples especies de *Cercospora*, los mutantes de alteración genética dirigidos que no pueden producir cercosporina muestran una virulencia reducida, lo que demuestra la importancia de la

inducción de necrosis para el proceso de infección en este género (Upchurch et al., 1991a; Callahan et al., 1999; Choquer et al., 2005).

Varios metabolitos secundarios de hongos, como las fitotoxinas, son sintetizados por genes que se encuentran en el genoma agrupados en **clusters o grupos de genes** (Keller, 2019). La biosíntesis de la cercosporina sigue la ruta de los policétidos en los hongos Ascomycota, del metabolismo secundario. La toxina es sintetizada en una serie de pasos en los que intervienen varias enzimas (Chen et al., 2007; de Jonge et al., 2018). Estas enzimas están codificadas en un cluster o grupo de genes, denominado en inglés como “**cercosporin toxin biosynthesis (CTB) gene cluster**”. Estos genes implicados en la biosíntesis de la cercosporina se han identificado primero en *C. nicotianae* y luego en *C. beticola*. Inicialmente, Chen et al. (2007) identificaron 8 genes de biosíntesis de cercosporina (CTB1-8) y 4 marcos de lectura abiertos (ORF) adicionales (ORF9–12) organizados en un cluster o grupo en *C. nicotianae*. Posteriormente, de Jonge et al. (2018) comprobaron que el grupo CTB es significativamente más grande de lo descrito anteriormente. Estos autores identificaron los genes CTB9-12 y 4 genes más (CBET3_00840, CBET3_00846, CBET3_00847, CBET3_00847), junto con la ubicación dentro del cluster CTB del gen CFP previamente conocido. En total el cluster cubre unos 53.3 kb incluyendo 22 genes. La expresión de estos genes CTB se encuentra coordinada y regulada por el gen CTB8, que codifica un factor de transcripción con dedos de zinc (Chen et al., 2007). Además de CTB8, la biosíntesis de cercosporina también está regulada por CRG1, un factor de transcripción Zn(II)Cys6 involucrado tanto en la producción como en la resistencia a cercosporina (Chung et al., 1999, 2003). Este gen no se encuentra dentro del cluster CTB, sino en otra región del genoma. De acuerdo con análisis filogenéticos de estos genes flanqueantes y reconciliación de sus respectivas filogenias proteicas, de Jonge et al. (2018) concluyeron que la evidencia sugiere que el cluster CTB se transfirió en forma entera como un todo al menos una vez, seguido de trayectorias evolutivas específicas de la especie que implican la pérdida frecuente de genes y la ganancia de otros genes.

Otras moléculas relacionadas con la patogénesis son los pigmentos, que son importantes metabolitos secundarios que permiten que los patógenos infecten con éxito a los hospedantes. Un ejemplo es la **melanina**, un componente integral de la pared celular fúngica, para la que se han propuesto diversas funciones como la protección ante factores ambientales, la resistencia mecánica de la pared celular de los hongos, la contribución a la penetración por apresorio, alterar las respuestas de las citocinas, disminuir la fagocitosis y reducir la toxicidad de los péptidos microbicidas, las especies reactivas de oxígeno y los fármacos antifúngicos (Gomez and Nosanchuk, 2003; Nosanchuk and Casadevall, 2003, 2006; Liu y Nizet, 2009). Estudios de mutagénesis han confirmado una función de virulencia de la producción de melanina en hongos como *Aspergillus* (Jahn et al. 1997). Otros estudios realizados en *Mycosphaerella fijiensis* sugieren que la melanina fúngica secretada actúa como un factor de virulencia a través de la fotogeneración de oxígeno molecular singlete, de manera similar a las perilenquinonas (Beltrán-García et al., 2014). Mediante estudios de transcriptómica, Luo et al. (2018)

detectaron en aislados de *C. soja* sometidos a estrés por falta de nitrógeno, que los genes involucrados en la biosíntesis de pigmentos (incluyendo PKSs) aumentaron su tasa o nivel de expresión significativamente. La falta de nitrógeno es uno de los principales estreses infligidos al hospedante después de la infección por patógenos, lo que a su vez afecta en gran medida el crecimiento y el ciclo celular de proteínas en muchos hongos. Esta es una de las razones que explican el gran número de genes inducidos durante la etapa inicial de la infección. De esta manera, se cree que la melanina contribuye a la virulencia de los hongos permitiendo la invasión tisular, la inactivación del sistema de defensa de las plantas e influir en la respuesta inmunitaria del hospedante a la infección, al reducir la susceptibilidad del patógeno a la muerte por mecanismos antimicrobianos del hospedante, funcionando como fitotoxina activada por luz y eventualmente contribuyendo a la muerte celular del hospedante.

Las melaninas son pigmentos de alto peso molecular, estructuralmente diversas, hechos de polimerización oxidativa que involucra quinonas, que pueden asumir tres estados de oxidación (Nosanchuk et al., 2015). Sin embargo, la estructura de la melanina permanece aún no esclarecida del todo, debido a que las metodologías biofísicas clásicas no se pueden aplicar para descifrar su estructura porque este polímero es insoluble en fluidos acuosos u orgánicos y cualquier intento de solubilización termina alterando su estructura. Las melaninas tienen estructuras locales ordenadas, pero su organización a mayor escala es amorfa. En hongos y bacterias la melanina se produce a través de la vía de la policétido sintasa o es catalizada por fenoloxidasas (Wheeler y Bell, 1988; Langfelder et al., 2003). Una variedad de diversas enzimas, que incluyen fenoloxidasas, tirosinasas, catecolalases y lacasas, pueden generar melaninas. Las melaninas formadas por la vía de la policétido sintasa se denominan **melaninas dihidroxinaftaleno (DHN)**. Las policétido sintasas (**PKSs**, del inglés: *polyketide synthases*) son una familia de enzimas multidominio o complejos enzimáticos que biosintetizan **policétidos** (precursores de productos naturales que son metabolitos secundarios de bacterias, hongos, plantas y animales).

1.8. Hospedantes alternativos

El rango de hospedantes de muchas especies de *Cercospora* spp. se ha determinado históricamente mediante pruebas de patogenicidad (Groenewald et al., 2006c). Sin embargo, la versatilidad de las diferentes especies de *Cercospora* recientemente asociadas con el TH/MPS como patógeno de múltiples hospedantes parece haber sido subestimada históricamente. Recientemente, Borges et al. (2018) analizaron datos MLST de siete *loci* nucleares de 36 aislados de Brasil y E.E. U.U., muestreados a partir de especies hospedantes diferentes de la soja, incluyendo 13 aislados a partir de soja. El análisis filogenético reveló un linaje adicional a los cuatro descritos por Soares et al. (2015), y que, de los cinco linajes genealógicos, el linaje 1 estuvo integrado solo por *C. kikuchii*; especie que solo infecta la soja. Los cuatro linajes restantes estuvieron conformados por especies de *Cercospora* con múltiples hospedantes, entre ellos soja, especies ornamentales y malezas. Las ubicaciones genealógicas

no estuvieron relacionadas con la asociación del hospedante, sino que los aislados se agruparon según la geografía. Estos autores concluyen que el complejo patrón de los arreglos de múltiples especies requiere una reevaluación del concepto de que la mayoría de las especies de *Cercospora* son estrictamente hospedante-específicas.

1.9. Métodos para estimar la intensidad del TH

Los métodos para cuantificar y monitorear la intensidad del TH en el campo se basan en la estimación visual de los síntomas foliares (Figura 10). La estimación de la severidad foliar (porcentaje de área foliar afectada con síntomas de la enfermedad) es una metodología subjetiva, que requiere entrenamiento del evaluador. Recientemente, Ward et al. (2021) han desarrollado una escala para evaluar el comportamiento sanitario de accesiones de soja frente al TH/MPS en el sur de E.E. U.U. (Figura 11). Una alternativa es utilizar softwares que estiman dicha variable, pero consumen tiempo y son laboriosos para aplicar en forma rutinaria durante el monitoreo a campo. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar sistemas prácticos y objetivos para estimar la intensidad del TH, que puedan usarse de manera confiable en estudios cuantitativos y epidemiológicos.

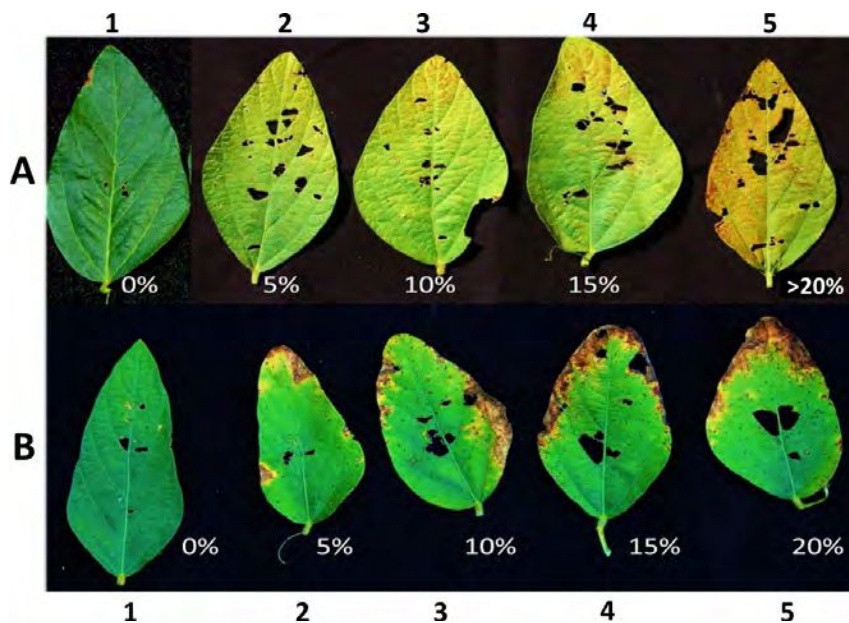


Figura 10. Escala utilizada para evaluar los síntomas de tizón morado y del tizón foliar de la soja causados por *Cercospora* en la etapa de crecimiento R6. A) Porcentajes de síntomas morados estimados por ASSESS 2.0. B) Porcentajes de síntomas de tizón estimados por ASSESS 2.0. Autor: García Aroca, 2016, modificado de Silva 2014. En este estudio los autores distinguen dos tipos de síntomas, tizón morado y tizón foliar (ver Resultados 3.3).

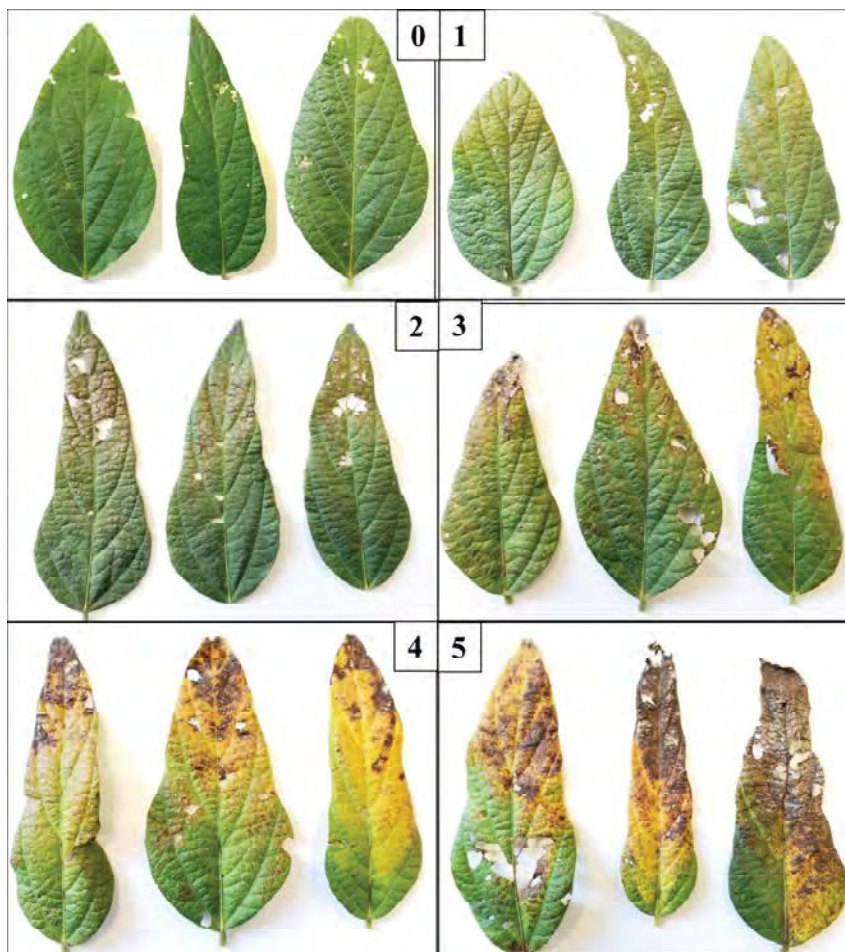


Figura 11. Escala de grados utilizada para evaluar los síntomas del TH y el comportamiento sanitario de accesiones de soja en el sur de E.E. U.U. Autor: Ward et al., 2021.

Una dificultad adicional que presenta esta enfermedad para su correcto diagnóstico y cuantificación es el prolongado período de incubación y latencia que posee (Carmona, 2014). La incubación en cámara húmeda (laboratorio) de hojas verdes asintomáticas, muestreadas en estadios reproductivos (R1 a R5) de cultivos comerciales de soja, revelaron la presencia de infecciones latentes de *C. kikuchii* (Sautua, 2005). Este es otro aspecto importante que debería tomarse en consideración cuando se diagnostica y evalúa la intensidad del TH/MPS en lotes experimentales y comerciales de soja.

1.10. Objetivos Específicos

- 1) Realizar un relevamiento de campos comerciales de soja en tres regiones de la Argentina: noroeste, centro de la región Pampeana y sur de la provincia de Buenos Aires; y obtener cepas de *Cercospora* spp. causantes de TH/MPS a partir de muestras sintomáticas de hojas y semillas.
- 2) Realizar una caracterización morfológica de los aislados.

- 3) Realizar una caracterización filogenética molecular de aislados de *Cercospora* spp. para determinar su identidad a nivel de especie.
- 4) Secuenciar y ensamblar un genoma de referencia de *C. kikuchii* por primera vez en el mundo.
- 5) Secuenciar y ensamblar un genoma de referencia de *C. sojina* de Argentina.
- 6) Explorar, buscar e identificar genes de patogenicidad y virulencia de especies de *Cercospora* en el genoma de referencia de *C. kikuchii*; y comparar las secuencias génicas entre especies emparentadas.
- 7) Identificar hospedantes alternativos de *Cercospora* spp. presentes en los puntos de muestreo en campos de soja.
- 8) Desarrollar un método fotográfico para estimar intensidad de TH a campo.
- 9) Evaluar el efecto de la MPS sobre la germinación de semillas y emergencia de plántulas de soja.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de aislados de *Cercospora* spp. causantes de TH/MPS

Desde 2014 hasta 2020, se realizaron muestreos de campos comerciales de soja de 67 localidades en 9 provincias diferentes de Argentina y en 3 sitios en Santa Cruz, Bolivia, con el objetivo de obtener aislados de *Cercospora* spp. a partir de hojas y semillas con síntomas de TH/MPS. La descripción completa de todos los campos muestreados, indicando las coordenadas de GPS de latitud y longitud, variedades de soja, etc. se muestra en la Tabla 42 del anexo I. Los aislados bolivianos fueron incluidos en el presente estudio con propósitos comparativos, ya que las poblaciones bolivianas sufrieron una mayor presión de selección debido a un uso más intensivo de fungicidas en Bolivia. Mientras que en Argentina durante los últimos 15 a 20 años las poblaciones naturales de *Cercospora* estuvieron expuestas principalmente a carbendazim y mezclas de QoI + DMI, en Bolivia estuvieron expuestas a QoI, DMI, SDHI, MBC y fungicidas multisitio como el clorotalonil. En cada localidad, se tomaron muestras al azar de diferentes campos comerciales de soja. Las muestras totales de Argentina se dividieron según su origen geográfico en 5 regiones: noroeste, noreste, centro, oeste y sureste.

Para realizar el aislamiento, se incubó el material vegetal mediante cámara húmeda tradicional para estimular la esporulación, y luego se utilizó el método descrito por Price (2013) y Price et al. (2015) para obtener cultivos monospóricos. Pequeños trozos de hojas enfermas (de aprox. 1 x 1 cm) por un lado, y semillas enteras por otro, se esterilizaron superficialmente con alcohol al 70% durante 30 segundos, hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto, seguido por dos enjuagues separados con agua destilada estéril durante 1 minuto cada uno. Luego se incubaron en cámaras húmedas confeccionadas con cajas de Petri, papel de filtro humedecido con agua destilada estéril y dos portaobjetos estériles

dispuestos en cruz sobre el papel. Las condiciones de incubación incluyeron un ciclo de fotoperíodo de 16 horas de luz negra fluorescente (40W) / 8 horas de oscuridad a 24°C +/- 1. Luego de 3 días de incubación, utilizando un microscopio estereoscópico (sistema óptico Greenough, zoom 6,3:1, ángulo de tubo de observación de 60°, campo visual de hasta 36,5 mm, luces LED) ubicado dentro del flujo laminar, se recogieron conidios individuales de las lesiones o cubiertas seminales esporuladas con una pipeta Pasteur modificada y se colocaron en placas de Petri con agar papa dextrosa (APD) (Britania, Buenos Aires, Argentina). Las cajas con conidios en APD se incubaron bajo las mismas condiciones que el material vegetal. Luego de 7 días de incubación se confirmaron las colonias de *Cercospora* spp. creciendo puras en APD. Solo se seleccionó un aislado por semilla u hoja muestreada. Los aislados obtenidos se mantuvieron en APD a 25°C con un ciclo de 16 h de luz: 8 h de oscuridad y se conservaron con tres métodos de conservación diferentes: a) en crioviales con agua estéril a 4°C, b) en tubos de ensayo con APG inclinados (slants) cubiertos con aceite mineral estéril a temperatura ambiente y c) en glicerol al 20% a -40°C. Todos los aislados se depositaron en la colección de cultivos fúngicos de la cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA, Argentina).

Los aislados obtenidos de Argentina se agruparon en 3 subgrupos de acuerdo con su origen geográfico, representando 3 regiones diferentes de Argentina: noroeste, centro y sureste (Tabla 42). Luego se realizó una selección al azar de aislados para los diferentes experimentos. Las regiones noreste (2 aislados) y oeste (3 aislados) no se incluyeron ya que no estaban representadas en igual proporción que el resto. Dentro de cada región, los aislados se eligieron al azar.

Para el presente estudio, se seleccionaron al azar 62 aislados argentinos y 3 aislados bolivianos de diferentes localidades. De la muestra seleccionada se seleccionó al azar una submuestra de 42 aislados para realizar un análisis filogenético. Por lo tanto, en total, se incluyeron 42 aislados para el análisis filogenético (Capítulo II) y 65 aislados para las pruebas de sensibilidad a fungicidas y la exploración de mutaciones que confieren resistencia a los fungicidas (Capítulo III). Los 38 aislados bolivianos obtenidos fueron usados para los estudios de filogenética y de sensibilidad a azoxystrobina.

2.2. Producción y medición de conidios

Estudios previos reportaron que el mejor medio de cultivo para estimular la esporulación de especies de *Cercospora* es aquel que contiene decocción de tejido vegetal de la especie hospedante. Nagel (1934) obtuvo la esporulación de *C. beticola* en un agar con decocción de hoja de remolacha azucarera, Diachun y Valteau (1941) reportaron esporulación de *C. nicotianae* en agar con decocción de hoja de tabaco y Kilpatrick y Johnson (1956) probaron decocción de hojas de zanahoria y hojas de soja (por separado) logrando esporulación de varias especies de *Cercospora*, incluyendo *C. kikuchii*.

Inicialmente, se realizó una prueba exploratoria preliminar para evaluar la estimulación de diferentes medios de cultivo sobre la esporulación *in vitro* de los aislados obtenidos. Se seleccionaron 15 aislados al azar, y se sembraron en los siguientes medios de cultivo: APD, agar con jugo de vegetales V8 (**V8**), agar con decocción de hojas de zanahoria (**CLDA**, del inglés: *carrot leaf-decoction agar*), agar con decocción de hojas de soja (**SLDA**, del inglés: *soybean leaf decoction agar*) y agar con polvo de rastrojo de soja (**SSPA**, del inglés: *senescent soybean plants agar*) (Tabla 1). Adicionalmente se probaron los siguientes regímenes de luz cercana al ultravioleta (tubos de luz negra fluorescente 40W): 24 hs de luz, 0 hs de luz, 12 hs luz: 12 hs oscuridad y 16 hs luz:8 hs oscuridad.

Tabla 1. Composición de medios de cultivo explorados para estimular la esporulación de aislados de *Cercospora* spp.

| Ingredientes | Medio de cultivo | | | | |
|-----------------------------|------------------|----------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| | APD | V8 | CLDA | SLDA | SSPA |
| cantidad tejido vegetal (g) | 200 | - | 300 | 300 | 100 |
| jugo de vegetales (mL) | - | 170 | - | - | - |
| CaCO ₃ (g) | - | 1 | - | - | - |
| agar (g) | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |
| dextrosa (g) | 10 | - | 10 | 10 | 10 |
| agua (mL) | 1000 | 830 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Referencia | USFDA, 2001 | USFDA, 2001 | Kilpatrick y Johnson, 1956 | Kilpatrick y Johnson, 1956 | Price, com. pers. (*) |

(*) picar 100 g de restos o rastrojo de plantas de soja muertas (picar con una licuadora u otro medio), diluirlo en 1 L de agua destilada, autoclavar durante 15 min. a 121°C. Luego filtrar el extracto líquido decantado (de color marrón, puede ser necesario filtrar con una gasa o tela), añadir 15g agar y llevar a 1 L. Finalmente autoclavar nuevamente durante 15 min. a 121°C.

El medio que más estimuló la esporulación *in vitro* de los aislados obtenidos de *Cercospora* spp. fue SLDA con 16 hs de luz:8 hs de oscuridad. Adicionalmente, durante las pruebas de patogenicidad (ver apartado 2.3), se observó que al inocular hojas verdes de soja con discos de micelio (método de la hoja destacada), se estimulaba la esporulación incluso con una mayor intensidad que con medio SLDA (ver fotos en sección resultados). Por lo tanto, para estimular la esporulación *in vitro*, para estudiar la morfología de conidios y conidióforos, se utilizaron dos metodologías: 1) los aislados se cultivaron en medio SLDA, sembrando 5 discos de micelio por caja de Petri, bajo 16 horas de luz negra fluorescente / 8 horas de oscuridad a 25°C±1 para inducir esporulación (Figura 12); 2) Mediante el método de hoja destacada (ver apartado 2.3), se colocaron en cada hoja de soja entre 4 a 8 discos de micelio de cada aislado y se incubó bajo las mismas condiciones anteriormente descriptas (Figura 13).

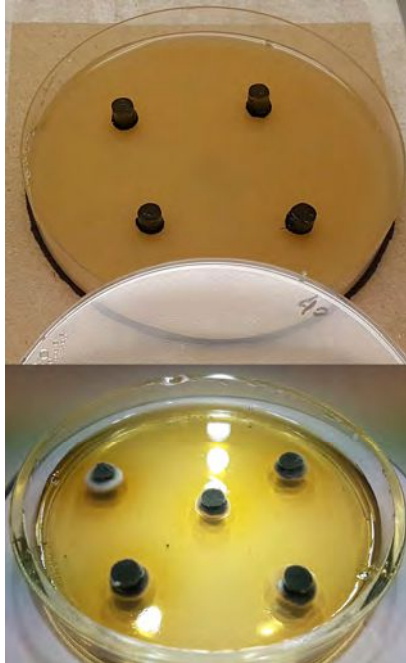


Figura 12. Discos de micelio sembrados en medio SLDA, para estimular la esporulación *in vitro*. En el ejemplo se muestra el aislado ARG_16_133

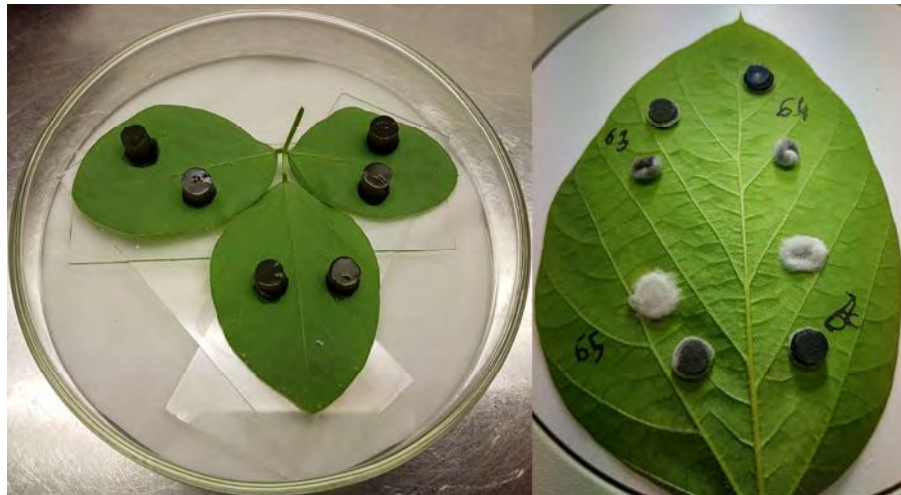


Figura 13. Discos de micelio sembrados en hojas de soja (hoja destacada), para estimular la esporulación *in vitro*. En el ejemplo de la derecha se muestran los aislados ARG_17_63 a 66

A partir de los conidios obtenidos, se estimó el largo y ancho de una muestra de más de 500 conidios utilizando un ocular graduado a 40x. Por otro lado, se seleccionaron al azar dos submuestras de 50 conidios y 50 conidióforos, de Argentina por un lado y de Bolivia por otro, para comparar ambas poblaciones realizando un análisis de componentes principales.

2.3. Microscopía electrónica

Se tomaron fotografías con microscopía electrónica de la esporulación natural de *C. kikuchii* sobre hojas de soja variedad NS4309, recolectadas el 24 de marzo de 2021 en un campo de producción comercial, ubicado en Piamonte, Santa Fe. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido QUANTA 250 ANALYTICAL SEM, marca FEI (Figura 14).

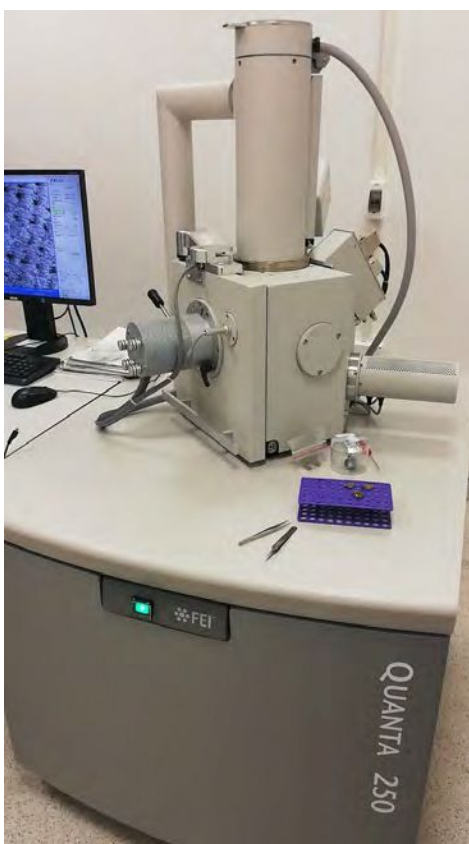


Figura 14. Microscopio electrónico QUANTA 250 ANALYTICAL SEM, marca FEI utilizado para fotografiar esporulación natural de *C. kikuchii* sobre hojas de soja.

2.4. Pruebas de patogenicidad

Los 62 aislados argentinos seleccionados para realizar los diferentes experimentos más los 38 aislados bolivianos fueron sometidos a pruebas de patogenicidad. Se utilizaron dos técnicas: hoja destacada e inoculación clásica de plantas enteras en invernáculo. Dentro de los 62 aislados se incluyó el aislado de referencia de *C. kikuchii* de Argentina (ARG_18_001) (Sautua et al., 2019b) como control positivo, para contrastar los síntomas con los causados por el resto de los aislados.

Hoja destacada. Se utilizó la metodología descrita anteriormente por Melouk y Banks (1978) y Santos Rezende et al. (2020). La metodología solo difirió respecto a la de Rezende et al. (2020) en que los discos de micelio se colocaron sobre la cara abaxial en vez de la cara adaxial. Se colectaron hojas de soja de la variedad DM4670, cuando el cultivo se encontraba en R5. Las hojas utilizadas en el experimento tuvieron una forma y tamaño similares y se recogieron de la misma posición en las plantas de soja. Las hojas desprendidas se enjuagaron con agua estéril, se secaron dentro del flujo laminar y se transfirieron a placas de Petri (9 cm de diámetro) que contenían papel de filtro esterilizado y empapado de agua estéril hasta su máxima capacidad de retención (sin exceso de agua). Luego, a partir de colonias de *Cercospora* spp. en activo crecimiento en APD, con 7 días de incubación, se tomaron entre 4 y 8 discos de micelio de 6 mm de diámetro de cada aislado, se invirtieron y se colocaron sobre la cara abaxial de las hojas (Figura 13). Al cabo de 7 días de incubación, bajo las condiciones indicadas en los apartados anteriores, se procedió a determinar si hubo infección, observando presencia o ausencia de clorosis y necrosis. Las placas se mantuvieron en incubación hasta los 21 días post inoculación. El experimento se repitió una vez.

Pruebas en planta entera en invernáculo. Se realizaron pruebas de patogenicidad en 11 variedades de soja de Argentina: DM3810, DM4214, DM4612, DM4615, DM4670, DM4915, NS4309, NS4611, NS4619iPRO, NA5009, NA5019iPRO. Las variedades seleccionadas representan los cultivares de soja más sembrados en la región pampeana argentina. En el caso de los aislados bolivianos, si bien en las pruebas de patogenicidad no se incluyeron las variedades de soja bolivianas (Milagrosa, NA 8009, SEM WEST 4863) a partir de las cuales se realizaron originalmente los aislados, actualmente no se conocen variedades de soja resistentes a TH/MPS, y por lo tanto las variedades de soja argentinas son susceptibles por igual. Esto fue consistente con los síntomas e intensidad de enfermedad observado a campo tanto en Bolivia como en Argentina.

Las suspensiones conidiales (1×10^3 conidios / ml) para realizar las inoculaciones se prepararon a partir de conidios producidos por los aislados cultivados en SLDA y de los conidios obtenidos con el método de hoja destacada, para cada aislado, en agua destilada esteril. Se añadió Tween 20 (0,2%) para facilitar la preparación de suspensiones de conidios. En invernáculo, se pulverizaron las plantas enteras cuando alcanzaron la etapa inicial de llenado de semillas (R5) (Figura 15) (Fehr y Caviness 1977). Las plantas inoculadas se incubaron en una cámara húmeda (realizada mediante bolsas de plástico) durante 24 horas y se mantuvieron en el invernadero a $24^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ bajo protocolos de bioseguridad (Figura 16). Después de un día en la cámara húmeda, se retiraron las bolsas y se realizó una observación visual de los síntomas en forma diaria. Las hojas rociadas con agua destilada estéril sirvieron como control. El patógeno se volvió a aislar de las áreas afectadas de las plantas y se comparó con los aislados originales para confirmar la finalización de los postulados de Koch. El experimento se repitió una vez.

Ambos experimentos se repitieron una vez para cada aislamiento (cada tipo de experimento se realizó dos veces en total).



Figura 15. Dr. Marcelo Carmona inoculando plantas de soja durante las pruebas de patogenicidad realizadas en los invernáculos de la cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA).



Figura 16. Plantas inoculadas en cámara húmeda (embolsadas) durante 24 h para favorecer la germinación de conidios, penetración e infección.

2.5. Identificación de nuevos síntomas de tizón foliar causado por *Cercospora* spp.

Durante el desarrollo de la presente tesis, con la intención de aislar *Septoria glycines* se incubaron muestras de hojas de soja que desplegaban síntomas extremadamente similares a los de la Mancha Marrón (MM) de la soja, causada por *S. glycines*. Estas hojas no desplegaban en absoluto síntomas del TH causado por *Cercospora* spp. Las hojas fueron incubadas con la misma metodología anteriormente descrita (ver 2.1), a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con fotoperíodo de 16 hs de luz cercana al UV : 8 hs de oscuridad, durante 4 días. Luego de la incubación, se detectó la presencia de *Cercospora* spp. asociadas a las manchas foliares, aquí denominadas “tipo *Septoria*” por su gran similitud con la MM. Este procedimiento se repitió tres veces más (cuatro veces en total). Las primeras muestras fueron recolectadas del tercio superior del canopeo de lotes de soja variedad DM4915 ubicados en Roldán, Santa Fe ($32^{\circ}55'23.73''\text{S}$; $60^{\circ}54'49.82''\text{O}$), cuando el cultivo se encontraba entre R5 y R6. Se realizaron tres muestreos independientes entre abril y mayo del 2017. Se incubaron en total 50 hojas. Como resultado de esta primera incubación, se detectó solamente la presencia de *Cercospora* spp. A partir de la esporulación resultante luego de la incubación, se realizaron aislados de acuerdo con la metodología previamente detallada (2.1). Los aislados obtenidos fueron conservados como se describió anteriormente y algunos fueron incluidos en las pruebas de patogenicidad (2.3).

A partir de este importante hallazgo, se decidió corroborar los resultados obtenidos y el procedimiento se repitió 5 veces más durante los subsiguientes 4 años, 2018, 2019, 2020 y 2021. La segunda, tercera, cuarta y quinta muestra de hojas con síntomas “tipo *Septoria*” fueron recolectadas al azar en la localidad de Bigand, Santa Fe, durante etapas reproductivas avanzadas del cultivo (posterior a R5), a partir de las siguientes fechas, variedades y puntos georreferenciados: 1) marzo 2018, ACA4990 (-33.4198 , -61.1845), 2) marzo 2019, ACA4990 (-33.4225 , -61.1837), 3) marzo 2020, DM4014 IPRO (-33.2452 , -61.1116) y 4) marzo 2021, DM4614 (-33.2437 , -61.1138), respectivamente. La sexta muestra fue recolectada en Piamonte, Santa Fe, en marzo del 2021 a partir de un lote sembrado con la variedad NS4309. Se utilizó la misma metodología de muestreo, es decir muestreando al azar hojas del tercio superior del canopeo, que manifestaban síntomas de manchas foliares “tipo *Septoria*” pero con ausencia de síntomas de TH. En la primera y segunda repetición (2018 y 2019), se incubaron 50 hojas en cada experimento, con 10 submuestras de 1 cm x 1 cm por hoja. En la tercera repetición (cuarto año de muestreo consecutivo), se realizaron 2 incubaciones independientes de las mismas 12 hojas cada una, con 10 submuestras de 1 cm x 1 cm por hoja. En la cuarta repetición (quinto año de muestreo consecutivo), se realizaron 2 incubaciones independientes de 10 hojas diferentes cada una, con 10 submuestras de 1 cm x 1 cm por hoja, 5 con manchas más grandes sospechadas de síntomas más típicos

de TH por *Cercospora* spp. y 5 con manchas más pequeñas sospechadas de MM causada por *S. glycines*. Adicionalmente, se incubaron 10 hojas que recibieron tratamientos con fungicida (5 hojas de parcelas en las que se aplicó Amistar Xtra y 5 hojas de parcelas en las que se aplicó Opera). Por lo tanto, se incubaron 20 hojas (primera incubación) y otras 20 hojas (segunda incubación) provenientes del tercio superior del canopeo (40 hojas en total), seleccionadas al azar del total muestreado. En la segunda incubación se realizó una variante en la incubación: las primeras 48 hs se incubaron en oscuridad y las 48 hs siguientes se incubaron con fotoperíodo de 16 hs de luz cercana al UV : 8 hs de oscuridad, para evaluar si el régimen de luz tenía o no un efecto en la esporulación de los patógenos y por lo tanto podría influir en la frecuencia de detección de cada uno. El experimento se repitió por sexta vez, a partir de hojas de soja de la variedad NS4309 que desplegaban síntomas “tipo *Septoria*”, muestreadas en Piamonte, Santa Fe, el 24 de marzo de 2021. Se realizó una incubación de 8 hojas en total, 4 de la mitad superior y 4 de la mitad inferior del canopeo. Para las muestras de 2020 y 2021, se cuantificó la frecuencia de detección de cada patógeno, y se estimó la intensidad de cada uno. Para estimar la intensidad de cada patógeno en un mismo trozo de tejido vegetal incubado se cuantificó la “densidad de esporulación” contando el número de “focos” de esporulación. Para *S. glycines* se contabilizaron los cirros y para *Cercospora* spp. se contabilizaron grupos de conidióforos saliendo desde un mismo punto de la hoja.

2.6. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se realizaron cultivos líquidos de cada aislado inoculando con pequeños trozos de micelio matraces de 250 mL que contenían 50 mL de caldo de papa dextrosa (FDA, 2004). El micelio aéreo de cada aislado, creciendo en cajas de Petri con APD, se raspó cuidadosamente con una aguja estéril, y luego se colocaron cuidadosamente pequeños trozos (1 a 2 mm) en el caldo a incubar (inoculación). Los cultivos líquidos se incubaron durante 3 días a 25°C en oscuridad con agitación constante proporcionada por un agitador estándar a 60 rpm. Después de la incubación (Figura 17), los micelios se recuperaron con un colador standard y se transfirieron aproximadamente 600 mg de tejido a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL. El ADN genómico se extrajo siguiendo el protocolo Dellaporta (Dellaporta et al., 1983). La cuantificación y el control de calidad del ADN extraído se realizó con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y luego se diluyó a una concentración de trabajo de 12 ng μL^{-1} .

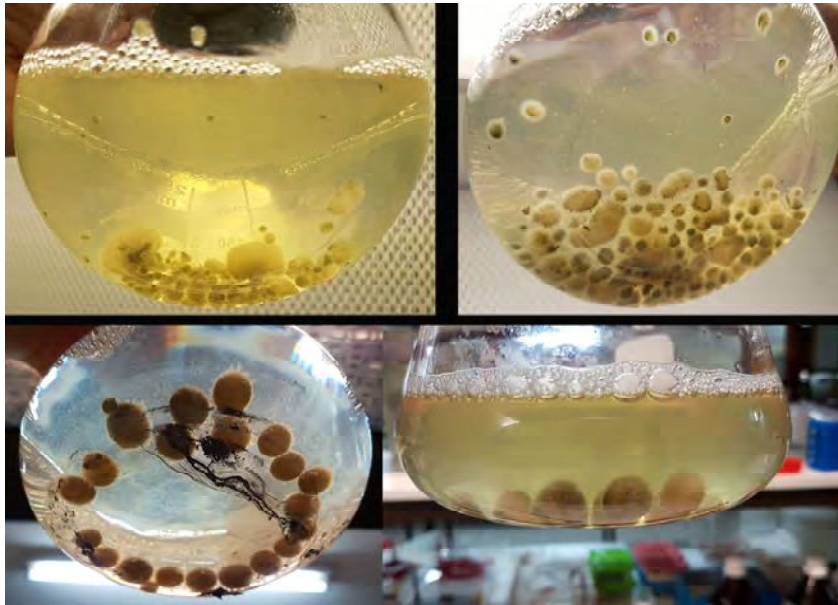


Figura 17. Micelio resultante de la incubación en caldo de papa dextrosa, para extracción de ADN.

2.7. Secuenciación de genoma de referencia de *Cercospora kikuchii*

Para contar con un genoma de referencia, se seleccionó un aislado y se identificó filogenéticamente como *C. kikuchii*. Luego se procedió a la secuenciación completa de su genoma.

2.7.1. Aislamiento, extracción y secuenciación de ADN genómico

A partir de semillas de soja de la variedad DM62R63, con síntomas de mancha púrpura, muestreadas durante la cosecha de 2018 en San Pedro, Buenos Aires, se aisló la cepa ARG_18_001. El aislamiento monospórico se realizó a partir de un conidio mediante la técnica de aislamiento descrita anteriormente en el apartado 2.1. El ADN genómico se aisló a partir de tejido hifal obtenido mediante la técnica de incubación descrita anteriormente en el apartado 2.5. Luego se procedió al molido con nitrógeno líquido (Figura 18). La extracción de ADN se realizó en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA -INTA) utilizando un protocolo de extracción de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) modificado, desarrollado por Berretta et al. (1998) (Figura 19). El ADN total se cuantificó por fluorometría utilizando un kit de colorante dsDNA Picogreen (Quant-iT, Invitrogen, de Life Technologies, CA, EE. UU.) con un lector de placas Victor 3.

La secuenciación genómica se realizó utilizando un sistema de secuenciación NovaSeq 6000 (Illumina), obteniendo 65,202,278 de lecturas. Las librerías “paired-end whole-genome shotgun” se

construyeron usando el kit de preparación TruSeq Nano DNA (tamaño de inserto 350 pb) siguiendo los protocolos de Illumina (San Diego, CA).



Figura 18. Micelio resultante de la incubación, molido con nitrógeno líquido hasta lograr la contextura que se observa en la foto.



Figura 19. Obtención de ADN de alta calidad para secuenciación genómica, mediante el protocolo de Berretta et al. (1998). Para “pescar” el ADN se utilizó una pipeta Pasteur modificada, de acuerdo con el protocolo de Berretta et al. (1998).

2.7.2. Identificación de especie mediante análisis filogenético

El aislado ARG_18_001 se identificó alineando siete loci nucleares: actina (*actA*), calmodulina (*cmdA*), región espaciadora transcripta interna ribosómica nuclear (*nrITS*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), histona H3 (*his3*), factor de elongación de traducción 1-a (*tefl*) y beta tubulina (*tub2*) con datos de Groenewald et al. (2013) y Bahkshi et al. (2018). Las secuencias fueron recuperadas del genoma secuenciado mediante BLAST+ (versión 2.2.31) (Zhang et al., 2000). Luego se realizó un análisis filogenético de máxima verosimilitud en RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Stamatakis, 2014) asumiendo un modelo GTRGAMMA con *Septoria provincialis* CPC_12226 como outgroup.

2.7.3. Ensamblado y anotación del genoma

El recorte y filtrado de lecturas (trimming and filtering) se realizó con Trimmomatic (Bolger et al., 2014), y la fusión de lecturas de pares de fragmentos más cortos se realizó con FLASH (Magoc y Salzberg, 2011). El ensamblado *de novo* se llevó a cabo usando el ensamblador Celera (Myers et al., 2000) y luego se completó con SPAdes (Bankevich et al., 2012), usando una amplia gama de valores de k-mer desde 21 hasta 111 con un paso de 2. El genoma se anotó usando FunGAP (Min et al., 2017), tRNAscan-SE (Chan and Lowe, 2019), rnammer (Lagesen et al., 2007) y MFannot (<http://megasun.bch.umontreal.ca/cgi-bin/mfannot/mfannotInterface.pl>) (Beck y Lang, 2010). Para predecir los genes con FunGAP, se utilizaron el genoma de *C. kikuchii* ARG_18_001 y las lecturas de RNA-sec de *C. beticola* 10.73.4 (Bioproject PRJNA294383) como entradas. Para realizar la anotación funcional, se utilizó hmsearch (Eddy, 2011) contra la base de datos PFAM (v32.0) (corte del valor $e \leq 10e-5$) y BLASTP (Altschul et al., 1990) (corte del valor $e \leq 10e-10$) contra la base de datos NCBI nr. Para asignar términos de Ontología Genética (Ashburner et al., 2000) se utilizó Blast2GO (Conesa et al., 2005) y la tabla pfam2go (<http://www.geneontology.org/external2go/pfam2go>) con el paquete ragp en el entorno de R (<https://rdr.io/github/missuse/trapo/>). Las regiones repetitivas, incluidas las repeticiones en tándem y los elementos transponibles, se detectaron utilizando la herramienta de identificación de repetición RepeatMasker (Tarailo-Graovac y Chen, 2004).

2.8. Secuenciación de genoma de referencia de *Cercospora sojina*

Para contar con un genoma de referencia de *C. sojina*, agente causal de la mancha ojo de rana de la soja de Argentina, se seleccionó un aislado a partir de una colección de aislados de *C. sojina* del CEREMIC. Luego se procedió a la secuenciación completa de su genoma.

2.8.1. Aislamiento, extracción y secuenciación de ADN genómico

A partir de muestras de hojas de soja, con síntomas de MOR, muestreadas durante la cosecha de 2009 en Venado Tuerto, Santa Fe, se aisló la cepa CCC 172_2009 (Scandiani et al., 2012) (aquí denominada ARG_09_001). Se determinó que el aislado pertenece a la raza 11. El aislamiento monospórico se realizó a partir de un conidio mediante la técnica de aislamiento descrita anteriormente en el apartado 2.1. El ADN genómico se aisló a partir de tejido hifal obtenido mediante la técnica de incubación descrita anteriormente en el apartado 2.6. La extracción de ADN se realizó de igual manera a como fue descrito en 2.7.1.

La secuenciación se realizó utilizando un sistema de secuenciación NovaSeq 6000 (Illumina) y produjo 48,103,762 lecturas. Las librerías “paired-end whole-genome shotgun” se construyeron usando el kit de preparación TruSeq Nano DNA (tamaño de inserto 350 pb) siguiendo los protocolos de Illumina (San Diego, CA).

2.8.2. Ensamblado y anotación del genoma

Se realizó la limpieza de las lecturas (trimming) por calidad con Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Luego, mediante el software GATK v4.1.0.0 (Van der Auwera y O'Connor, 2020) se realizó una búsqueda de variantes puntuales (SNPs e indels), usando como referencia el genoma de la raza 15 (ASM429982v1, no incluye genoma mitocondrial) de origen chino, depositado en el NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_004299825.1), y el genoma mitocondrial de la raza 1 (ASM253473v1), también de origen chino, depositado en el NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_002534735.1). Posteriormente, utilizando el comando *FastaAlternativeReferenceMaker* del mismo paquete, se generó la secuencia del genoma de la raza 11, a partir de la referencia de la raza 15 y de la raza 1 (para generar el genoma mitocondrial) con la inclusión de las variantes puntuales encontradas.

2.9. Identificación filogenética de los aislados

2.9.1. Amplificación y secuenciación de *actA*, *cmdA*, *gapdh*, *his3* y *tefl*

Para estudiar la relación filogenética de *Cercospora* spp. agentes causales de TH/MPS en Argentina, se eligieron 42 aislados al azar (incluyendo 39 aislados argentinos y 3 bolivianos) para ser identificados mediante la secuenciación parcial de cinco *loci* nucleares: actina (*actA*), calmodulina (*cmdA*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), histona H3 (*his3*) y factor de elongación de traducción 1- α (*tefl*); y alineándolos con datos de otros 379 aislados en Groenewald et al. (2013) y Bahkshi et al. (2018). Los fragmentos de estos genes se amplificaron a partir de ADN genómico de cada aislado usando los primers descritos en la Tabla 2. Los protocolos y las condiciones de PCR fueron

seguidos de acuerdo con la bibliografía (ver referencias en Tabla 2). El resumen de los *loci* secuenciados para cada aislado, que fueron utilizados en el análisis filogenético se muestra en la Tabla 3. Adicionalmente, de los 38 aislados bolivianos 37 fueron identificados de la misma forma, pero solamente se incluyó en el análisis porciones de *cmdA*, *his3* y *tefl* (Tabla 4). La información de las secuencias de Groenewald et al. (2013) y Bakhshi et al. (2018) utilizadas en los análisis filogenéticos se muestra en la Tabla 43 del anexo II. Todos los productos de PCR se purificaron y se secuenciaron en MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur, www.macrogen.com). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con los mismos primers que los usados en las amplificaciones por PCR.

Tabla 2. Primers (cebadores) utilizados para amplificar y secuenciar 5 loci nucleares, utilizados en el análisis filogenético molecular.

| Locus | Longitud total de amino-ácidos | Longitud total de nucleótidos | Región génica cubierta por secuenciación ^b | | Nº intrones | Primer | Secuencia de nucleótidos de cada primer (5'-3') | O ^a | Tamaño del producto (pb) | Annealing T (°C) | Referencia |
|---|--------------------------------|-------------------------------|---|------|-------------|--------------|---|----------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|
| | | | Inicio | Fin | | | | | | | |
| Actina (<i>actA</i>) | 375 | 1553 | 304 | 530 | 5 | ACT-512F | ATGTGCAAGCCGGTTTCGC | F | 300 | 61 | Carbone and Kohn, 1999 |
| | | | | | | ACT-783R | TACGAGTCCTTCTGGCCCAT | R | | | |
| Calmodulina (<i>cmdA</i>) | 149 | 754 | 172 | 471 | 4 | CAL-228F | GAGTTCAAGGAGCCTTCTCCC | F | 500 | 55 | Carbone and Kohn, 1999 |
| | | | | | | CAL737R | CATCTTCTGGCCATCATGG | R | | | |
| | | | 172 | 600 | | CAL2Rd | TGRTCNGCCTCDCGGATCATCTC | R | 500 | 47.5 - 50.8 - 54.9 | Groenewald et al., 2013 |
| | | | | | | 1 | 500 | CM008504-1_F | CTCATCATCGTTGGATCGTG | F | 591 |
| 50 | 500 | CM008504-1_R | CCTTGAACCTCGGAGACTTGC | R | 550 | 58 | Estudio actual | | | | |
| | | CM008504-2_F | ACATCATGGTACGCGCAAT | F | | | | | | | |
| Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (<i>gapdh</i>) | 338 | 1281 | 190 | 1103 | 4 | CM008504-2_R | CACTGATGAAGCCGTTGTTG | R | 1010 | 53 | Carbone and Kohn, 1999 |
| | | | | | | Gpd1-LM | ATTGGCCGCATCGTCTTCCGCAA | F | | | |
| Histona H3 (<i>his3</i>) | 136 | 646 | 218 | 604 | 2 | Gpd2-LM | CCCACCTCGTTGTCGTACCA | R | 400 | 47 | Crous et al., 2004 |
| | | | | | | CYL H3F | AGGTCCACTGGTGGCAAG | F | | | |
| Factor de elongación de traducción 1-alfa (<i>tef1</i>) | 459 | 1866 | 240 | 545 | 5 | CYL H3R | AGCTGGATGTCCTTGGACTG | R | 350 | 58 | Carbone and Kohn, 1999 |
| | | | | | | EF1-728F | CATCGAGAAGTTCGAGAAGG | F | | | |
| | | | | | | EF1-986R | TACTTGAAGGAACCCTTACC | R | | | |

^a O= orientación, F= forward, R= reverse. ^b Las posiciones inicial y final del fragmento secuenciado con respecto a las secuencias genéticas completas de cada gen del aislado de referencia de *C. kikuchii* ARG_18_001, recuperado del ensamblaje del genoma de referencia (Sautua et al., 2019b)

Tabla 3. Números de acceso de GenBank para los *loci* secuenciados de los aislados de *Cercospora* spp. causantes de TH/MPS utilizados en el análisis filogenético molecular. *Loci* secuenciados: actina (*actA*), calmodulina (*cmdA*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), histona 3 (*his3*), factor de elongación de traducción 1- α (*tefl*).

| Nº | Identificación de aislado | <i>actA</i> | <i>cmdA</i> | <i>gapdh</i> | <i>his3</i> | <i>tefl</i> |
|----|---------------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| 1 | ARG_2014_001 | MT013550 | MT013592 | MT013946 | - | MT013673 |
| 2 | ARG_2016_004 | MT013551 | MT013593 | MT013947 | MT013633 | MT013674 |
| 3 | ARG_2016_005 | MT013552 | MT013594 | MT013948 | MT013634 | MT013675 |
| 4 | ARG_2016_007 | MT013553 | MT013595 | MT013949 | MT013635 | MT013676 |
| 5 | ARG_2016_008 | MT013554 | MT013596 | MT013950 | MT013636 | MT013677 |
| 6 | ARG_2016_015 | MT013555 | MT013597 | MT013951 | MT013637 | MT013678 |
| 7 | ARG_2016_055 | MT013556 | MT013598 | MT013952 | MT013638 | MT013679 |
| 8 | ARG_2016_080 | MT013557 | MT013599 | MT013953 | MT013639 | MT013680 |
| 9 | ARG_2016_102 | MT013558 | MT013600 | MT013954 | MT013640 | MT013681 |
| 10 | ARG_2016_120 | MT013559 | MT013601 | MT013955 | MT013641 | MT013682 |
| 11 | ARG_2016_133 | MT013560 | MT013602 | MT013956 | MT013642 | MT013683 |
| 12 | ARG_2016_155 | MT013561 | MT013603 | MT013957 | MT013643 | MT013684 |
| 13 | ARG_2016_169 | MT013562 | MT013604 | MT013958 | MT013644 | MT013685 |
| 14 | ARG_2016_199 | MT013563 | MT013605 | MT013959 | MT013645 | MT013686 |
| 15 | ARG_2016_227 | MT013564 | MT013606 | MT013960 | MT013646 | MT013687 |
| 16 | ARG_2016_239 | MT013565 | MT013607 | MT013961 | MT013647 | MT013688 |
| 17 | ARG_2016_277 | MT013566 | MT013608 | MT013962 | MT013648 | MT013689 |
| 18 | ARG_2016_278 | MT013567 | MT013609 | MT013963 | MT013649 | MT013690 |
| 19 | ARG_2016_283 | MT013568 | MT013610 | MT013964 | MT013650 | MT013691 |
| 20 | ARG_2016_314 | MT013569 | MT013611 | MT013965 | MT013651 | MT013692 |
| 21 | ARG_2016_324 | MT013570 | MT013612 | MT013966 | MT013652 | MT013693 |
| 22 | ARG_2016_340 | MT013571 | MT013613 | MT013967 | MT013653 | MT013694 |
| 23 | ARG_2016_349 | MT013572 | MT013614 | MT013968 | MT013654 | MT013695 |
| 24 | ARG_2016_355 | MT013573 | MT013615 | MT013969 | MT013655 | MT013696 |
| 25 | ARG_2016_385 | MT013574 | MT013616 | MT013970 | MT013656 | MT013697 |

| | | | | | | |
|----|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 26 | ARG_2016_394 | MT013575 | MT013617 | MT013971 | MT013657 | MT013698 |
| 27 | ARG_2016_395 | MT013576 | MT013618 | MT013972 | MT013658 | MT013699 |
| 28 | ARG_2016_396 | MT013577 | MT013619 | MT013973 | MT013659 | MT013700 |
| 29 | ARG_2016_401 | MT013578 | MT013620 | MT013974 | MT013660 | MT013701 |
| 30 | ARG_2016_402 | MT013579 | MT013621 | MT013975 | MT013661 | MT013702 |
| 31 | ARG_2016_417 | MT013580 | MT013622 | MT013976 | MT013662 | MT013703 |
| 32 | ARG_2016_421 | MT013581 | MT013623 | MT013977 | MT013663 | MT013704 |
| 33 | BOL_2017_026 | MT013582 | MT013624 | MT013978 | MT013664 | MT013705 |
| 34 | BOL_2017_034 | MT013583 | MT013625 | MT013979 | MT013665 | MT013706 |
| 35 | BOL_2017_035 | MT013584 | MT013626 | MT013980 | MT013666 | MT013707 |
| 36 | ARG_2018_001 | MT013585§ | MT013627§ | MT013981§ | MT013667§ | MT013708§ |
| 37 | ARG_2019_003† | MT013586 | MT013628 | MT013982 | MT013668 | MT013709 |
| 38 | ARG_2019_006† | MT013587 | MT013629 | MT013983 | MT013669 | MT013710 |
| 39 | ARG_2019_011 | MT013588 | MT013630 | MT013984 | MT013670 | MT013711 |
| 40 | ARG_2019_012 | - | - | - | - | - |
| 41 | ARG_2019_013 | - | - | - | - | - |
| 42 | ARG_2019_014 | - | - | - | - | - |
| 43 | ARG_2019_015 | MT013589 | MT013631 | MT013985 | MT013671 | MT013712 |
| 44 | ARG_2019_016 | - | - | - | - | - |
| 45 | ARG_2019_017 | - | - | - | - | - |
| 46 | ARG_2019_018 | - | - | - | - | - |
| 47 | ARG_2019_019 | - | - | - | - | - |
| 48 | ARG_2019_020 | - | - | - | - | - |
| 49 | ARG_2019_029 | - | - | - | - | - |
| 50 | ARG_2019_030 | - | - | - | - | - |
| 51 | ARG_2019_031 | - | - | - | - | - |
| 52 | ARG_2019_032 | - | - | - | - | - |
| 53 | ARG_2019_033 | - | - | - | - | - |
| 54 | ARG_2019_034 | - | - | - | - | - |
| 55 | ARG_2019_035 | - | - | - | - | - |
| 56 | ARG_2019_036 | - | - | - | - | - |

| | | | | | | |
|----|---------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 57 | ARG_2019_037 | - | - | - | - | - |
| 58 | ARG_2019_038 | - | - | - | - | - |
| 59 | ARG_2019_039 | - | - | - | - | - |
| 60 | ARG_2019_040 | - | - | - | - | - |
| 61 | ARG_2019_041 | - | - | - | - | - |
| 62 | ARG_2019_042 | - | - | - | - | - |
| 63 | ARG_2019_043 | - | - | - | - | - |
| 64 | ARG_2019_052 [‡] | MT013590 | - | MT013986 | MT013672 | MT013713 |
| 65 | ARG_2019_057 [‡] | MT013591 | MT013632 | MT013987 | - | MT013714 |

[†] Aislados recuperados desde *Amaranthus hybridus*

[‡] Aislados recuperados desde *Araujia hortorum*

[§] Secuenciación completa del gen

Tabla 4. Números de acceso de GenBank para aislados de *Cercospora* spp. causantes de TH/MPS de Bolivia utilizados en el análisis filogenético molecular. *Loci* secuenciados: calmodulina (*cmdA*), histona 3 (*his3*), factor de elongación de traducción 1- α (*tef1*).

| N° | Identificación de aislado | <i>cmdA</i> | <i>his3</i> | <i>tef1</i> |
|----|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | BOL_2017_001 | MH823938 | - | - |
| 2 | BOL_2017_002 | MH823945 | MH882522 | - |
| 3 | BOL_2017_003 | MH823933 | - | - |
| 4 | BOL_2017_004 | MH823934 | - | - |
| 5 | BOL_2017_005 | MH823921 | MH882520 | MH882525 |
| 6 | BOL_2017_006 | - | - | - |
| 7 | BOL_2017_007 | MH823920 | - | - |
| 8 | BOL_2017_008 | MH823931 | - | - |
| 9 | BOL_2017_009 | MH823942 | - | - |
| 10 | BOL_2017_010 | MH823919 | - | - |
| 11 | BOL_2017_011 | MH823922 | - | - |
| 12 | BOL_2017_012 | MH823923 | - | - |
| 13 | BOL_2017_013 | MH823929 | - | - |
| 14 | BOL_2017_014 | MH823909 | - | - |
| 15 | BOL_2017_015 | MH823924 | - | - |
| 16 | BOL_2017_016 | MH823930 | - | - |
| 17 | BOL_2017_017 | MH823937 | - | - |
| 18 | BOL_2017_018 | MH823940 | - | - |
| 19 | BOL_2017_019 | MH823932 | - | - |
| 20 | BOL_2017_020 | MH823939 | - | - |
| 21 | BOL_2017_021 | MH823925 | - | - |
| 22 | BOL_2017_022 | MH823926 | - | - |
| 23 | BOL_2017_023 | MH823911 | - | - |
| 24 | BOL_2017_024 | MH823915 | - | - |
| 25 | BOL_2017_025 | MH823944 | - | - |
| 26 | BOL_2017_026 | MH823910 | - | - |

| | | | | |
|----|--------------|----------|----------|----------|
| 27 | BOL_2017_027 | MH823941 | MH882518 | - |
| 28 | BOL_2017_028 | MH823943 | - | - |
| 29 | BOL_2017_029 | MH823927 | - | - |
| 30 | BOL_2017_030 | MH823916 | - | - |
| 31 | BOL_2017_031 | MH823928 | - | - |
| 32 | BOL_2017_032 | MH823913 | MH882519 | MH882524 |
| 33 | BOL_2017_033 | MH823914 | - | - |
| 34 | BOL_2017_034 | MH823918 | MH882521 | - |
| 35 | BOL_2017_035 | MH823935 | - | - |
| 36 | BOL_2017_036 | MH823936 | MH882523 | MH882526 |
| 37 | BOL_2017_037 | MH823917 | - | - |
| 38 | BOL_2017_038 | MH823912 | - | - |

2.9.2. Puesta a punto del modelo, análisis filogenético y asignación de especies

Las secuencias se editaron y ensamblaron en contigs con *Geneious* 8.1.3 (<https://www.geneious.com>). Cada locus se alineó utilizando métodos de refinamiento iterativos implementados en *MAFFT* v. 7 (Kuraku et al., 2013; Katoh et al., 2019) con el algoritmo *G-INS-I*, una matriz de puntuación (*scoring matrix*) de 200 PAM/ $k=2$, penalización por gap (*gap penalty*) de 1.53 y compensación (offset) de 0.0. Las alineaciones de locus individuales se concatenaron en una alineación multilocus con datos de estudios previos: los datos de secuencia de los separadores transcritos internos ribosómicos nucleares (*nrITS*), *actA*, *cmdA*, *his3* y *tefl* publicados por Groenewald et al. (2013) junto con datos de *actA*, *cmdA*, *his3*, *tefl* y *gapdh* de Bahkshi et al. (2018) se integraron con los datos generados en este estudio. *Septoria provencialis* CPC_12226 se incluyó como grupo externo (*outgroup*). Las longitudes de alineación final y el número de caracteres informativos de parsimonia (PIC, del inglés: parsimony informative characters) fueron los siguientes: concatenados, 3.354 sitios (626 PIC); *nrITS*, 652 sitios (14 PIC); *actA*, 234 sitios (72 PIC); *cmdA*, 465 sitios (103 PIC); *his3*, 400 sitios (90 PIC); *tefl*, 684 sitios (142 PIC); *gapdh*, 919 sitios (205 PIC). La filogenia de máxima verosimilitud (maximum-likelihood phylogeny) para cada gen y la alineación concatenada se estimaron usando la versión paralela *AVX* de RAxML v. 8.2.12 (Stamatakis, 2014) que especifica el modelo GTR de evolución de nucleótidos y una distribución Γ en la heterogeneidad de velocidad entre sitios. El soporte de bipartición se estimó con 1000 réplicas de arranque (bootstrap replicates) para cada análisis (*mpirun raxmlHPC-MPI-AVX-fa-x 12345 -p 12345 -# 1000 -m GTRGAMMA*). Antes de la inferencia bayesiana (Bayesian inference), el modelo de mejor ajuste de la evolución de nucleótidos y el mejor esquema de partición (best-fit model of nucleotide evolution and best partitioning scheme) entre las alineaciones se estimó en *PartitionFinder 2* (Lanfear et al., 2016) especificando el algoritmo codicioso (*greedy algorithm*) (Lanfear et al., 2012) con longitudes de rama vinculadas y utilizando el criterio de información Akaike corregido (corrected Akaike information criterion) para seleccionar el modelo de mejor ajuste entre el conjunto de modelos considerados para *MrBayes*. Los modelos seleccionados fueron SYM + I + Γ para *nrITS* y GTR + I + Γ para *actA*, *cmdA*, *his3*, *tefl* y *gapdh*. La distribución posterior conjunta (joint posterior distribution) de los valores de los parámetros y las topologías de árbol para el conjunto de datos multilocus particionado y concatenado se estimó en *MrBayes* v. 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) con cuatro repeticiones de la cadena de Markov Monte Carlo (MCMC, Markov chain Monte Carlo), cuatro cadenas acopladas a Metrópolis (Metropolis-coupled chains) por corrida (una fría y tres calentadas) y 2.5 millones de generaciones por corrida con una frecuencia de muestreo de 1000. La convergencia se determinó observando una desviación estándar de frecuencias divididas por debajo de 0.1 y tamaños de muestra efectivos (ESS, effective sample sizes) por encima de 200 para la mayoría de los parámetros, descartando el primer 50% de las muestras como quemado (burn-in). La filogenia de consenso de la regla de la mayoría (majority-rule consensus phylogeny) se calculó utilizando *SumTrees* v. 4.3.0 en *Dendropy* v. 4.3.0 (Sukumaran y Holder, 2010). Las biparticiones con una probabilidad

posterior (posterior probability) igual o superior a 0,85 se mapearon, si estaban presentes, a la filogenia de máxima probabilidad (maximum-likelihood phylogeny) junto con los valores de soporte de arranque de máxima probabilidad (maximum-likelihood bootstrap support values) superiores al 50%. Las asignaciones de especies se basaron en los resultados de los análisis filogenéticos concatenados (concatenated phylogenetic analyses) y las comparaciones con cada análisis filogenético de cada locus individual (single-locus phylogenetic analysis). Para evaluar la sensibilidad de los resultados a los datos faltantes para *gapdh* y *nrITS*, se realizaron análisis filogenéticos que incluían y excluían a *gapdh*, además de incluir y excluir *nrITS* en los análisis concatenados, así como ejecutar múltiples análisis de un solo gen. Hubo una congruencia notable entre los análisis y ningún conflicto fuertemente respaldado, lo que sugiere que los datos faltantes no están afectando los resultados filogenéticos de manera significativa. Todas las alineaciones y árboles filogenéticos se depositaron en Github (<https://github.com/vinsondoyle/SautuaPMS2020>).

2.10. Identificación y comparación de genes de patogenicidad y virulencia en especies fitopatógenas de *Cercospora*

Para buscar grupos de genes ortólogos entre *C. kikuchii* y especies emparentadas, se realizó un análisis de ortólogos con el software OrthoMCL (<http://orthomcl.org>), de manera de delimitar grupos de proteínas en función de la similitud de secuencia. Se incluyeron los genomas (incluyendo el genoma mitocondrial) de las siguientes especies: *C. kikuchii* (CKIK), *C. sojina* razas 1, 11, 15 (CSOJ1, CSOJ11, CSOJ15), *C. flagellaris* (CFLA), *C. sigesbeckiae* (CSIG), *C. nicotianae* (CNIC), *C. beticola* (CBET), *C. brassicicola* (CBRA), *C. zeina* (CZEI), *Ramularia collo-cygni* (RCOL), *Zymoseptoria tritici* (ZTRI), *Ascochyta rabiei* (ARAB) y *Arabidopsis thaliana* (ATHA). Se descargaron los genomas disponibles para cada especie, depositados en el NCBI, se anotaron con FUNGAP y luego se corrió el análisis.

A partir de genes de patogenicidad y virulencia conocidos en otras especies de *Cercospora*, se realizó una búsqueda local con BLAST (Altschul et al., 1990) en los genomas descargados de las siguientes especies: *C. sojina* raza 1 (China), *C. sojina* raza 15 (China), *C. sojina* raza 11 (Argentina), *C. flagellaris*, *C. sigesbeckiae*, *C. nicotianae*, *C. beticola*, *C. brassicicola*, *C. zeina*; de los genes listados en la Tabla 5. Estas secuencias se localizaron en el genoma de referencia de *C. kikuchii* ARG_18_001, y se alinearon con Muscle (Edgar, 2004a,b). Las figuras de los alineamientos se construyeron con Geneious Prime v. 2021.0.3, con la siguiente leyenda para similarity index:

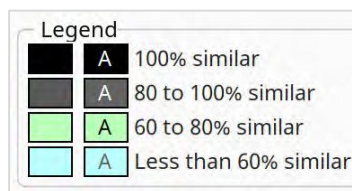


Tabla 5. Genes de patogenicidad/virulencia explorados en especies fitopatógenas de *Cercospora*.

| Grupo o tipo de gen | Locus | Identificado en | Referencia |
|-----------------------|--------------|----------------------------------|--|
| Efectores | AVR4 | <i>C. flagellaris</i> | Santos Rezende et al., 2020 |
| Efectores | Nip1 | <i>C. beticola</i> | Ebert et al., 2021 |
| Efectores | CB0940_10646 | <i>C. beticola</i> | Ebert, 2018 |
| Efectores | Cs_07324 | <i>C. sojina</i> | Calegari Fagundes, 2018 |
| Efectores | NIS1 | <i>Colletotrichum orbiculare</i> | Yoshino et al. 2012; Irieda et al., 2018 |
| Melanina- DHN cluster | CB0940_09636 | <i>C. beticola</i> | Ebert et al., 2019 |
| Melanina- DHN cluster | CB0940_09637 | <i>C. beticola</i> | Ebert et al., 2019 |
| Melanina- DHN cluster | CB0940_09638 | <i>C. beticola</i> | Ebert et al., 2019 |
| Melanina- DHN cluster | CB0940_09639 | <i>C. beticola</i> | Ebert et al., 2019 |
| CTB cluster | CTB1 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | CTB2 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | CTB3 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | CTB4 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | CTB5 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | CTB6 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | CTB7 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | CTB8 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | CTB9 | <i>C. beticola</i> | de Jonge et al., 2018 |
| CTB cluster | CTB10 | <i>C. beticola</i> | de Jonge et al., 2018 |
| CTB cluster | CTB11 | <i>C. beticola</i> | de Jonge et al., 2018 |
| CTB cluster | CTB12 | <i>C. beticola</i> | de Jonge et al., 2018 |
| CTB cluster | CFP | <i>C. kikuchii</i> | Callahan et al., 1999 |
| CTB cluster | ORF9 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | ORF10 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | ORF11 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | ORF12 | <i>C. nicotianae</i> | Chen et al., 2007 |
| CTB cluster | CB0940_00828 | <i>C. beticola</i> | de Jonge et al., 2018 |
| CTB cluster | CB0940_00840 | <i>C. beticola</i> | de Jonge et al., 2018 |
| CTB cluster | CB0940_00846 | <i>C. beticola</i> | de Jonge et al., 2018 |
| CTB cluster | CB0940_00847 | <i>C. beticola</i> | de Jonge et al., 2018 |
| CTB cluster | CB0940_00848 | <i>C. beticola</i> | de Jonge et al., 2018 |
| - | CRG1 | <i>C. nicotianae</i> | Chung et al., 1999; 2003 |

CTB = grupo de genes de biosíntesis de toxina cercosporina; CFP = cercosporin facilitator protein;
DHN = dihidroxinaftaleno melanina

Para poder visualizar la sintenia del cluster CTB entre las especies *C. nicotianae*, *C. beticola*, *C. kikuchii* y *C. sojina* raza 11, se realizó un gráfico con clinker & clustermap.js (Gilchrist y Chooi, 2021).

2.11. Identificación de hospedantes alternativos de *Cercospora* spp.

Durante el muestreo indicado en el apartado 2.1, adicionalmente, con el objetivo de explorar si malezas presentes en los lotes de soja muestreados podrían ser hospedadores alternativos para el

patógeno y, en segundo lugar, explorar la sensibilidad a los fungicidas de los individuos que pudieran estar sobreviviendo en tales plantas, en 2019 se tomaron muestras de hojas sintomáticas (manchas tipo “ojo de rana”) de *Amaranthus hybridus* en borduras de lotes de soja en la localidad de Bragado y hojas asintomáticas de *Araujia hortorum* en zonas urbanas adyacentes en la localidad de San Andrés de Giles, ambas localidades en provincia de Buenos Aires. Posteriormente se procedió a la incubación y aislamiento de acuerdo con los procedimientos indicados anteriormente (apartado 2.1). Los aislados obtenidos fueron incluidos en el análisis filogenético y el análisis de mutaciones que confieren resistencia a fungicidas.

2.12. Desarrollo de método fotográfico para estimar intensidad de TH

Con el objetivo de estimar y monitorear la intensidad de las enfermedades foliares de fin de ciclo (EFC) de la soja, y específicamente la intensidad del TH en epidemias naturales, se desarrolló el siguiente método fotográfico. En dos parcelas experimentales de 13 x 7 m de largo ubicados en la FAUBA, desde el 1 de febrero hasta el 29 de marzo 2018, se tomaron fotografías del canopeo superior, usando la siguiente metodología. Dentro de cada parcela, se seleccionaron al azar 10 puntos de muestreo dentro de las filas, y se marcaron las plantas con precintos para futuras evaluaciones. Luego se tomó una foto en cada punto (del canopeo superior del cultivo) siguiendo un procedimiento fotográfico táctico determinado. El progreso de la enfermedad se registró en cada punto a intervalos de cuatro días, comenzando en el inicio de llenado de granos (R5.1), antes de la aparición de los síntomas y terminando en R6.8, una vez que comenzó la defoliación de la planta. Los síntomas de TH fueron confirmados que estaban causados por *Cercospora* spp. mediante incubaciones en laboratorio de hojas sintomáticas y detección del patógeno. Dos evaluadores independientes tomaron 100 fotos cada uno del canopeo superior usando una cámara de 12 megapíxeles incorporada en un celular Samsung Galaxy S7+. La evaluación se repitió una vez (200 fotos cada evaluador, 400 fotos en total). La incidencia del TH dentro de cada foto se estimó en gabinete como la proporción de folíolos sintomáticos de TH con respecto al total de folíolos visibles en la foto. Los datos fueron ajustados mediante un modelo exponencial utilizando la función *nls()* (determina las estimaciones de mínimos cuadrados no lineales (ponderadas) de los parámetros de un modelo no lineal) del paquete *stats* en el entorno R (R Core Team 2020). Las curvas de progreso de la enfermedad se describieron adecuadamente mediante el modelo exponencial y $= y_0 * e^{rE*t}$.

Para validar el método, se calculó la confiabilidad intra e inter evaluador utilizando el coeficiente de correlación intraclase (ICC) y el coeficiente de correlación de Pearson (r), respectivamente. Para el análisis de confiabilidad entre evaluadores se utilizó la función *cor.test()* (prueba de asociación / correlación entre muestras emparejadas) del paquete *stats* en el entorno R (R Core Team 2020). La prueba se basa en el coeficiente de correlación de Pearson (Nutter et al., 1993).

Para el análisis de confiabilidad intra evaluador se utilizó la función *icc()* (puntaje promedio de correlación intraclase / Average Score Intraclass Correlation) del paquete *irr* en el entorno R (R Core Team 2020). La prueba es una modificación del coeficiente de correlación de Pearson realizada por Fisher (Nutter et al., 1993).

2.13. Evaluación del efecto de la MPS sobre la germinación de la semilla y desarrollo de la plántula de soja y la emergencia de la semilla de soja

Se llevó a cabo un ensayo en invernáculo, donde se sembraron semillas de soja variedad DM4915, con y sin síntomas de MPS, para evaluar el efecto sobre la germinación de la semilla y desarrollo de plántula. Se sembraron 1500 semillas en total, 50% asintomáticas y 50% con manifestación de síntomas de MPS, en 12 bandejas de germinación de telgopor de 42 x 27 cm y con 126 pocillos de 3 x 3 cm cada una (Figura 21). Las semillas fueron cosechadas a partir de un lote de producción de la campaña 2016/2017 ubicado en Roldán, Santa Fe (32.92 S, 60.91 O).

Previo a la siembra en invernáculo, se realizó un test de patología de semillas, para conocer el nivel de infección de *Cercospora* spp. Se utilizó el método de siembra en agar (Figura 20). Con el fin de comparar semillas sintomáticas respecto a semillas asintomáticas y dos medios de cultivo distintos para incubar las semillas, se utilizó un diseño estadístico multifactorial, donde el factor 1 correspondió a “síntomas” con dos niveles: sin y con, y el factor 2 a “medio de cultivo” con dos niveles: agar papa dextrosa (APD) y agar con decocción de hojas de soja (SLDA). Se sembraron en total 400 semillas en cajas de Petri de vidrio de 9 cm de diámetro, asignando al azar 100 semillas por tratamiento, con un total de cuatro tratamientos resultantes de la combinación de niveles de los factores (Tabla 6). Previo a la siembra en agar, se realizó una desinfección superficial de las semillas con la técnica tradicional de inmersión en alcohol al 70% durante 30 segundos, hipoclorito al 1% durante 60 segundos, y dos enjuagues en agua destilada estéril durante 60 segundos cada uno. Se dejó orear las semillas, y luego se procedió a la siembra al azar de 5 semillas por caja de Petri (20 cajas por tratamiento, 80 cajas en total). Todos estos pasos se realizaron bajo esterilidad en cámara de flujo laminar. Las cajas de Petri se incubaron en la cámara de incubación durante 7 días a 25°C±1°C, con un régimen de fotoperiodo de 16 horas de luz cercana al ultravioleta y 8 horas de oscuridad. Las cajas se distribuyeron al azar sobre las bandejas de incubación (diseño completamente aleatorizado, DCA). Luego de la incubación, se observaron las semillas bajo lupa estereoscópica (60x) y bajo microscopio óptico (hasta 400x), para detectar e identificar el crecimiento de las colonias en el medio de cultivo y la esporulación (conidios y conidióforos) de *Cercospora* spp. Por último, se procedió a calcular el porcentaje de infección de MPS, expresado como porcentaje de incidencia: número de semillas con presencia de *Cercospora* spp. sobre el total de semillas incubadas por tratamiento. Los datos se analizaron mediante ANOVA con el software INFOSTAT.

Tabla 6. Diseño experimental del ensayo de patología de semillas indicando el número de cajas de Petri/semillas sembradas en cada tratamiento.

| Medio de cultivo | Síntomas de MPS | |
|------------------|-----------------|--------|
| | No | Si |
| APD | 20/100 | 20/100 |
| AHS | 20/100 | 20/100 |

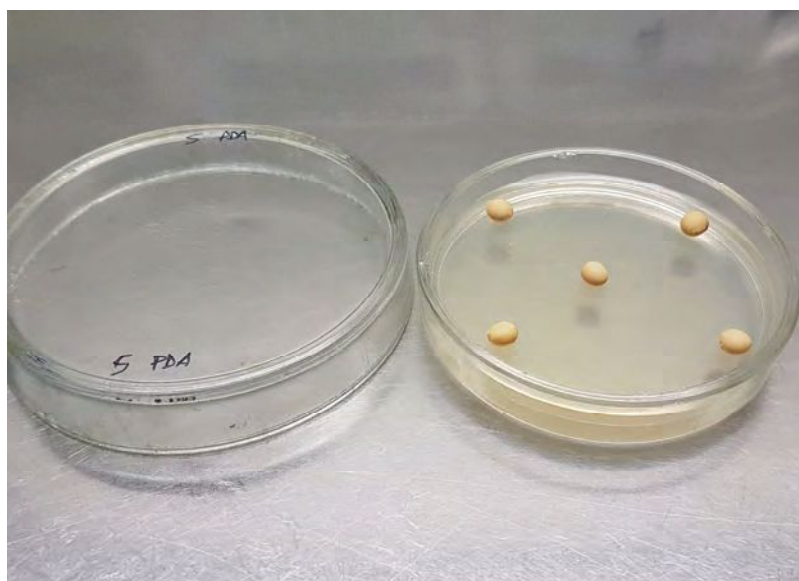


Figura 20. Siembra de semillas asintomáticas en APD para incubación y posterior análisis de patología de semillas (nivel de infección), previo a la siembra en invernáculo.

Luego del análisis de patología de semillas y previo a la siembra en invernáculo, se seleccionaron al azar 750 semillas con síntomas de MPS, y 750 semillas sin síntomas (asintomáticas). Como sustrato de crecimiento, se utilizó en las bandejas de telgopor, “GrowMix Multipro Terrafertil” (turba de musgo *Sphagnum* de fibras medias, perlita, compost de corteza, cal calcita, caldolomita, agentes humectantes, fertilizantes), mezclado con arena en proporción 5 a 1. Tanto el sustrato como la arena fueron previamente tinalizados para garantizar la esterilidad de la mezcla. Todo el experimento se regó en forma diaria con agua destilada estéril. Cuando se alcanzó la emergencia (VE) se procedió a determinar el porcentaje de emergencia logrado, calculado como el número de plantas emergidas (cotiledones por encima de la superficie, totalmente abiertos, plántula erguida, el primer par de hojas

unifoliadas opuestas permanece sin abrir), sobre el total de semillas sembradas. Los resultados de emergencia se analizaron mediante la prueba chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates, usando la función `chisq.test` del paquete MASS en el entorno de R.



Figura 21. Siembra de semillas de soja variedad DM4915 en invernáculo.

3. RESULTADOS

3.1. Obtención e identificación morfológica de aislados de *Cercospora* spp. causantes de TH/MPS

En todos los campos muestreados, de todas las localidades y en todos los años, se encontraron plantas infectadas, manifestando síntomas de TH/MPS con una prevalencia del 100%. Este relevamiento confirma que estas enfermedades están ampliamente distribuidas en todas las regiones productoras de soja de Argentina y Santa Cruz, Bolivia. Los aislados se realizaron a partir de la incubación de muestras principalmente de hojas y semillas sintomáticas (Figuras 22 y 23).





Figura 22. Síntomas foliares de TH muestreados en Bigand, Santa Fe, el 21 de marzo 2016, cuando el cultivo se encontraba en etapas avanzadas de llenado de grano (R6). Autor: Sautua F.



Figura 23. Síntomas foliares de TH muestreados en Santa Cruz Bolivia. Autor: Sautua F

En total se obtuvieron 554 aislados monospóricos de *Cercospora* spp., 516 de Argentina y 38 de Bolivia. En Argentina, los aislados se recolectaron a partir de muestras de diferentes campos ubicados en 67 localidades de nueve provincias diferentes, durante los años 2012 (1), 2014 (1), 2015 (20), 2016 (364), 2017 (67), 2018 (6) y 2019 (57). Se obtuvieron 336 aislados de semillas, 177 de hojas, dos de pedúnculos y uno de vaina, mientras que los 38 aislados bolivianos se obtuvieron de hojas. De los 516 aislados de Argentina, 492 se recolectaron de soja, 10 de *Amaranthus hybridus* y 14 de *Araujia hortorum*. En total, se recolectaron 196 aislados de la región noroeste (NOA) (38%), 241 aislados del centro (C) (47%) y 74 aislados del sureste de la provincia de Buenos Aires (SE) (14%) (puntos GPS verdes, amarillos y naranjas en la Figura 24, respectivamente). Para la selección de aislados para realizar los diferentes experimentos no se incluyeron las regiones noreste (NEA) (2 aislados) y oeste (O) (3 aislados) por no estar representadas en la misma proporción que el resto. Dentro de cada región, los aislados se eligieron al azar. Por otro lado, los 38 aislados bolivianos fueron obtenidos a partir de muestreos de hojas sintomáticas (Figura 25) realizados en el departamento de Santa Cruz en 2017 (Sautua et al., 2019a). En la Tabla 42 del anexo I se detalla la información del origen geográfico, coordenadas GPS de los puntos de muestreo, origen botánico (variedad de soja y órgano muestreado) y año de aislamiento para cada aislado.



Figura 24. Mapa de Argentina indicando los puntos georreferenciados de los cuales se obtuvieron las muestras de soja y sus respectivos aislados. Verde: muestras del NOA (Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero); Amarillo: centro región Pampeana (Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos, norte Buenos Aires); Naranja: sureste Buenos Aires; Rojo: oeste región Pampeana (suroeste Córdoba, San Luis); Negro: NEA (Formosa).

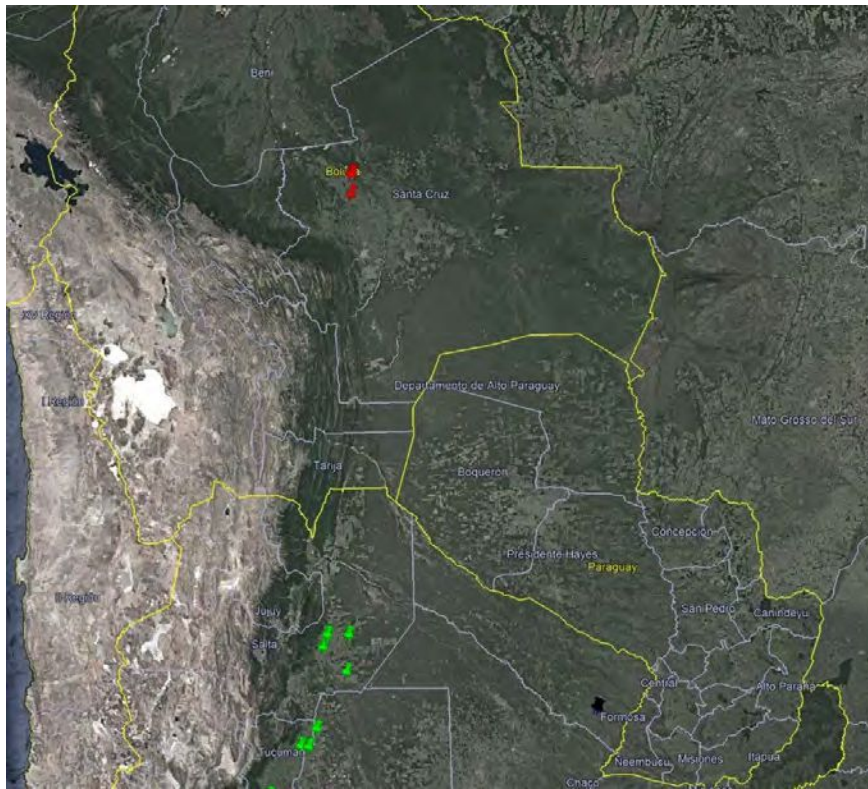


Figura 25. Mapa del sur de Bolivia, indicando los puntos georreferenciados (rojos) de los cuales se obtuvieron las muestras de soja y sus respectivos aislados, en el departamento de Santa Cruz.

La identificación inicial del hongo se realizó estudiando la morfología de los conidios y conidióforos recuperados a partir de la esporulación sobre el material vegetal muestreado e incubado, usando microscopio estereoscópico y óptico (Figuras 26 y 27). Luego, a partir de las características morfológicas de las colonias puras creciendo en APD y de la morfología de conidios y conidióforos producidos en las colonias.



Figura 26. Esporulaci3n abundante de *Cercospora* spp. luego de la incubaci3n en laboratorio de material foliar con sntomas de TH muestreado en Argentina. Las flechas negras indican algunos conidios hialinos individualizados. Autor: Sautua F



Figura 27. Esporulaci3n abundante de *Cercospora* spp. luego de la incubaci3n en laboratorio de material foliar y peciolo con sntomas de TH muestreado en Santa Cruz, Bolivia. Autor: Sautua F.

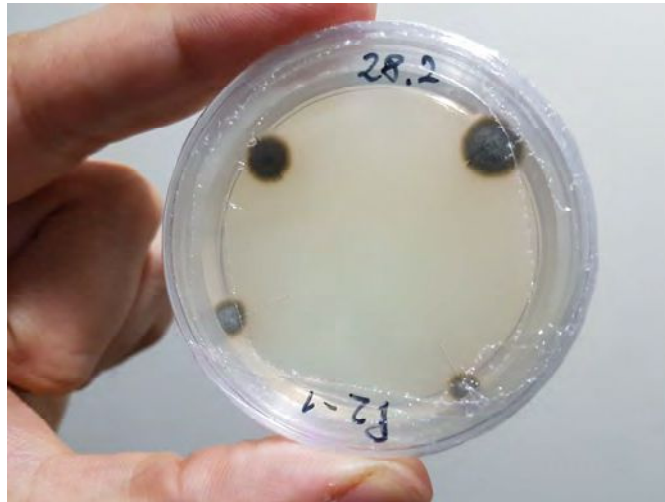


Figura 28. Aislados monospóricos (4) de *Cercospora* spp. creciendo en APD a los 5 días de la incubación de conidios individuales. Autor: Sautua F

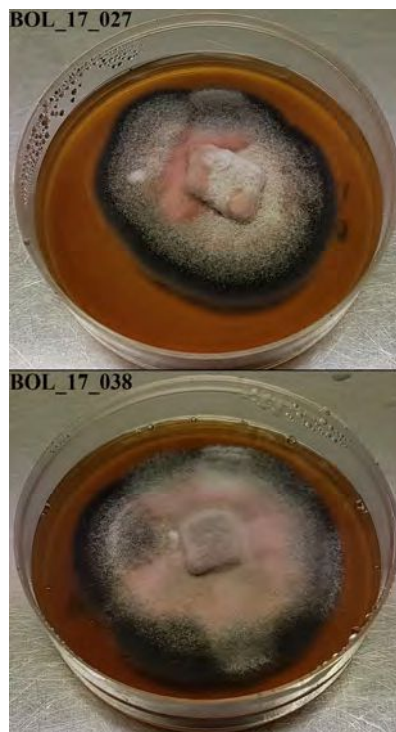


Figura 29. Colonias de aislados bolivianos creciendo en medio SLDA. Autor: Sautua F

Después del aislamiento y la incubación, las colonias monospóricas resultantes se desarrollaron en APD (Figura 28). Éstas fueron variables en morfología, textura, color, producción de cercosporina, etc. Las colonias tuvieron colores variables al crecer en APD, iniciando con negro, luego se tornan gris, luego blanco y luego algunas de color rosado. El color del medio por debajo de la colonia fue oscuro, melanizado, y en algunas cepas de color púrpura oscuro a rojo. En algunas colonias, creciendo tanto en

medio APD como SLDA, se evidenció la producción de cercosporina (colores rosados a púrpuras) (Figura 29). Por razones de espacio se muestran las colonias de solo 50 aislados argentinos y los 38 aislados bolivianos creciendo en medio APD en las Figuras 30 y 31. No se encontró ningún tipo de correlación entre la morfología de las colonias con el origen geográfico ni ninguna otra variable.

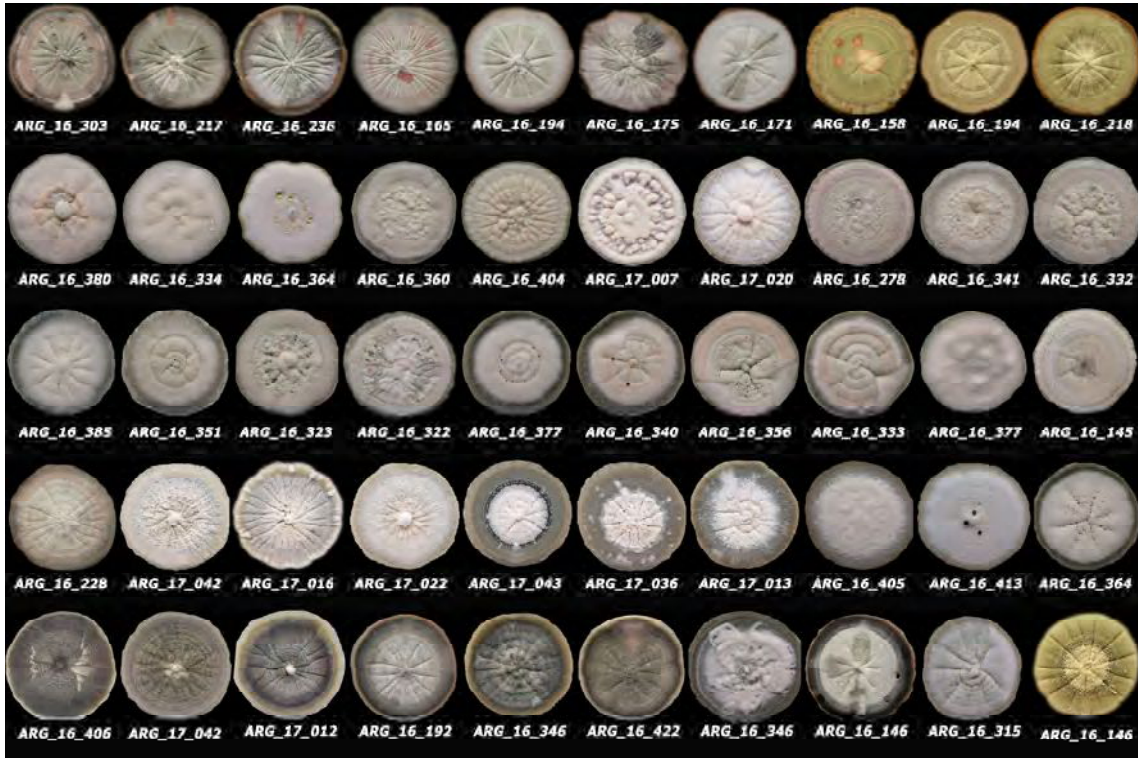


Figura 30. Morfología de 50 colonias de *Cercospora* spp. creciendo en APD, desarrolladas a partir de conidios aislados de muestras de hojas y semillas sintomáticas de TH/MPS de diferentes localidades de la Argentina. La figura incluye, a modo de ejemplo, 50 colonias seleccionadas al azar a partir de los 516 aislados argentinos obtenidos en el presente estudio.



Figura 31. Morfología de 38 colonias de *Cercospora* spp. creciendo en APD, desarrolladas a partir de conidios aislados de muestras de hojas sintomáticas de TH de diferentes localidades de Santa Cruz, Bolivia.

En medio SLDA y en hoja destacada, los aislados produjeron relativamente abundantes conidios a partir de los 5 días de incubación (Figuras 32, 33, 34 y 35). Los conidios fueron hialinos, solitarios, rectos a curvos en forma de aguja, truncados en la base, agudos en la punta, de ancho uniforme, indistintamente septados (Figura 36). En las Figuras 37, 38 y 39 se observan fotografías con microscopio electrónico de conidios y conidióforos a partir de esporulación sobre hojas de soja recolectadas en el campo e incubadas en el laboratorio.

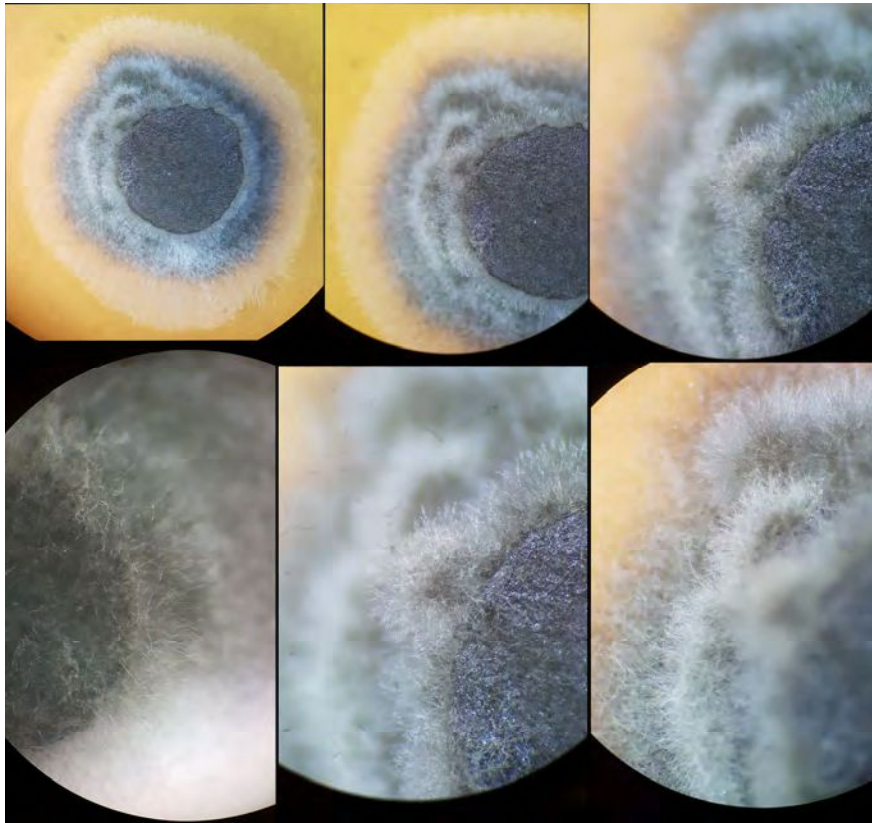


Figura 32. Esporulación abundante de *Cercospora* spp., aislado ARG_16_324 en medio SLDA.

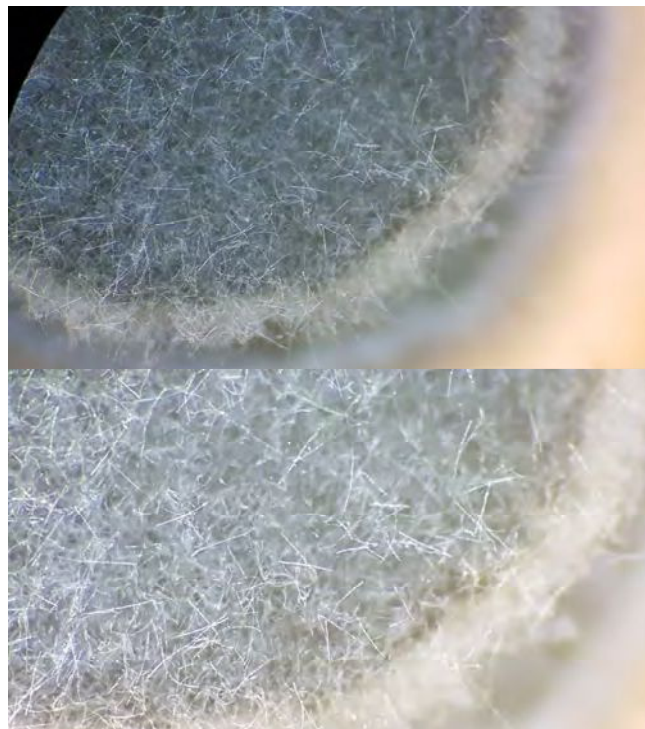


Figura 33. Esporulación de *Cercospora* spp., aislado ARG_16_133, en medio SLDA, donde se observan conidios.

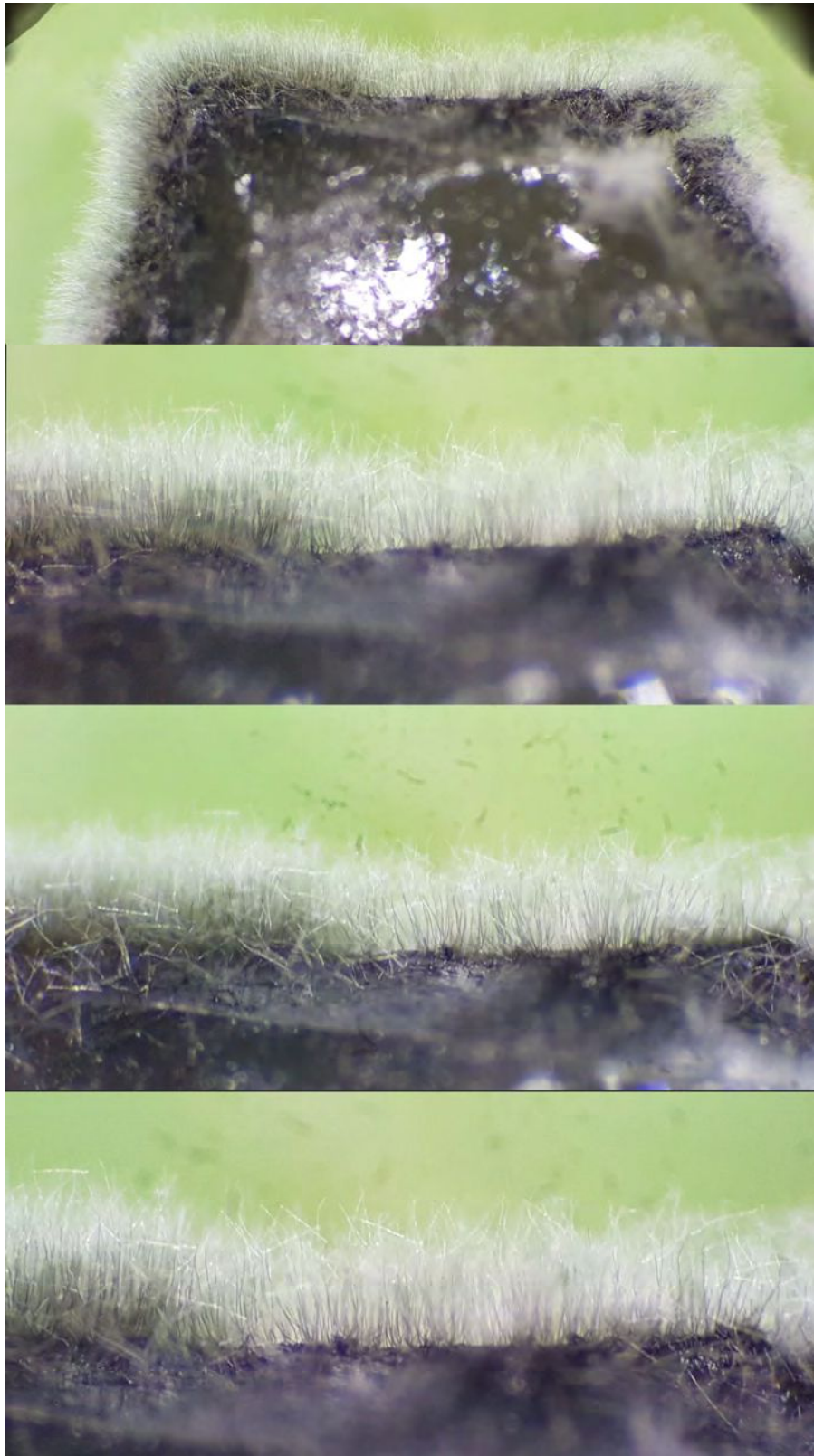


Figura 34. Esporulaci3n abundante de *Cercospora* spp., aislado ARG_17_023, en hoja destacada.

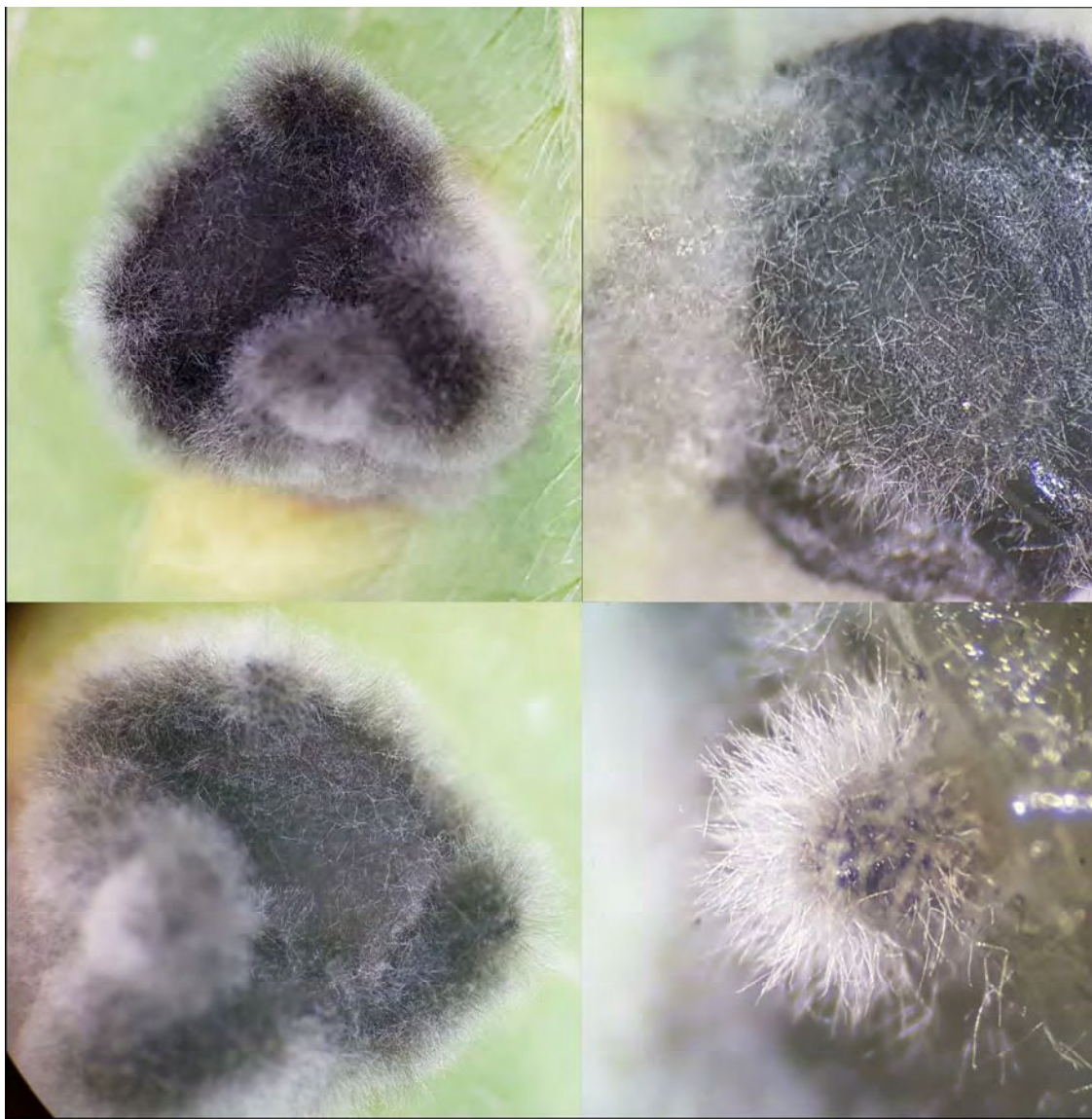


Figura 35. Esporulaci3n abundante de *Cercospora* spp., aislado ARG_17_026, en hoja destacada.

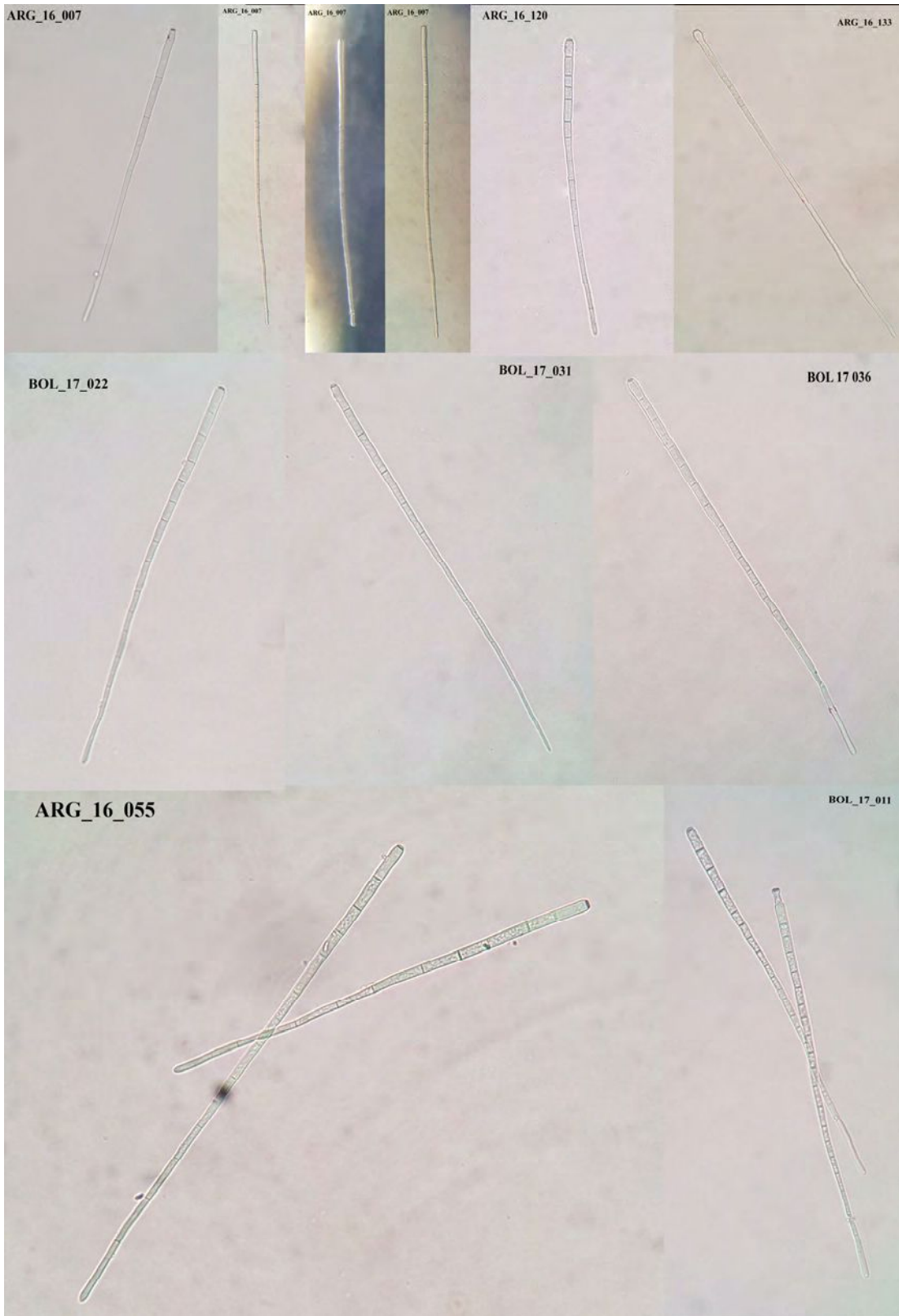


Figura 36. Conidios de *Cercospora* spp.

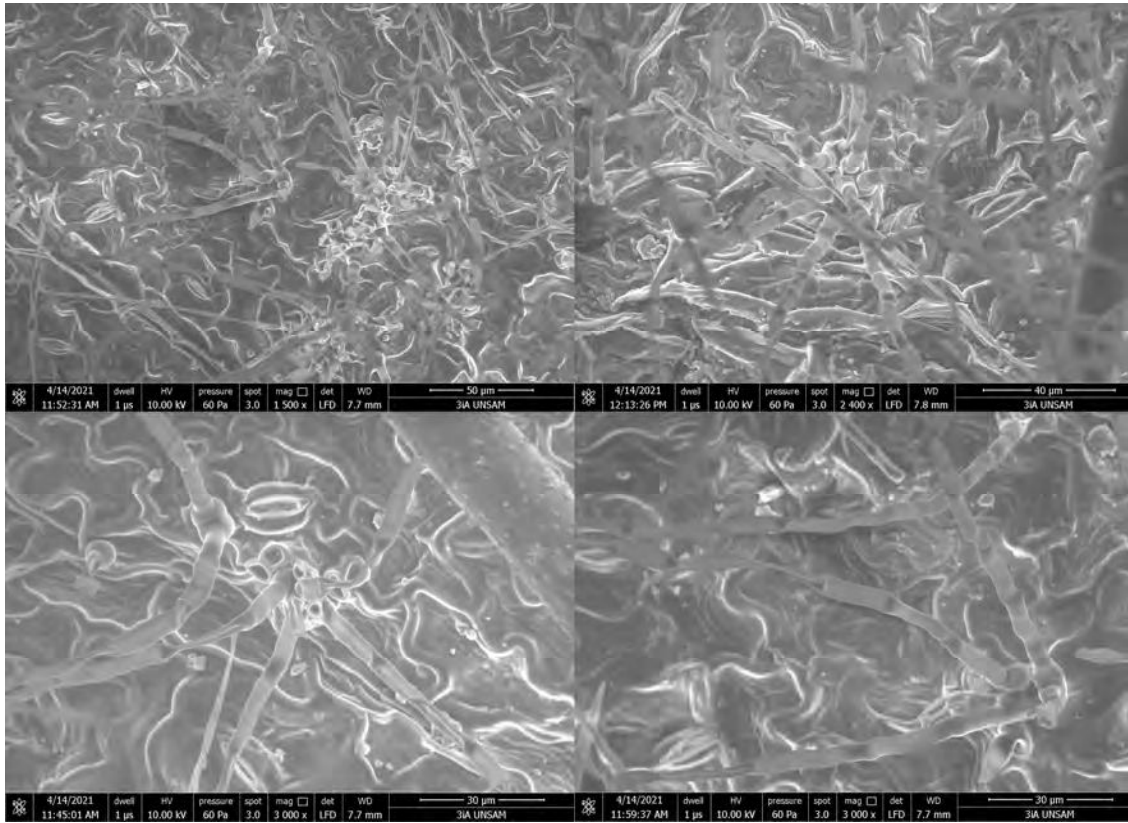


Figura 37. Micrografía con microscopía electrónica de barrido de conidióforos de *C. kikuchii*, creciendo en hoja de soja variedad NS4309, recolectadas en Piamonte, Santa Fe, el 24/03/2021.

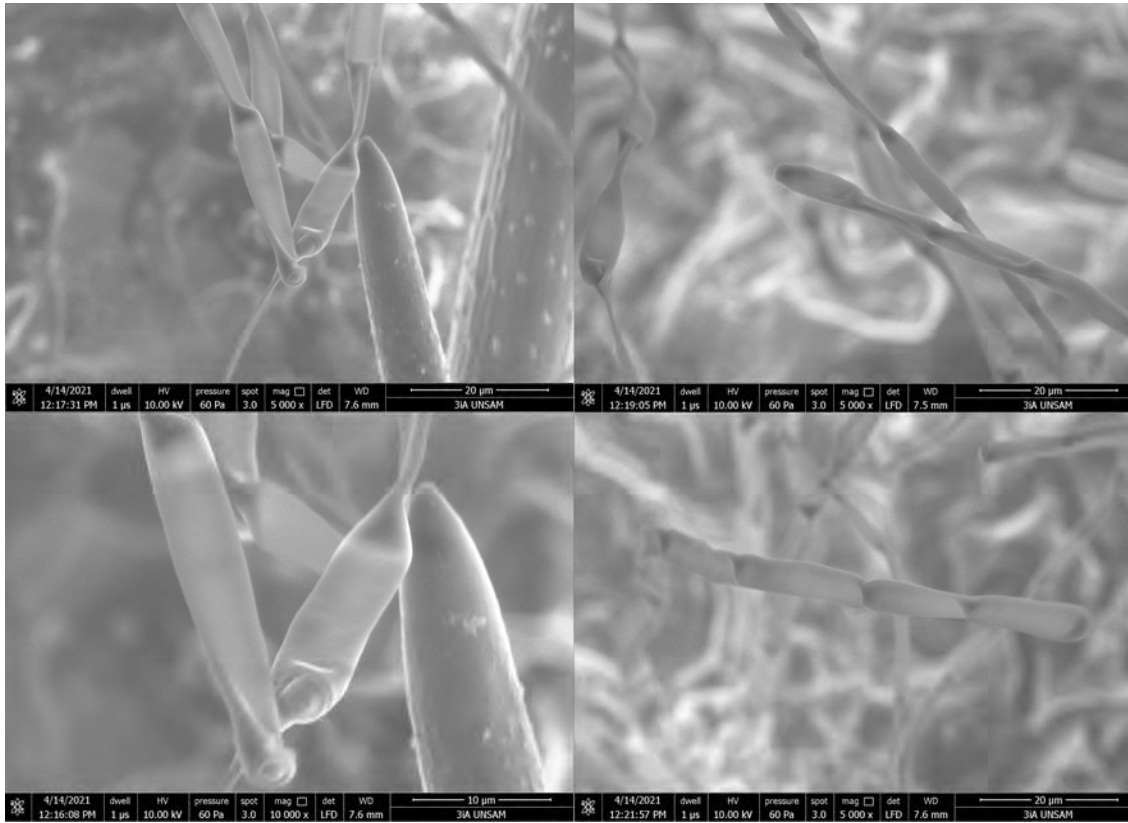


Figura 38. Micrografía con microscopía electrónica de barrido de conidios de *C. kikuchii*, creciendo en hoja de soja variedad NS4309, recolectadas en Piamonte, Santa Fe el 24/03/2021.

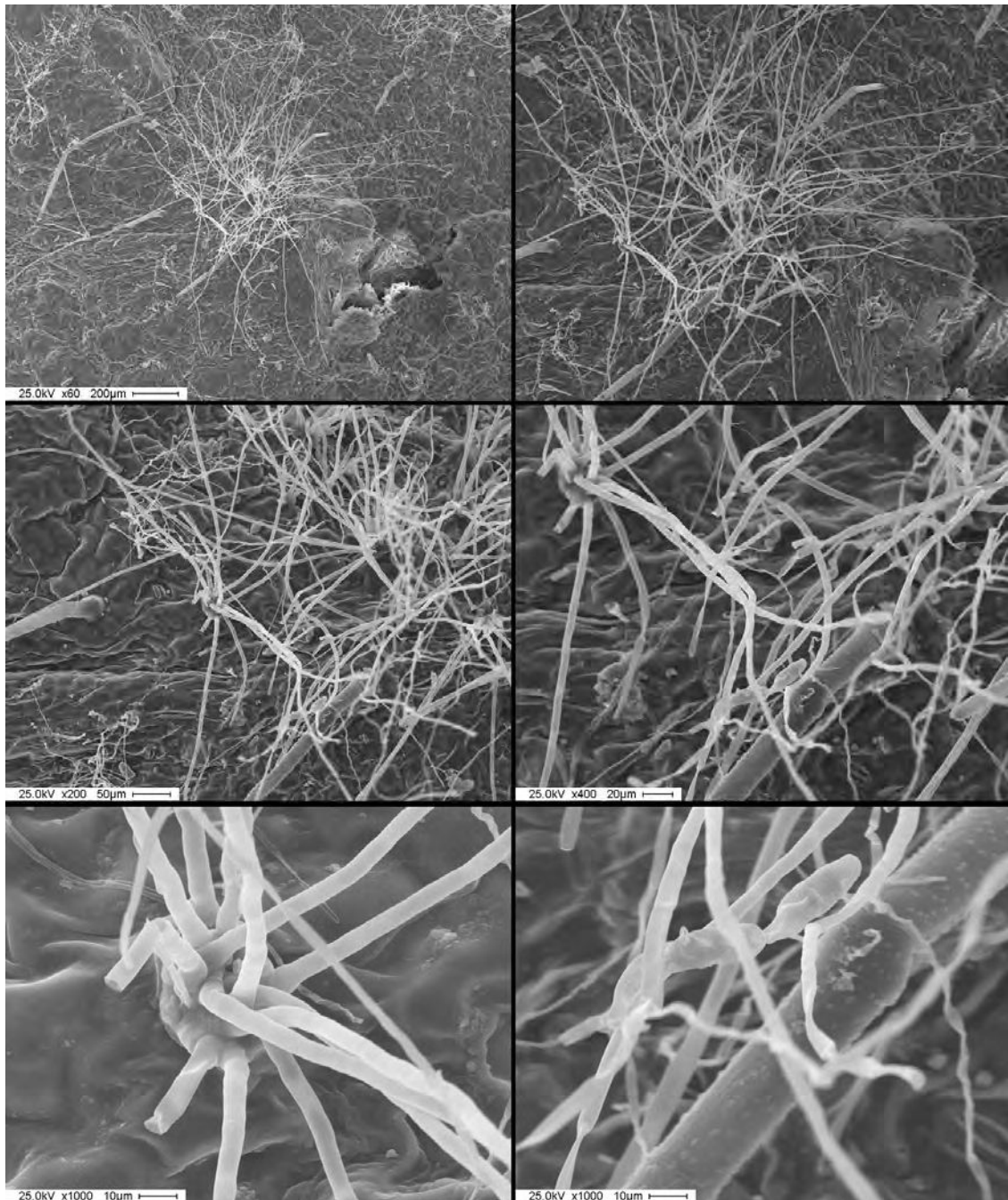


Figura 39. Micrografía con microscopía electrónica de barrido de conidios sobre conidióforos libres de *C. kikuchii*, creciendo en hoja de soja variedad DM4614, recolectadas en Bigand, Santa Fe, el 10/03/2021

A partir de los conidios obtenidos, utilizando un ocular graduado a 40x, en total se midieron 680 conidios, 471 de 21 aislados argentinos y 209 de 21 aislados bolivianos (Tabla 7). Se determinó que el tamaño promedio de los conidios estuvo en el rango de (58.0-) 175.4 (-446.0) x (1.6-) 3.9 (-4.0) μm , con (4-) 15 (-25) tabiques. Los conidióforos se formaron en fascículos y fueron de color marrón oscuro, paredes gruesas, solitarios, rectos o geniculados, de ancho uniforme, multi-septados y geniculados, sin

ramificaciones, de tamaño comprendido entre (135.8-) 199.2 (-372.3) x (2.5-) 4.3 (-5.5) μm con (5-) 16 (-26) septos. Los conidios y conidióforos producidos por las cepas bolivianas tuvieron la misma morfología, y en promedio para 209 conidios de 21 aislados tuvieron un tamaño de (62.0-) 150.6 (-320.0) x (2.0-) 3.8 (-4.6) μm con (3-) 12 (-21) tabiques; ,mientras que los conidióforos tuvieron un tamaño comprendido entre (133.0-) 171.2 (-305.2) x (2.6-) 4.2 (-5.1) μm con (4-) 13 (-24) septos.

Tabla 7. Tamaño promedio de conidios para una muestra de aislados argentinos y bolivianos.

| | N° de aislados | N° de conidios | Largo | | | Ancho | | | Tabiques | | |
|--------------------------|----------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|----------|-----|-----|
| | | | min | med | max | min | med | max | min | med | max |
| Argentinos | 21 | 471 | 58.0 | 175.4 | 446.0 | 1.6 | 3.9 | 4.0 | 4 | 15 | 25 |
| Bolivianos | 21 | 209 | 62.0 | 150.6 | 320.0 | 2.0 | 3.8 | 4.6 | 3 | 12 | 21 |
| <i>C. kikuchii</i> | 4 | 33 | 90 | 192 | 320 | 2.6 | 3.9 | 4 | 3 | 13 | 23 |
| <i>C. cf. nicotianae</i> | 11 | 113 | 62 | 142 | 260 | 2 | 3.8 | 4.6 | 2 | 11 | 20 |
| <i>C. sp. "P"</i> | 7 | 72 | 68 | 143 | 292 | 2 | 3.7 | 4 | 4 | 14 | 20 |

Para dos submuestras de 50 conidios y conidióforos de Argentina y Bolivia, si bien el ancho de conidióforo es la variable que más discriminó entre poblaciones de Argentina y Bolivia, no se observaron diferencias importantes en la morfología de conidios y conidióforos entre ambas poblaciones (Tabla 8). El ancho de conidio parecería ser constante en los aislados bajo estudio con prácticamente variación nula, lo que sugiere que esta variable morfológica se encuentra bajo un control genético. El número de septos de los conidios correlacionó con el largo, pero no sucedió lo mismo con los conidióforos (Tabla 9 y Figura 40).

Tabla 8. Tamaño promedio de conidios para una muestra de 50 aislados argentinos y 50 bolivianos.

| | Argentina | | | Bolivia | | |
|--------------------|----------------|--------|-------|----------------|--------|-------|
| | Variable | Media | D.E. | Variable | Media | D.E. |
| Conidióforo | largo | 202.36 | 39.53 | largo | 194.6 | 36.22 |
| | ancho | 16.42 | 5.08 | ancho | 4.1 | 1.45 |
| | septos | 16.88 | 6.43 | septos | 14.8 | 4.64 |
| Conidio | largoidio | 176.1 | 75.53 | largoidio | 158.31 | 65.96 |
| | anchoidio | 4 | 0 | anchoidio | 3.78 | 0.57 |
| | septosidio | 13.66 | 4.28 | septosidio | 12.16 | 3.16 |
| Discrim | Eje Canónico 1 | 1.67 | 1.33 | Eje Canónico 1 | -1.7 | 0.46 |
| PCA | CP 1 | 0.54 | 1.48 | CP 1 | -0.56 | 1.18 |
| | CP 2 | 0.34 | 1.21 | CP 2 | -0.35 | 1.01 |

Tabla 9. Correlación de Pearson para los parámetros morfológicos bajo estudio.

| | Conidióforo | | | Conidio | | | EC 1 | CP 1 | CP 2 | |
|-------------|-------------|-------|--------|----------|-------|--------|------|----------|----------|----------|
| | Largo | Ancho | Septos | Largo | Ancho | Septos | | | | |
| Conidióforo | Largo | 1 | 0.29 | 1.90E-03 | 0.14 | 0.6 | 0.33 | 0.27 | 3.00E-03 | 0 |
| | Ancho | 0.11 | 1 | 0.05 | 0.42 | 0.02 | 0.16 | 0 | 2.30E-04 | 2.20E-04 |
| | Septos | 0.31 | 0.19 | 1 | 0.99 | 0.69 | 0.51 | 0.03 | 0.06 | 0 |
| Conidio | Largo | 0.15 | 0.08 | 1.40E-03 | 1 | 0.06 | 0 | 0.15 | 0 | 0.01 |
| | Ancho | -0.05 | 0.24 | -0.04 | 0.19 | 1 | 0.07 | 1.90E-03 | 1.40E-04 | 0.06 |
| | Septos | 0.1 | 0.14 | 0.07 | 0.9 | 0.18 | 1 | 0.01 | 0 | 0.05 |
| EC 1 | 0.11 | 0.99 | 0.22 | 0.15 | 0.31 | 0.26 | 1 | 4.10E-06 | 5.00E-04 | |
| CP 1 | 0.29 | 0.36 | 0.19 | 0.91 | 0.37 | 0.92 | 0.44 | 1 | 1 | |
| CP 2 | 0.67 | 0.36 | 0.79 | -0.25 | -0.19 | -0.2 | 0.34 | 0 | 1 | |

EC = eje canónico

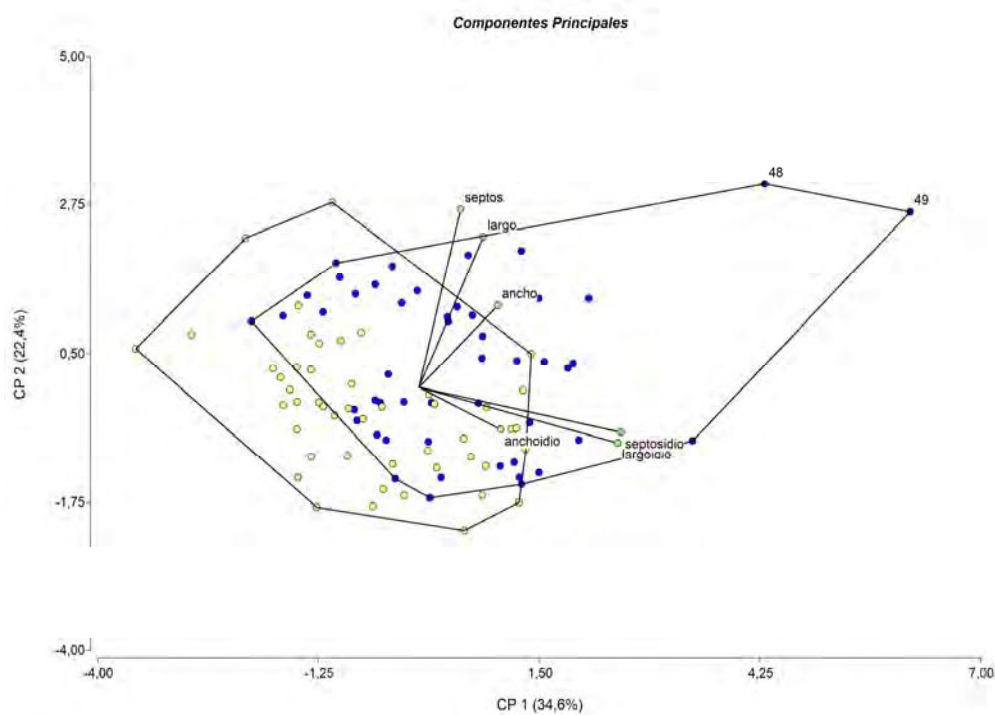


Figura 40. Análisis de componentes principales para mediciones de largo, ancho y septos de 50 conidios (largoidio, anchoidio, septosidio) y conidióforos (largo, ancho, septos) de Argentina (azul) y Bolivia (amarillo).

Los aislados se conservaron con tres métodos diferentes: a) micelio en crioviales con agua destilada estéril a 4°C, b) micelio en tubos de ensayo con APD inclinados (técnica “pico de flauta” o slunts), cubierto con aceite mineral estéril, a temperatura ambiente (Figura 41), y c) en agua destilada estéril con glicerol al 20% a -40°C. Todos los aislados se depositaron en la colección de cultivos fúngicos de la cátedra de Fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA, Argentina), y se encuentran disponibles para futuros estudios.



Figura 41. Ejemplo de aislados conservados en tubos de ensayo con APD en forma de “pico de flauta” o slunts, a temperatura ambiente. El aislado de la izquierda produjo cercosporina y el de la derecha no.

Del total de aislados (554), se seleccionaron al azar para realizar diferentes estudios desarrollados en la presente tesis, por un lado 62 aislados argentinos para estudiar la población argentina (Tabla 10) y, por otro lado, se utilizó el total de 38 aislados bolivianos para estudiar la población boliviana (Tabla 11). De los aislados argentinos seleccionados, se eligió una submuestra de 42 aislados para realizar un análisis filogenético.

Tabla 10. Información del año, origen botánico y geográfico de los aislados argentinos seleccionados para ser evaluados en el presente estudio.

| Nº | Identificación aislado | Año de aislamiento | Especie hospedante | Variiedad de soja | Órgano muestreado | País | Provincia | Localidad | Coordenadas GPS del punto de muestreo |
|----|------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------|--------------|---------------|---------------------------------------|
| 1 | ARG_2014_001 | 2014 | <i>Glycine max</i> | DM 4670 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Pergamino | -33.9501, -60.5688 |
| 2 | ARG_2016_004 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4619 iPRO | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.4201, -61.1849 |
| 3 | ARG_2016_005 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4619 iPRO | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.4199, -61.1845 |
| 4 | ARG_2016_007 | 2016 | <i>Glycine max</i> | FN 4.5 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.4200, -61.1851 |
| 5 | ARG_2016_008 | 2016 | <i>Glycine max</i> | LT 4914 iPRO | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.4222, -61.1836 |
| 6 | ARG_2016_015 | 2016 | <i>Glycine max</i> | LDC 3.7 | hoja | Argentina | Buenos Aires | Herrera Vegas | -36.1357, -61.5169 |
| 7 | ARG_2016_055 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4612 | hoja | Argentina | Buenos Aires | Pergamino | -33.7756, -60.7035 |
| 8 | ARG_2016_080 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 3810 | hoja | Argentina | Buenos Aires | América | -35.6324, -62.8193 |
| 9 | ARG_2016_102 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 6909 iPRO | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas | -24.7823, -63.7352 |
| 10 | ARG_2016_120 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 6248 RG | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas | -24.7823, -63.7351 |
| 11 | ARG_2016_133 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 5909 RG | semilla | Argentina | Salta | Olleros | -24.9999, -64.2622 |
| 12 | ARG_2016_155 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 8277 iPRO STS | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas | -24.7733, -64.1637 |
| 13 | ARG_2016_169 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 6161 iPRO STS | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas | -24.7758, -64.1641 |
| 14 | ARG_2016_199 | 2016 | <i>Glycine max</i> | Yanasu | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Palomar | -26.8524, -64.6991 |
| 15 | ARG_2016_227 | 2016 | <i>Glycine max</i> | CZ 6505 B | semilla | Argentina | Tucumán | San Agustín | -26.8356, -64.8588 |
| 16 | ARG_2016_239 | 2016 | <i>Glycine max</i> | Tarpusqa | semilla | Argentina | Tucumán | San Agustín | -26.8361, -64.8592 |
| 17 | ARG_2016_277 | 2016 | <i>Glycine max</i> | RA 5715 iPRO | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Garmendia | -26.5116, -64.4988 |
| 18 | ARG_2016_278 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 6262 iPRO RSF | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Garmendia | -26.5116, -64.4993 |
| 19 | ARG_2016_283 | 2016 | <i>Glycine max</i> | MS 6.9 iPRO | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Garmendia | -26.5117, -64.5002 |
| 20 | ARG_2016_314 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4612 | semilla | Argentina | Córdoba | Marcos Juárez | -32.7024, -62.0706 |
| 21 | ARG_2016_324 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4214 STS | semilla | Argentina | Buenos Aires | Tandil | -37.1893, -59.4009 |
| 22 | ARG_2016_340 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 3070 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Energía | -38.6177, -59.0292 |
| 23 | ARG_2016_349 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4210 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Pieres | -38.3698, -58.6278 |
| 24 | ARG_2016_355 | 2016 | <i>Glycine max</i> | LDC 3.7 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Tandil | -37.5003, -59.0477 |
| 25 | ARG_2016_385 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4214 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Azul | -37.0691, -59.5771 |
| 26 | ARG_2016_394 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4712 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Otamendi | -38.0329, -57.8798 |
| 27 | ARG_2016_395 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 3302 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Miramar | -38.1905, -57.9268 |

| | | | | | | | | | |
|----|--------------|------|----------------------------|------------------|---------|-----------|--------------|-----------------|--------------------|
| 28 | ARG_2016_396 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 3810 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Gral. Madariaga | -37.0059, -57.0181 |
| 29 | ARG_2016_401 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NA 4413 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Balcarce | -38.0049, -58.0626 |
| 30 | ARG_2016_402 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 4619 iPRO STS | semilla | Argentina | Buenos Aires | Chapadmalal | -38.1332, -57.6651 |
| 31 | ARG_2016_417 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 5419 iPRO | semilla | Argentina | Buenos Aires | Arrecifes | -34.5881, -60.9381 |
| 32 | ARG_2016_421 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 7709 iPRO STS | semilla | Argentina | Entre Ríos | La Paz | -30.7611, -59.4828 |
| 33 | BOL_2017_026 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | Santa Cruz | -16.8495, -63.4394 |
| 34 | BOL_2017_034 | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | Santa Cruz | -16.4696, -63.4443 |
| 35 | BOL_2017_035 | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | Santa Cruz | -16.4771, 63.4246 |
| 36 | ARG_2018_001 | 2018 | <i>Glycine max</i> | DM 62R63 STS RSF | semilla | Argentina | Buenos Aires | San Pedro | -33.6573, -59.8267 |
| 37 | ARG_2019_003 | 2019 | <i>Amaranthus hybridus</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 38 | ARG_2019_006 | 2019 | <i>Amaranthus hybridus</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 39 | ARG_2019_011 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 40 | ARG_2019_012 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 41 | ARG_2019_013 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 42 | ARG_2019_014 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 43 | ARG_2019_015 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 44 | ARG_2019_016 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 45 | ARG_2019_017 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 46 | ARG_2019_018 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 47 | ARG_2019_019 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 48 | ARG_2019_020 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 49 | ARG_2019_029 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 50 | ARG_2019_030 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 51 | ARG_2019_031 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 52 | ARG_2019_032 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 53 | ARG_2019_033 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 54 | ARG_2019_034 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 55 | ARG_2019_035 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 56 | ARG_2019_036 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 57 | ARG_2019_037 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 58 | ARG_2019_038 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |

| | | | | | | | | | |
|----|--------------|------|-------------------------|---------|------|-----------|--------------|---------------------|--------------------|
| 59 | ARG_2019_039 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 60 | ARG_2019_040 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 61 | ARG_2019_041 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 62 | ARG_2019_042 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 63 | ARG_2019_043 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 64 | ARG_2019_052 | 2019 | <i>Araujia hortorum</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | San Andrés de Giles | -34.4617, -59.4429 |
| 65 | ARG_2019_057 | 2019 | <i>Araujia hortorum</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | San Andrés de Giles | -34.4617, -59.4429 |

Tabla 11. Información del año, origen botánico y geográfico de los aislados bolivianos evaluados en el presente estudio.

| Nº | Identificación de aislado | Año de aislamiento | Especie hospedante | Variedad de soja | Órgano muestreado | País | Localidad | Coordenadas GPS del punto de muestreo |
|----|---------------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|---------|------------|---------------------------------------|
| 1 | BOL_2017_001 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 2 | BOL_2017_002 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 3 | BOL_2017_003 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 4 | BOL_2017_004 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 5 | BOL_2017_005 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 6 | BOL_2017_006 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 7 | BOL_2017_007 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 8 | BOL_2017_008 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 9 | BOL_2017_009 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 10 | BOL_2017_010 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 11 | BOL_2017_011 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 12 | BOL_2017_012 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 13 | BOL_2017_013 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 14 | BOL_2017_014 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 15 | BOL_2017_015 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |

| | | | | | | | | |
|----|--------------|------|--------------------|---------------|------|---------|------------|--------------------|
| 16 | BOL_2017_016 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 17 | BOL_2017_017 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 18 | BOL_2017_018 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 19 | BOL_2017_019 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 20 | BOL_2017_020 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 21 | BOL_2017_021 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 22 | BOL_2017_022 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 23 | BOL_2017_023 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 24 | BOL_2017_024 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 25 | BOL_2017_025 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 26 | BOL_2017_026 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 27 | BOL_2017_027 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 28 | BOL_2017_028 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 29 | BOL_2017_029 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 30 | BOL_2017_030 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.8494, -63.4394 |
| 31 | BOL_2017_031 | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.4696, -63.4443 |
| 32 | BOL_2017_032 | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.4696, -63.4443 |
| 33 | BOL_2017_033 | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.4696, -63.4443 |
| 34 | BOL_2017_034 | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.4696, -63.4443 |
| 35 | BOL_2017_035 | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.477, -63.4246 |
| 36 | BOL_2017_036 | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.477, -63.4246 |
| 37 | BOL_2017_037 | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.477, -63.4246 |
| 38 | BOL_2017_038 | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | -16.477, -63.4246 |

3.2. Pruebas de patogenicidad

En las pruebas de patogenicidad en hoja destacada, todos los aislados infectaron las hojas causando clorosis y necrosis (tizón) (Figuras 42 y 43). Los resultados se reprodujeron en ambas repeticiones del experimento para todos los aislados.

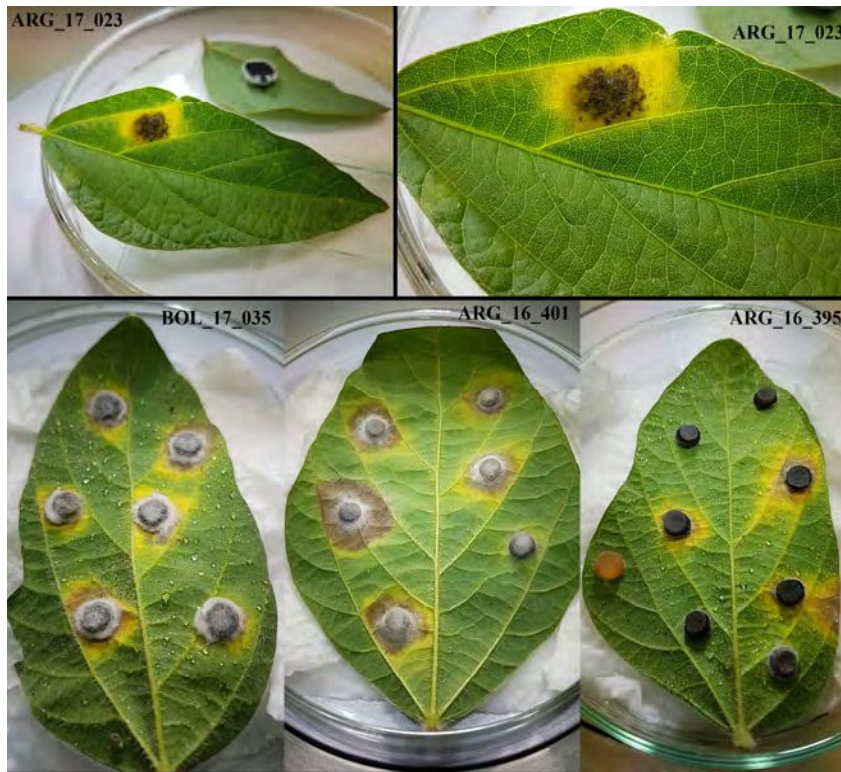


Figura 42. Ejemplo de prueba de patogenicidad en hoja destacada, con 5 a 7 días de incubación.



Figura 43. Ejemplo de prueba de patogenicidad en hoja destacada. Los números indicados en cada foto corresponden al número de aislamiento del 2017 de Argentina, por ej.: 13 = ARG_17_013. Para cada aislamiento, la primer foto corresponde a los 7 días de incubación y la segunda a los 14 días de incubación.

En las pruebas de patogenicidad en invernáculo todas las variedades de soja inoculadas se infectaron y mostraron síntomas de TH (Figuras 44 a 47). La incidencia de la enfermedad en plantas inoculadas fue del 100%. No hubo respuesta diferencial entre los cultivares, es decir, todos fueron susceptibles por igual. Los controles negativos fueron asintomáticos. La observación visual de los síntomas se realizó diariamente hasta que las plantas alcanzaron la madurez fisiológica. Las hojas sintomáticas se incubaron en cámara húmeda como se describió anteriormente. Las lesiones extirpadas se examinaron microscópicamente para identificar y medir conidios y conidióforos confirmando que *Cercospora* spp. fue el agente causal. Los aislados se recuperaron de todas las variedades de soja evaluadas y las colonias de los aislados recuperados fueron idénticos o similares al inóculo original en APD, completando los postulados de Koch. Los resultados se reprodujeron en ambas repeticiones del experimento para todos los aislados.



Figura 44. Síntomas iniciales de TH a los 9 días post incubación de variedad DM4612 con aislados bolivianos del grupo *C. sp.* "P".



Figura 45. Síntomas iniciales de TH a los 15 días post incubación de variedad DM4915 con aislado argentino.

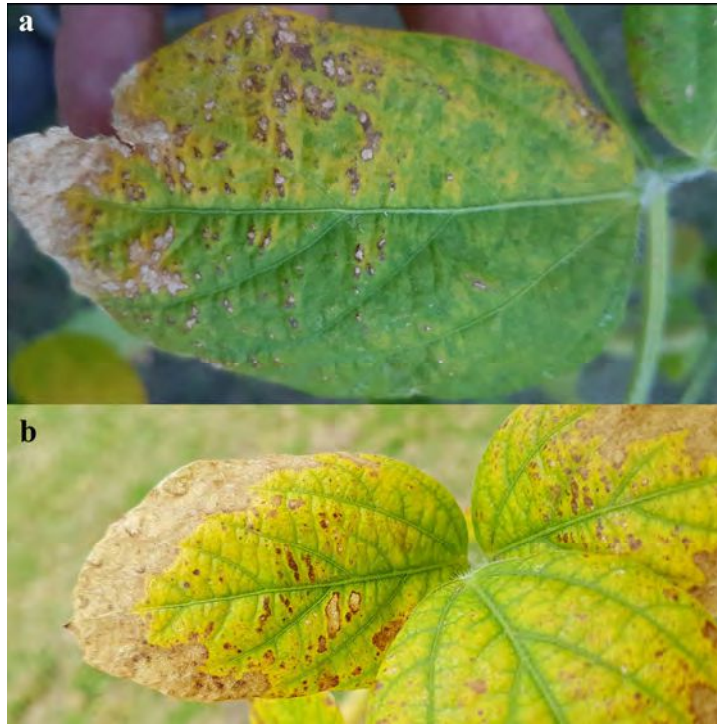


Figura 46. Síntomas de TH a los 23 y 30 días post incubación (a y b, respectivamente) de variedad DM4670 con aislado boliviano del grupo *C. sp. "P"*.



Figura 47. Síntomas de TH a los 26 días post incubación de variedad DM4612 con aislado argentino.

3.3. Identificación de nuevos síntomas de tizón foliar causado por *Cercospora* spp.

A partir de muestras de hojas de soja variedad DM4915 que desplegaban síntomas extremadamente similares a los de la MM de la soja, causada por *Septoria glycines* (Figuras 48 y 49), muestreadas en el tercio superior del canopeo de un lote de soja en Roldán, Santa Fe, en 2017, se detectó luego de la incubación en cámara húmeda tradicional, la presencia de *Cercospora* spp. en un 100% de las muestras incubadas y ausencia de *S. glycines* (Figura 50 y 51). Se observaron los típicos conidios en conidióforos libres de *Cercospora* spp. en el lugar exacto de las manchas (Figuras 52 y 53). En total se realizaron 58 aislados de *Cercospora* spp. a partir de estos conidios (Figura 54). Con los aislados obtenidos se realizaron las pruebas de patogenicidad y se confirmaron los síntomas denominados “tipo Septoria”, por su grado de similitud con los síntomas de la Mancha Marrón.

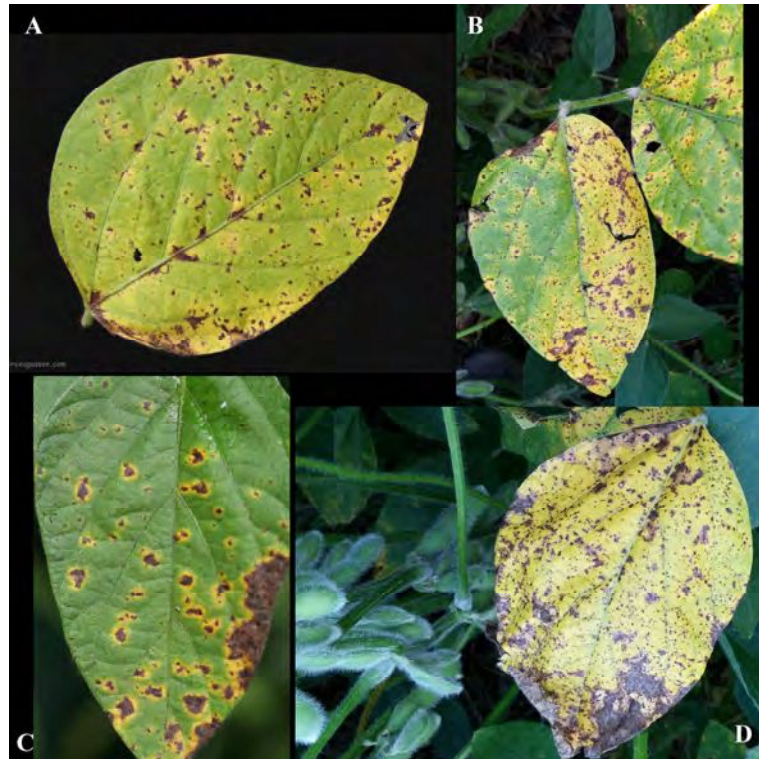


Figura 48. Síntomas foliares de la Mancha Marrón, causada por *Septoria glycines* en las hojas inferiores (tercio inferior) de soja. Autores: a) Dirceu Gassen, b) Francisco Sautua, c) Daren Mueller, Iowa State University, d) Francisco Sautua.



Figura 49. Síntomas de mancha marrón de la soja en el tercio inferior del canopeo. Autor: Daren Mueller, Iowa State University.



Figura 50. Síntomas foliares de manchas “tipo *Septoria*” causadas por *Cercospora* spp. en las hojas superiores (tercio superior) de un cultivo de soja DM4915 ubicado en Roldán, Santa Fe, muestreadas en 2017. Autor: Francisco Sautua.



Figura 51. Síntomas foliares de manchas “tipo Septoria” causadas por *Cercospora* spp. en las hojas superiores (tercio superior) de un cultivo de soja DM4915 ubicado en Roldán, Santa Fe, muestreadas en 2017. Autor: Francisco Sautua.

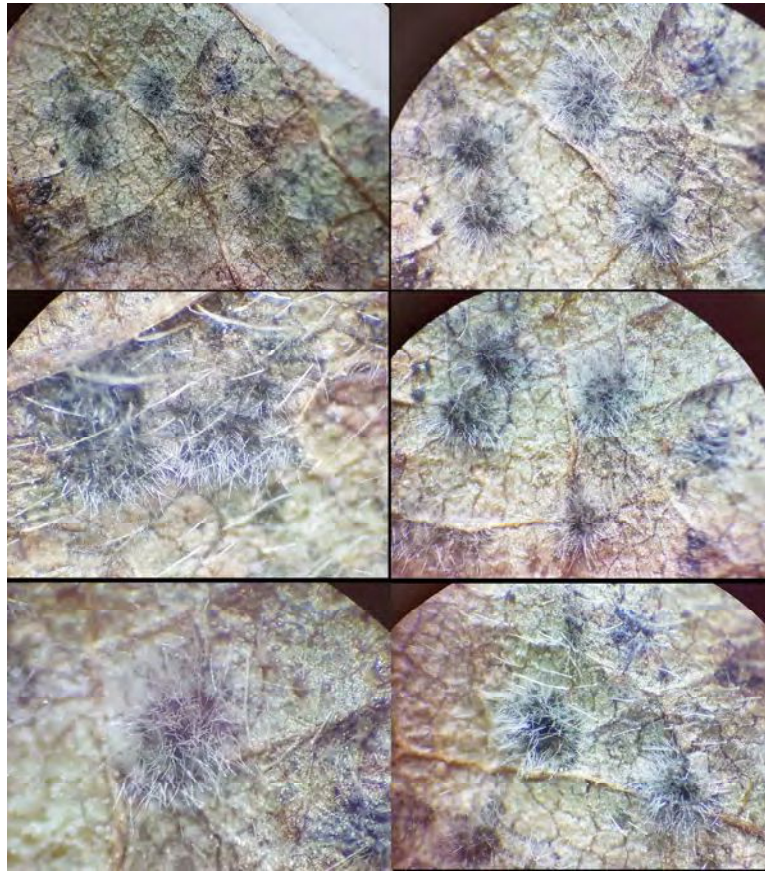


Figura 52. Esporulaci3n de *Cercospora* spp. a partir de sntomas foliares de manchas “tipo *Septoria*” en hojas del tercio superior del canopeo de un cultivo de soja DM4915 ubicado en Roldán, Santa Fe, muestreadas en febrero de 2017. Autor: Francisco Sautua.

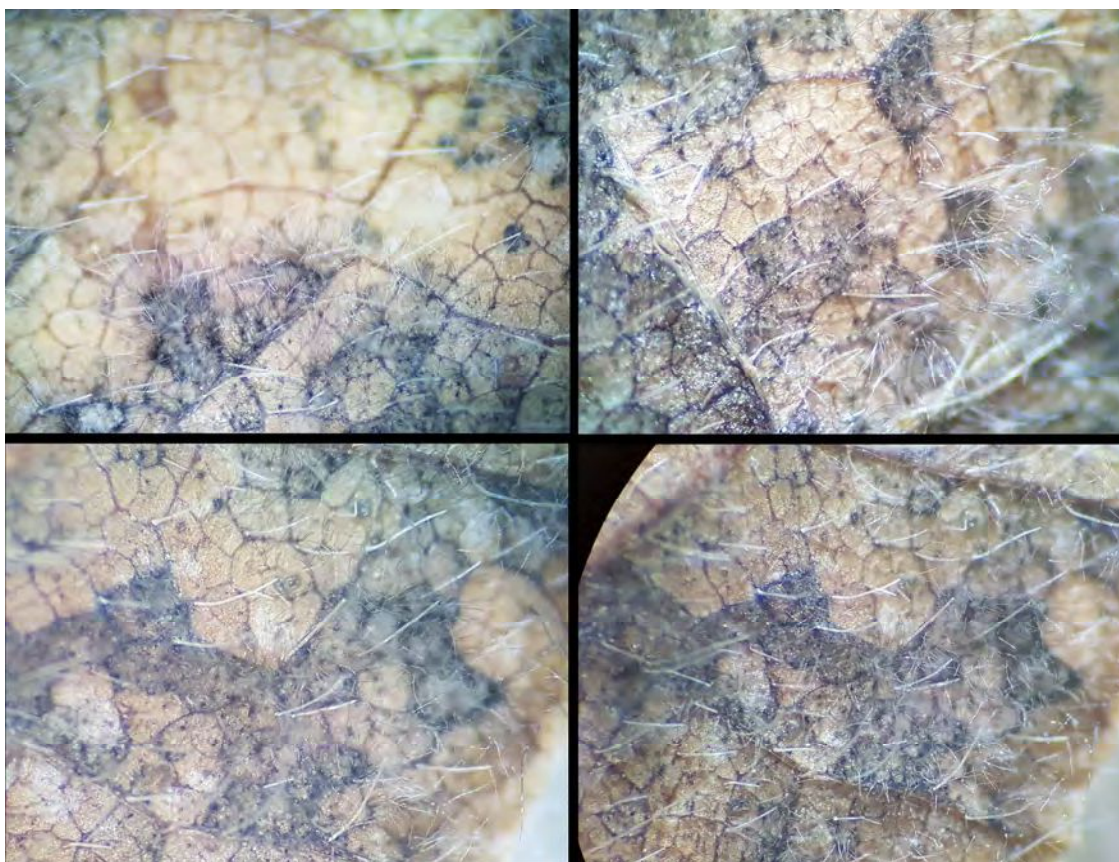


Figura 53. Esporulación de *Cercospora* spp. a partir de síntomas foliares de manchas “tipo *Septoria*”. Obsérvese cómo los conidióforos crecen a partir de las manchas foliares. Autor: Francisco Sautua.



Figura 54. Conidio obtenido a partir de esporulación de *Cercospora* spp. en síntomas foliares denominados en esta tesis como “manchas tipo *Septoria*” en hojas superiores (tercio superior del canopeo) de un cultivo de soja DM4014 ubicado en Bigand, Santa Fe, muestreadas en febrero de 2019. Autor: Francisco Sautua.

El experimento se repitió 2 veces más con muestras de hojas de soja que desplegaban síntomas “tipo Septoria”, colectadas en 2018 (ACA 4990) y 2019 (DM 41014 Ipro) en Bigand, Santa Fe, confirmando los resultados. Posteriormente, el experimento se repitió por cuarta vez (cuarto año de muestreo consecutivo), a partir de muestras de hojas de soja de la variedad DM4014 que también desplegaban síntomas “tipo *Septoria*” en el tercio superior del canopeo, muestreadas en Bigand en marzo de 2020. Se realizaron 2 incubaciones independientes, de las mismas 12 hojas, seleccionadas al azar del total muestreado. *Cercospora* spp. fue el patógeno predominante en las incubaciones de los síntomas descriptos (Figuras 55 y 56). *Cercospora* spp. tuvo una incidencia >90%, mientras que *S. glycines* tuvo una incidencia entre 33 y 66% (Tabla 12). Adicionalmente, se detectó la presencia de *C. sojina* y *Colletotrichum* spp. en niveles mínimos comparados con *C. kikuchii* y *S. glycines*.

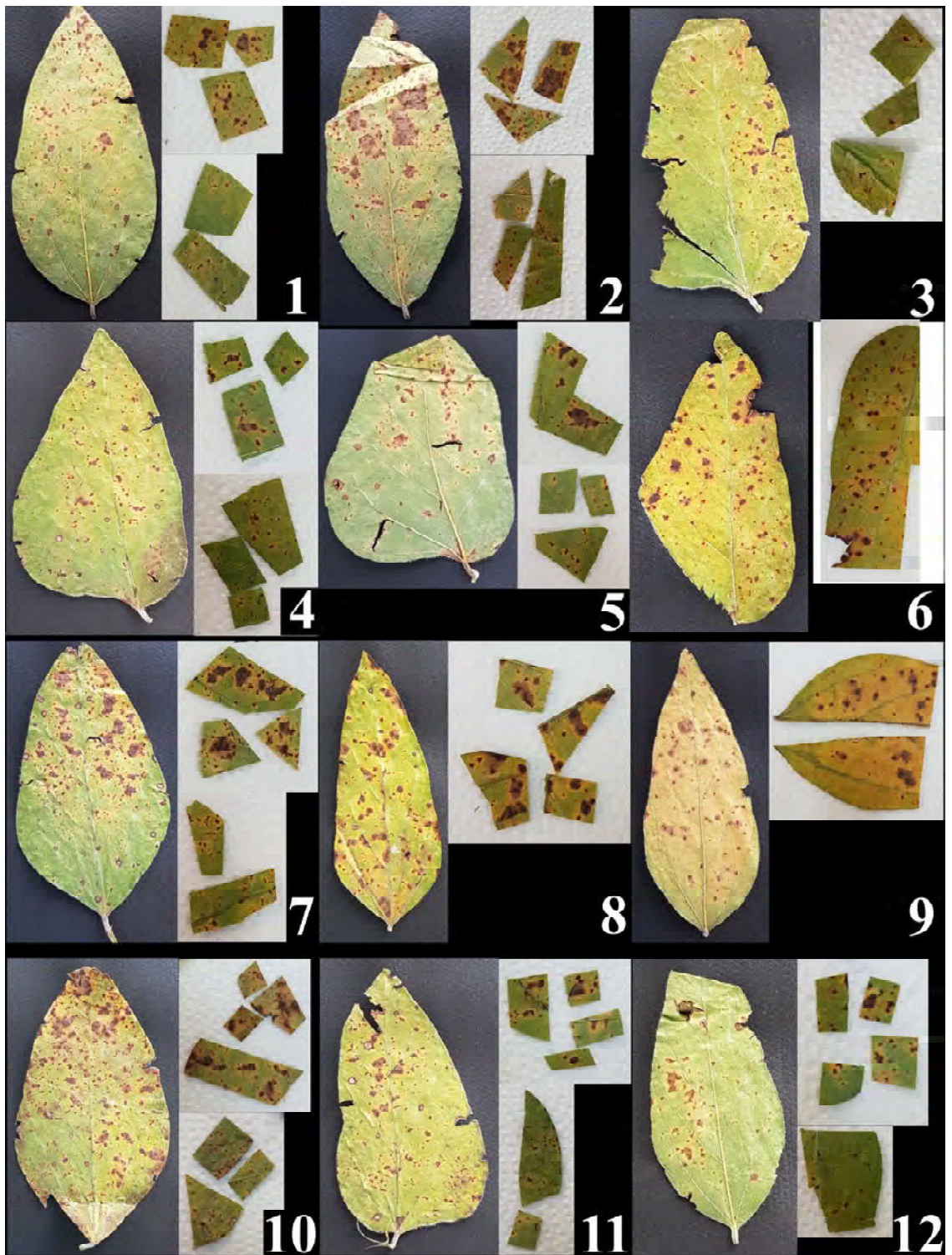


Figura 55. Incubación de síntomas de manchas “tipo *Septoria*” para estimación de la frecuencia de detección de patógenos en dos incubaciones independientes a partir de muestras de hojas del tercio superior de un cultivo de soja en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2020.

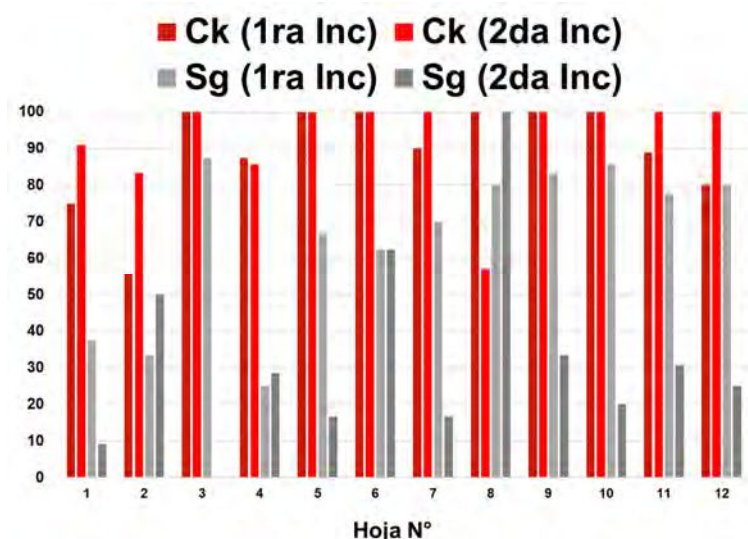


Figura 56. Frecuencia (%) de detección de patógenos en dos incubaciones independientes a partir de muestras de hojas con síntomas “tipo *Septoria*” del tercio superior de un cultivo de soja en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2020.

Tabla 12. Frecuencia (%) promedio de detección de los patógenos *C. kikuchii* (Ck) y *S. glycines* a partir de muestras de hojas con síntomas “tipo *Septoria*” del tercio superior de un cultivo de soja en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2020. Los valores promedio corresponden a dos incubaciones independientes de las mismas 12 hojas muestreadas al azar, a partir del tercio superior, en marzo del 2020 en Bigand, Santa Fe.

| | Ck | Sg |
|---------------|------|------|
| 1° incubación | 90 | 66 |
| 2° incubación | 93 | 33 |
| Promedio | 91.5 | 49.5 |

El experimento se repitió por quinta vez (quinto año de muestreo consecutivo), a partir de hojas de soja de la variedad DM4614 que desplegaban síntomas “tipo *Septoria*”, ubicadas en el tercio superior del canopeo, muestreadas en Bigand el 10 de marzo de 2021 (Figura 57). Se realizaron 2 incubaciones independientes (dos repeticiones del experimento en total). En cada una de las incubaciones, se incubaron 10 hojas provenientes de una parcela sin aplicación de fungicidas, de las cuales se incubaron 5 pedacitos con manchas más grandes sospechadas de síntomas más típicos de TH por *Cercospora* spp. y 5 pedacitos con manchas más pequeñas sospechadas de MM causada por *S. glycines* (Figuras 58 y 59). Adicionalmente, se incubaron 10 hojas que recibieron tratamientos con fungicida (5 hojas de parcelas en las que se aplicó Amistar Xtra y 5 hojas de parcelas en las que se aplicó Opera). Por lo tanto, se incubaron 20 hojas (primera incubación) y otras 20 hojas (segunda incubación) provenientes del tercio superior del canopeo (40 hojas en total), seleccionadas al azar del total muestreado. En la segunda

incubación se realizó una variante en la incubación: las primeras 48 hs se incubaron en oscuridad y las 48 hs siguientes se incubaron con fotoperíodo de 16 hs de luz cercana al UV : 8 hs de oscuridad, para evaluar si el régimen de luz tenía o no un efecto en la esporulación de los patógenos y por lo tanto podría influir en la frecuencia de detección de cada uno. En todos los casos se observó una mayor frecuencia (Figuras 60 a 62) e intensidad (Figuras 63 a 65) de *Cercospora* spp.



Figura 57. Hojas de soja de la variedad DM4614 con síntomas “tipo *Septoria*”, ubicadas en la mitad superior del canopeo, muestreadas en Bigand, Santa Fe, el 10 de marzo de 2021. Autores: Dr. Marcelo Carmona, Silvana Di Nubila.

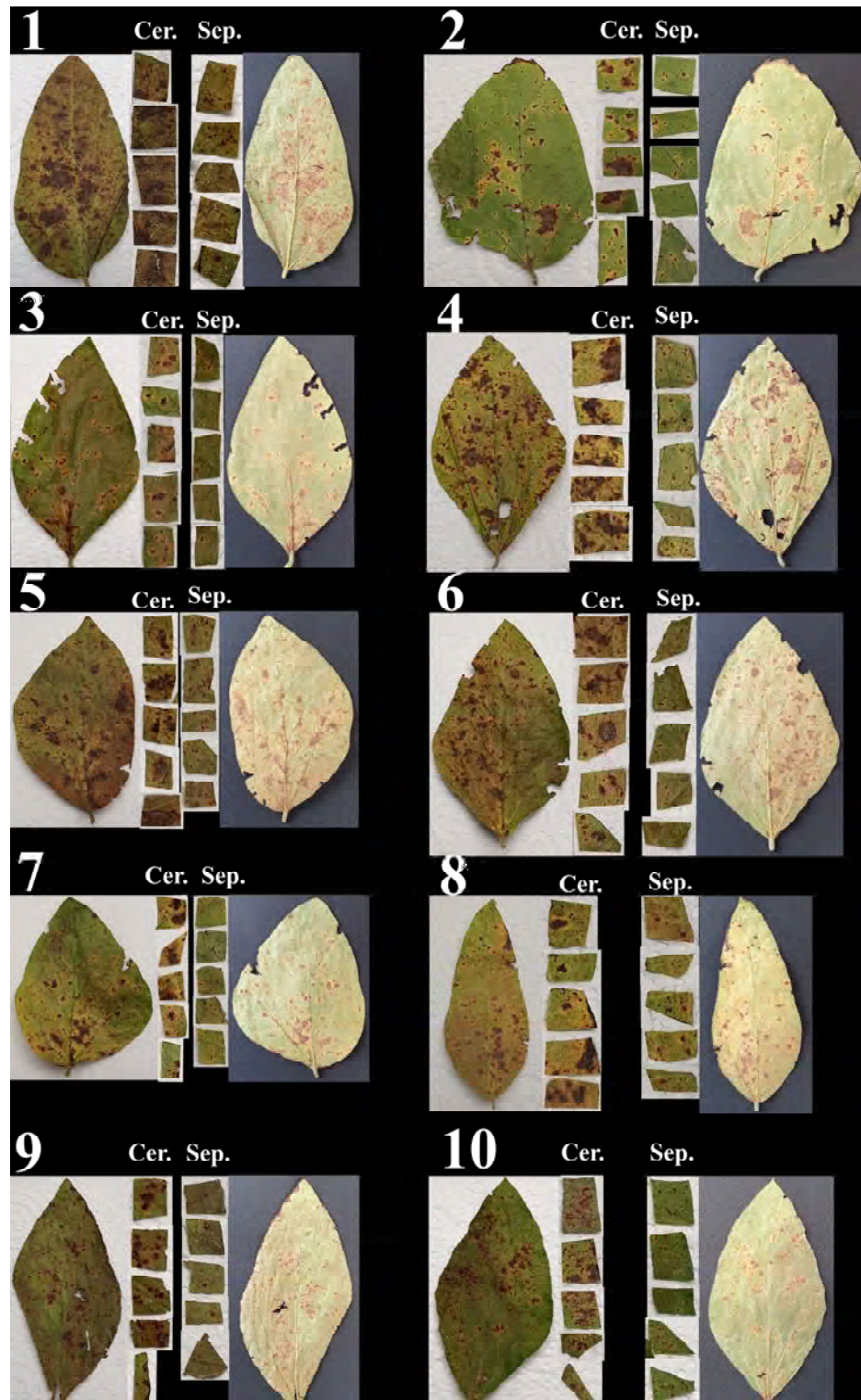


Figura 58. Incubación de síntomas de manchas “tipo *Septoria*” para estimación de la frecuencia e intensidad o densidad de esporulación de patógenos a partir de muestras de hojas del tercio superior, provenientes de parcelas sin aplicación de fungicida de un cultivo de soja en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2021 (primera incubación). “Cer.” = manchas más grandes sospechadas de TH causado por *Cercospora* spp., “Sep.” = manchas más pequeñas sospechadas de MM causado por *S. glycines*.

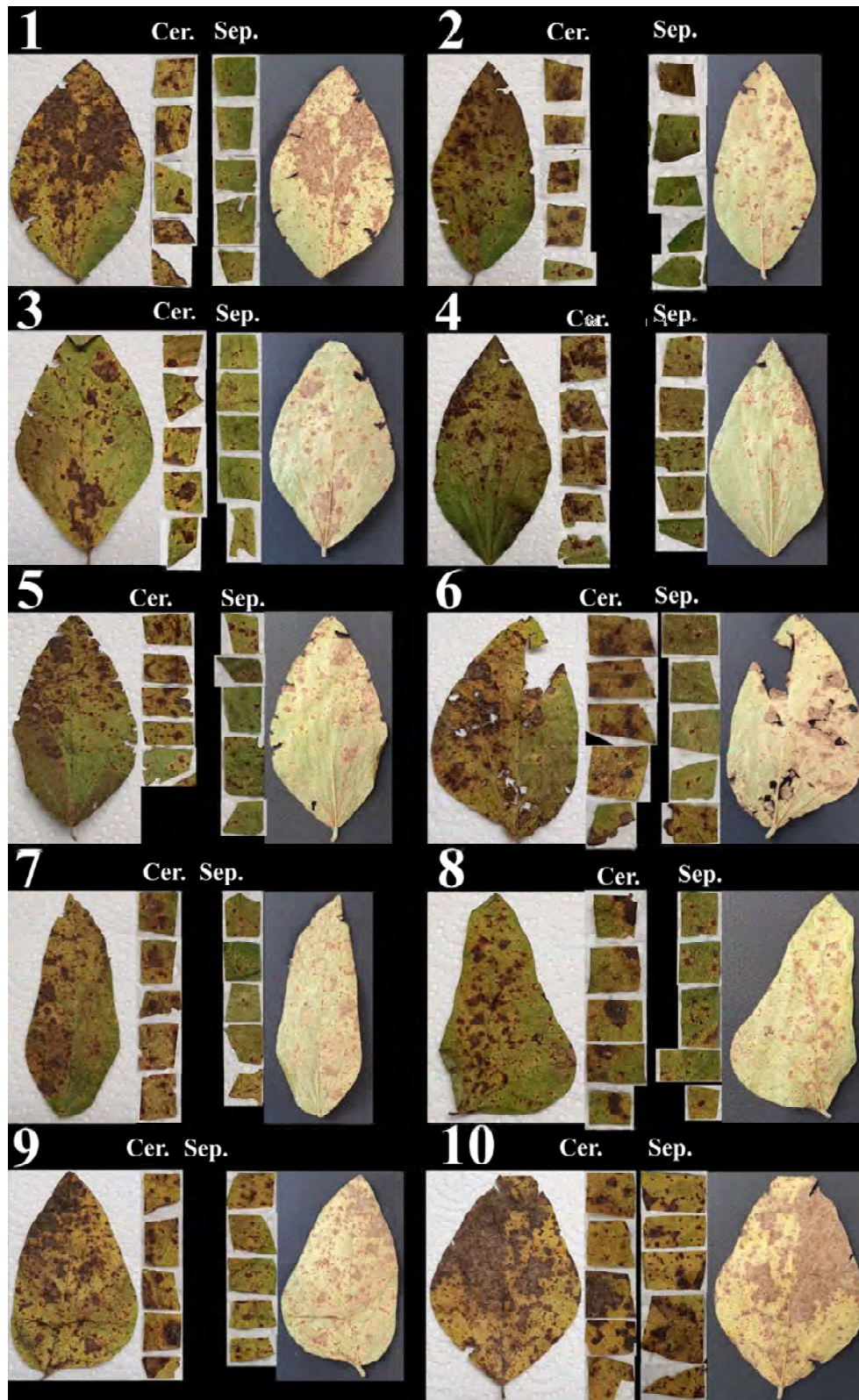


Figura 59. Incubación de síntomas de manchas “tipo *Septoria*” para estimación de la frecuencia e intensidad o densidad de esporulación de patógenos a partir de muestras de hojas del tercio superior, provenientes de parcelas sin aplicación de fungicida de un cultivo de soja en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2021 (segunda incubación). “Cer.” = manchas más grandes sospechadas de TH causado por *Cercospora* spp., “Sep.” = manchas más pequeñas sospechadas de MM causado por *S. glycines*.

Frecuencia de patógenos en muestras hojas tipo "Septoria", recolectadas en Bigand, Sta Fe, marzo 2021 (Incubación N°1)

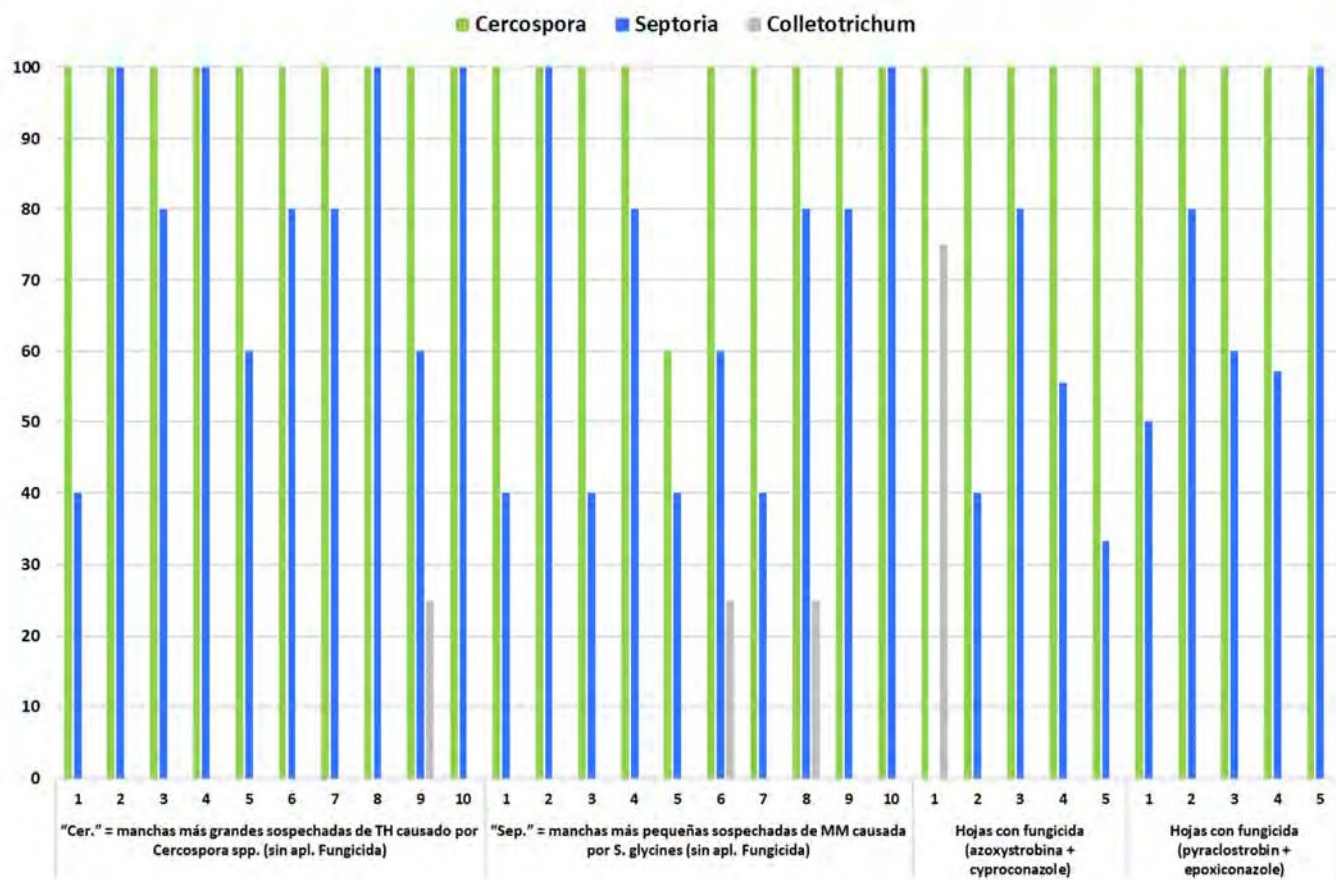


Figura 60. Frecuencia relativa de detección de patógenos en la primera incubación de muestras de hojas con síntomas "tipo *Septoria*" del tercio superior de un cultivo de soja variedad DM4614 en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2021. La frecuencia se expresa en relación al total de submuestras de 1 cm * 1cm incubadas, seleccionadas al azar a partir de las hojas muestreadas.

Frecuencia de patógenos en muestras hojas tipo "Septoria", recolectadas en Bigand, Sta Fe, marzo 2021 (Incubación N°2, primeras 48 hs bajo oscuridad)

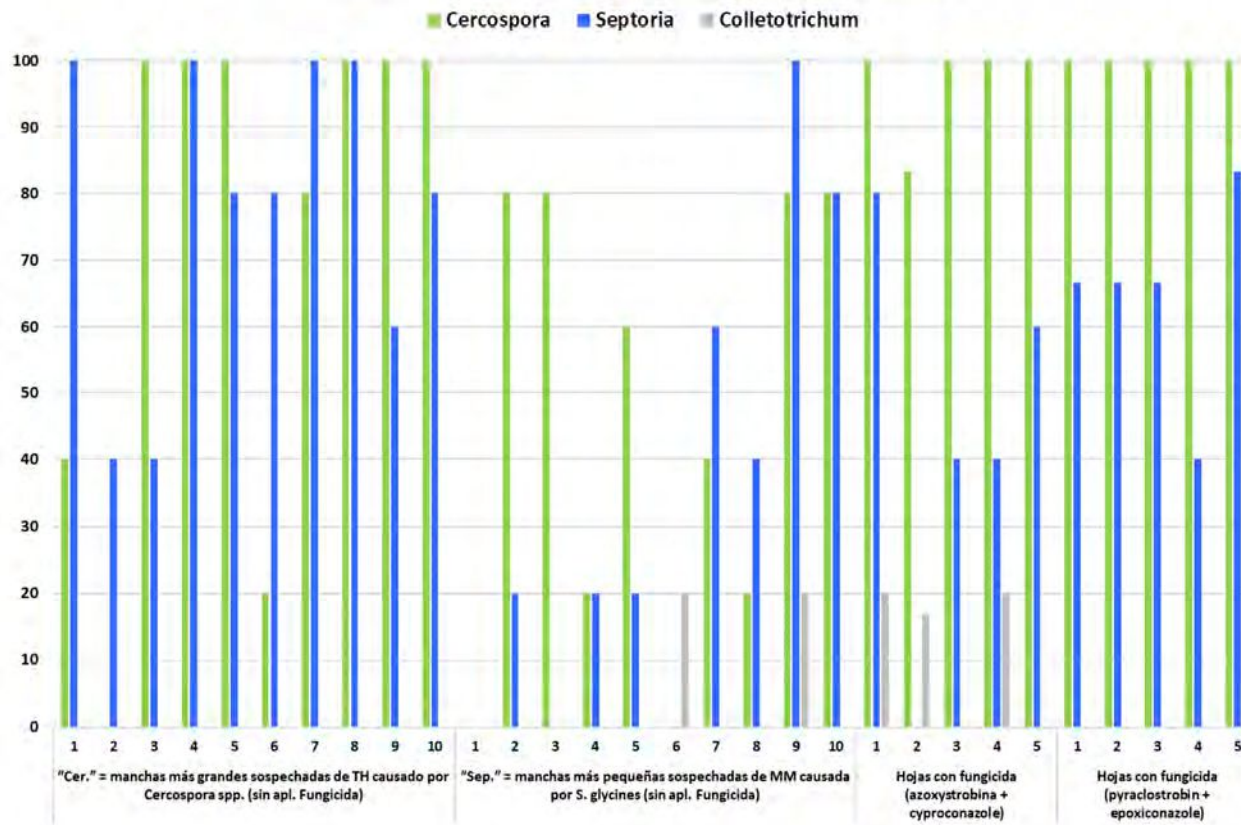


Figura 61. Frecuencia relativa de detección de patógenos en la segunda incubación de muestras de hojas con síntomas "tipo Septoria" del tercio superior de un cultivo de soja variedad DM4614 en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2021. La lectura de frecuencia de patógenos se realizó a las 48 hs de incubación en oscuridad. La frecuencia se expresa en relación al total de submuestras de 1 cm * 1cm incubadas, seleccionadas al azar a partir de las hojas muestreadas.

Frecuencia de patógenos en muestras hojas tipo "Septoria", recolectadas en Bigand, Sta Fe, marzo 2021 (Incubación N°2, segundas 48 hs con fotoperiodo luz UV:oscuridad)

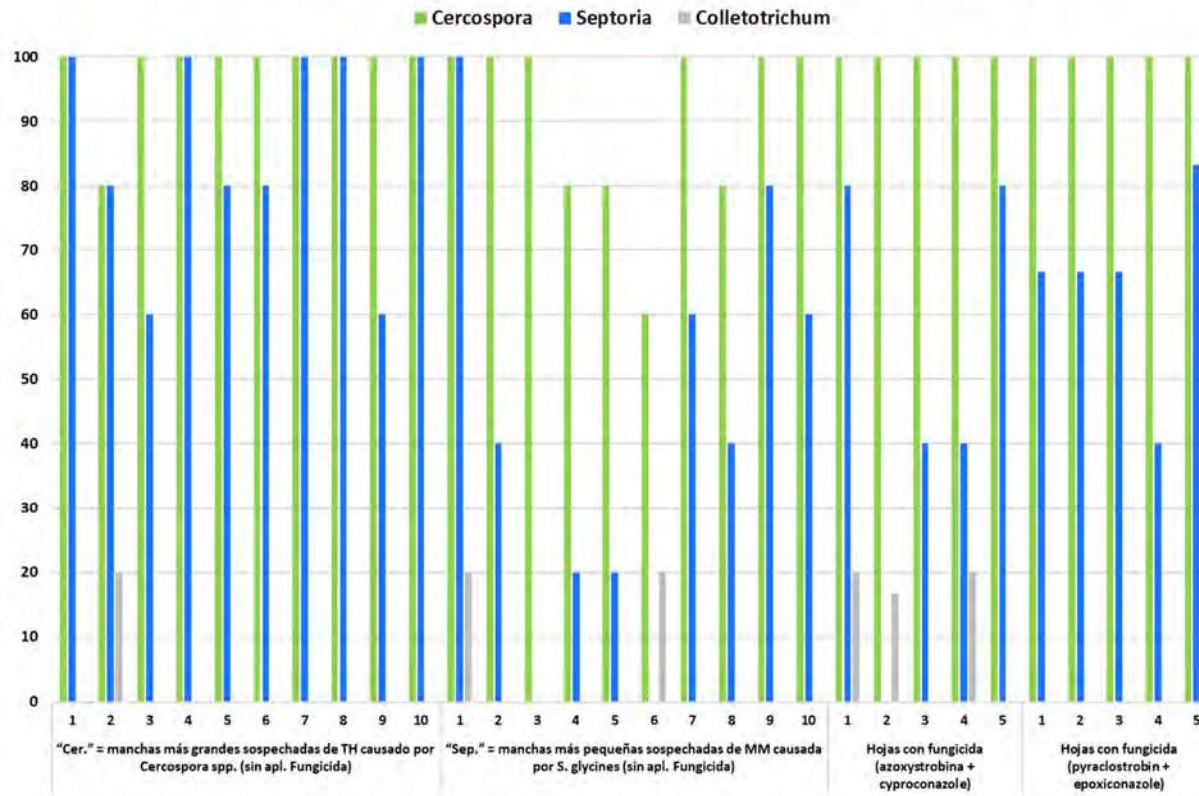


Figura 62. Frecuencia relativa de detección de patógenos en la segunda incubación de muestras de hojas con síntomas "tipo *Septoria*" del tercio superior de un cultivo de soja variedad DM4614 en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2021. La lectura de frecuencia de patógenos se realizó a las 96 hs de incubación (primeras 48 hs en oscuridad y siguientes 48 hs con fotoperiodo de 16 hs cercano al UV: 8 hs oscuridad). La frecuencia se expresa en relación al total de submuestras de 1 cm * 1cm incubadas, seleccionadas al azar a partir de las hojas muestreadas.

Intensidad o densidad de esporulación de patógenos (N° focos de esporulación) en muestras hojas tipo "Septoria", recolectadas en Bigand, Sta Fe, marzo 2021 (Incubación N°1)

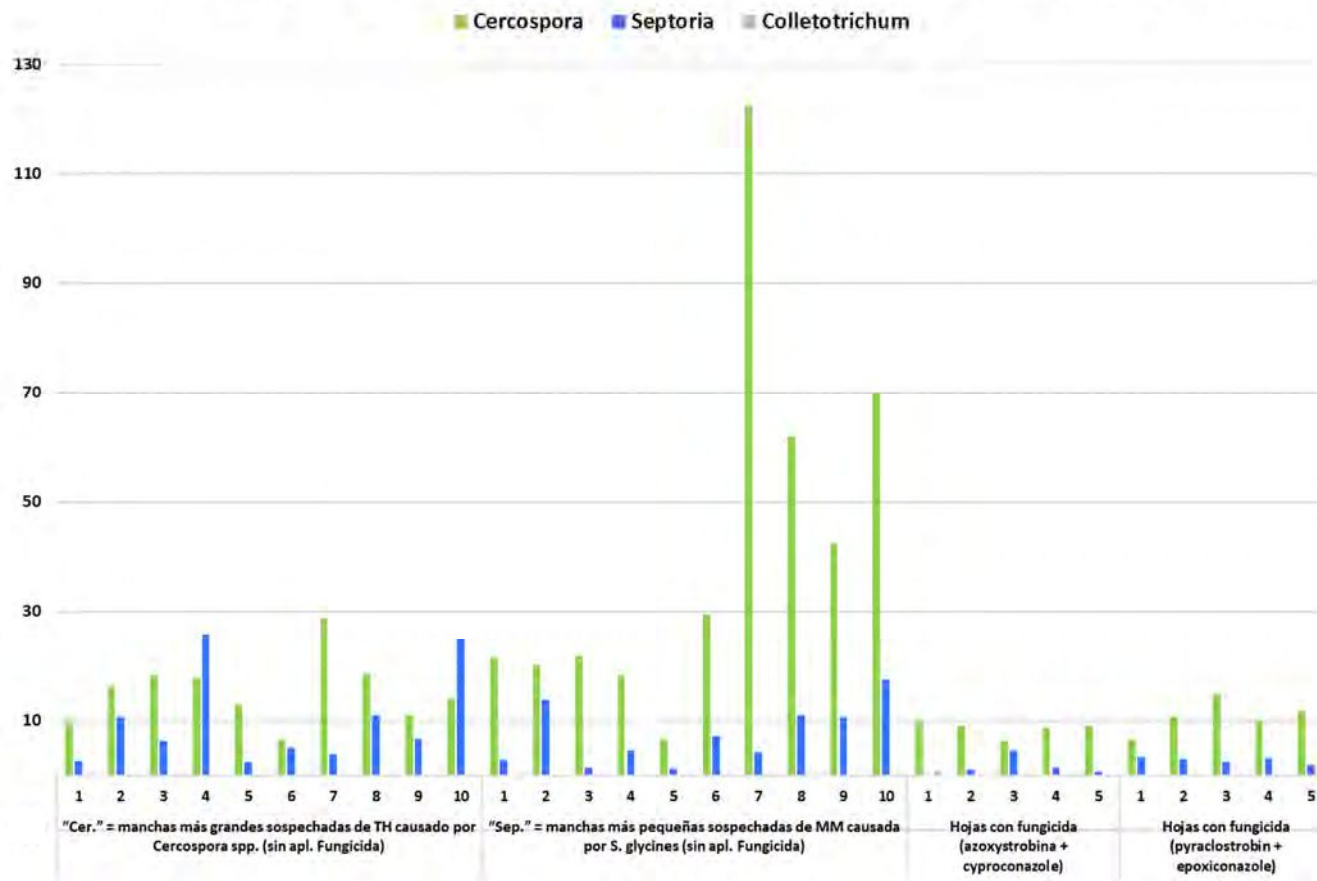


Figura 63. Intensidad o densidad de esporulación de patógenos (N° focos de esporulación) en la primera incubación de muestras de hojas con síntomas "tipo *Septoria*" del tercio superior de un cultivo de soja variedad DM4614 en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2021.

Intensidad o densidad de esporulación de patógenos (N° focos de esporulación) en muestras
 hojas tipo "Septoria", recolectadas en Bigand, Sta Fe, marzo 2021
 (Incubación N°2, primeras 48 hs bajo oscuridad)

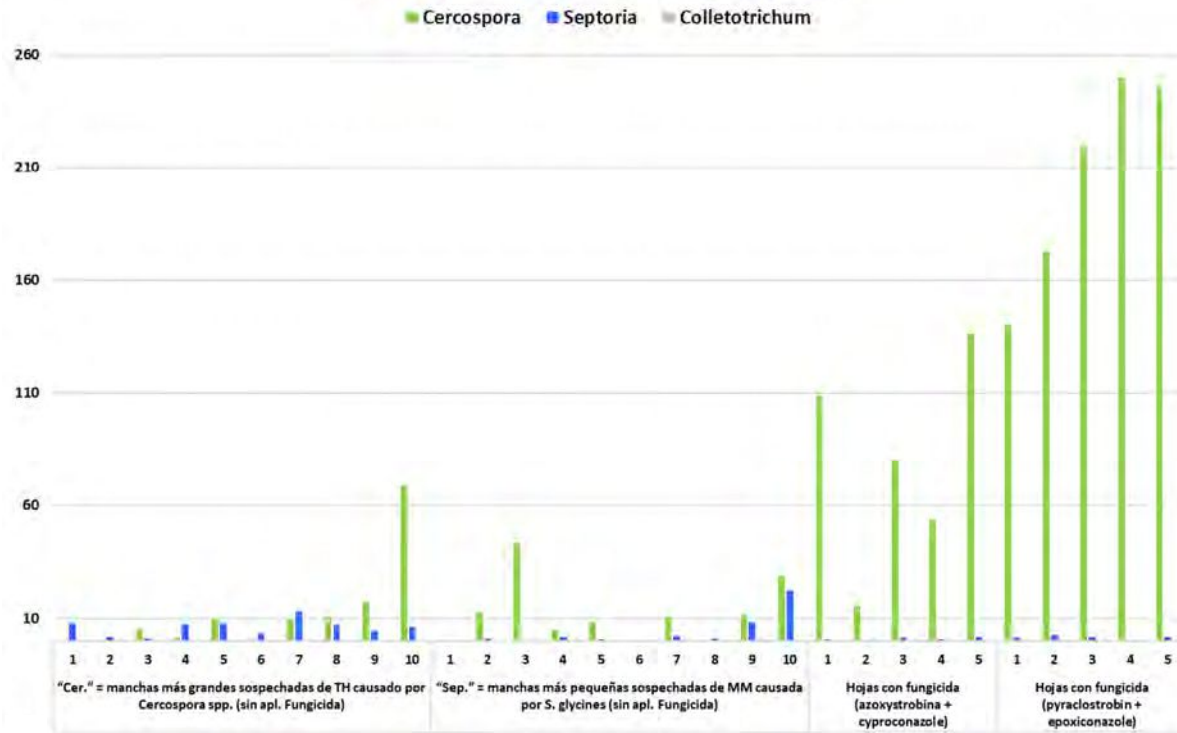


Figura 64. Intensidad o densidad de esporulación de patógenos (N° focos de esporulación) en la segunda incubación de muestras de hojas con síntomas "tipo *Septoria*" del tercio superior de un cultivo de soja variedad DM4614 en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2021. La lectura de frecuencia de patógenos se realizó a las 48 hs de incubación en oscuridad. La frecuencia se expresa en relación al total de submuestras de 1 cm * 1cm incubadas, seleccionadas al azar a partir de las hojas muestreadas.

Intensidad o densidad de esporulación de patógenos (N° focos de esporulación) en muestras
 hojas tipo "Septoria", recolectadas en Bigand, Sta Fe, marzo 2021
 (Incubación N°2, segundas 48 hs con fotoperíodo luz UV:oscuridad)

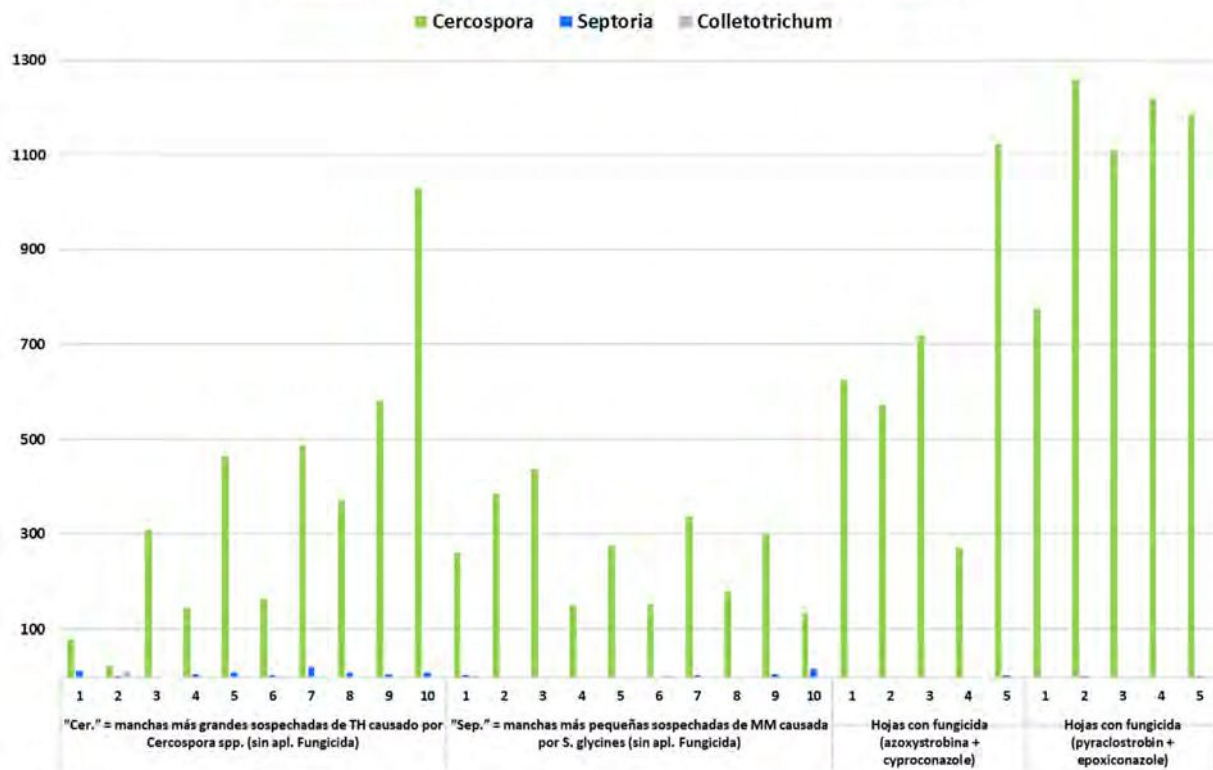


Figura 65. Intensidad o densidad de esporulación de patógenos (N° focos de esporulación) en la segunda incubación de muestras de hojas con síntomas "tipo Septoria" del tercio superior de un cultivo de soja variedad DM4614 en Bigand, Sta. Fe, en marzo 2021. La lectura de frecuencia de patógenos se realizó a las 96 hs de incubación (primeras 48 hs en oscuridad y siguientes 48 hs con fotoperíodo de 16 hs cercano al UV: 8 hs oscuridad). La frecuencia se expresa en relación al total de submuestras de 1 cm * 1cm incubadas, seleccionadas al azar a partir de las hojas muestreadas.

El experimento se repitió por sexta vez, a partir de hojas de soja de la variedad NS4309 que desplegaban síntomas “tipo *Septoria*”, muestreadas en Piamonte, Santa Fe, el 24 de marzo de 2021 (Figura 66). Se realizó una incubación de 8 hojas en total, 4 de la mitad superior y 4 de la mitad inferior del canopeo (Figura 67). Se observó la predominancia de *Cercospora* spp. en las dos mitades por igual (Figuras 68 y 69).



Figura 66. Hojas de soja de la variedad NS4309 con síntomas “tipo *Septoria*”, muestreadas en Piamonte, Santa Fe, el 24 de marzo de 2021. Autor: Ing. Agr. Barbarina Milanesio.

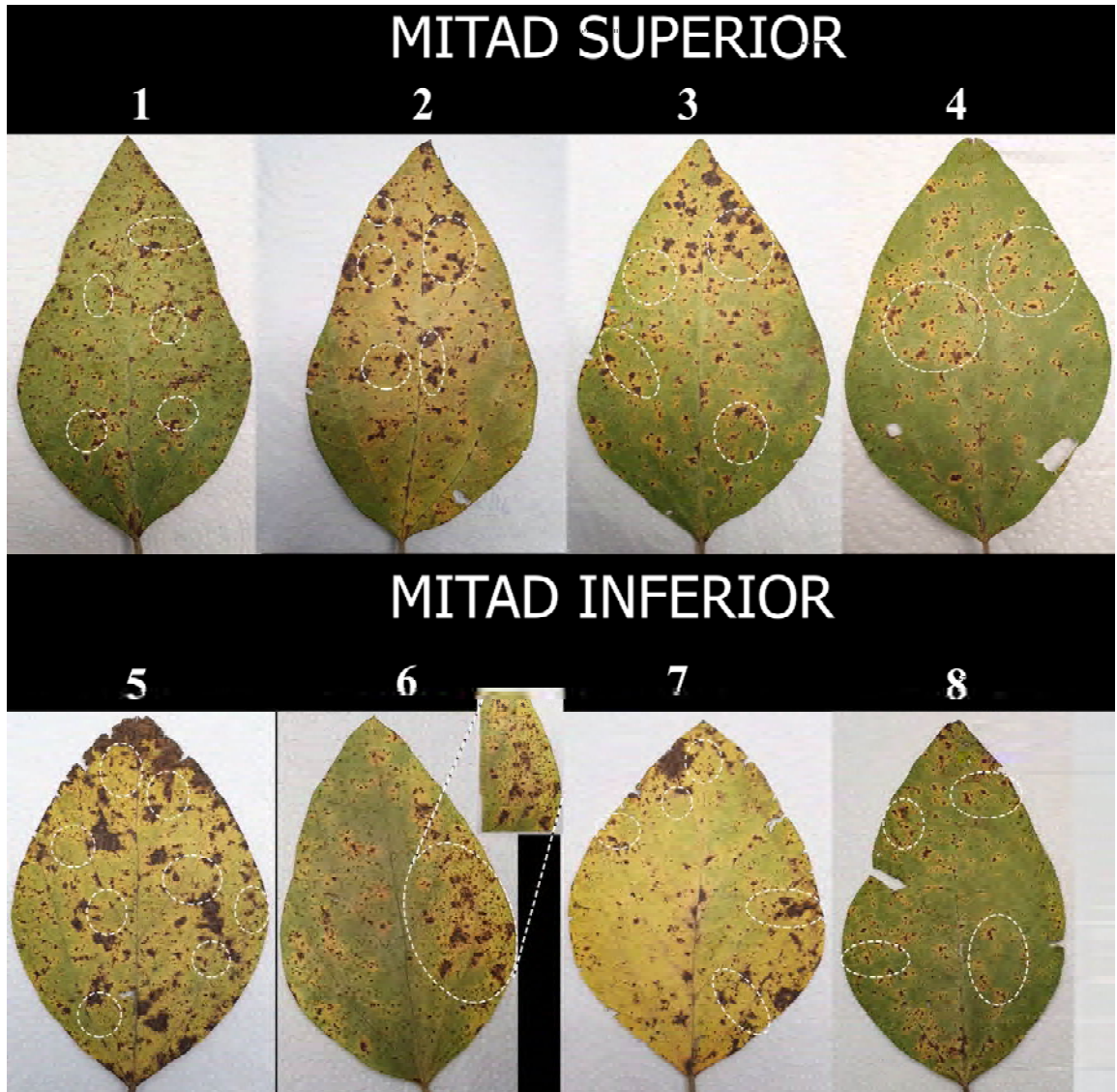


Figura 67. Incubación de hojas de soja de la variedad NS4309 con síntomas “tipo *Septoria*”, muestreadas en Piamonte, Santa Fe, el 24 de marzo de 2021, a partir de las mitades superior e inferior del canopeo. Los círculos con líneas punteadas blancas indican los trozos exactos de tejido vegetal que fueron incubados. Autor: Francisco Sautua

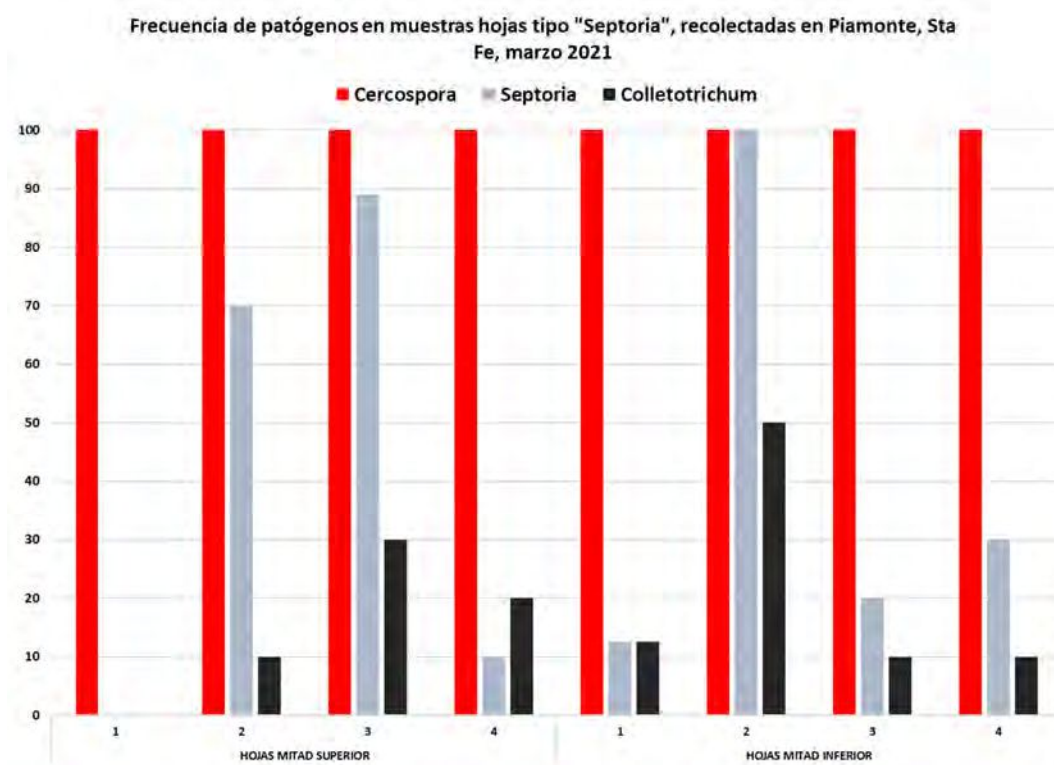


Figura 68. Frecuencia relativa de detección de patógenos en muestras de hojas con síntomas “tipo *Septoria*” de un cultivo de soja variedad NS4309 en Piamonte, Sta. Fe, en marzo 2021. La frecuencia se expresa en relación al total de submuestras de 1 cm * 1cm incubadas, seleccionadas al azar a partir de las hojas muestreadas.

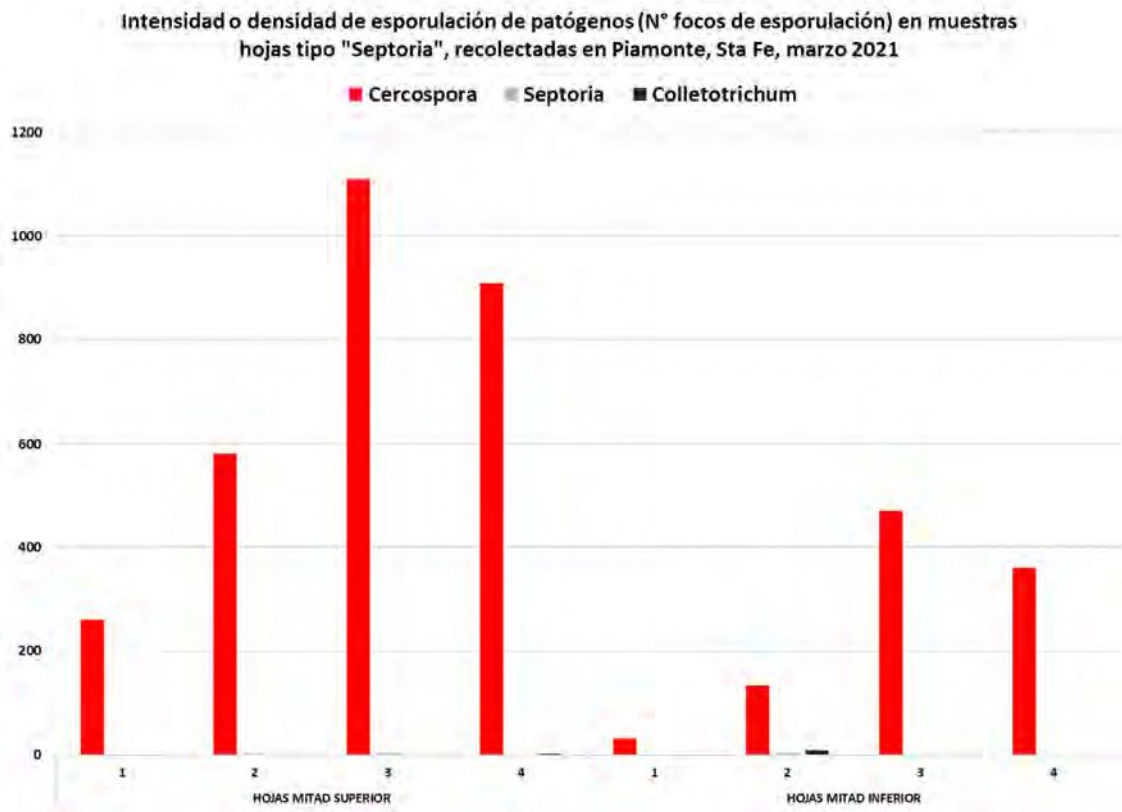


Figura 69. Intensidad o densidad de esporulación de patógenos (N° focos de esporulación) en muestras de hojas con síntomas “tipo *Septoria*” de un cultivo de soja variedad NS4309 en Piamonte, Sta. Fe, en marzo 2021.

En las tablas 13 y 14 se muestran la frecuencia de detección y densidad de esporulación promedio de patógenos, respectivamente, en muestras de hojas de soja variedad DM4614, muestreadas en Bigand, y en muestras de hojas de soja variedad NS4309, muestreadas en Piamonte, en marzo 2021. En la Figura 70 se muestran los promedios para cada localidad.

Tabla 13. Frecuencia (%) promedio de detección de los patógenos *C. kikuchii* (Ck) y *S. glycines* a partir de muestras de hojas con síntomas “tipo *Septoria*” en marzo 2021. La frecuencia se expresa en relación al total de submuestras de 1 cm * 1cm incubadas, seleccionadas al azar a partir de las hojas muestreadas. Los valores correspondientes a las muestras de Bigand son promedios de 30 hojas del tercio superior en cada incubación, y los correspondientes a las muestras de Piamonte son promedios de 4 hojas por mitad de canopeo (mitades superior e inferior).

| Localidad | Incubación | <i>Cercospora</i> | <i>Septoria</i> | <i>Colletotrichum</i> |
|-----------|------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| Bigand | 1° | 99 | 67 | 5 |
| | 2° (primeras 48 h oscuridad) | 73 | 55 | 3 |
| | 2° (segundas 48 h con luz*) | 96 | 61 | 4 |
| Piamonte | Mitad superior | 100 | 42 | 15 |
| | Mitad inferior | 100 | 41 | 21 |

* Primeras 48 h de incubación en oscuridad, segundas 48 h de incubación con 16 h luz cercana al UV : 8 h oscuridad.

Tabla 14. Densidad (N°) promedio de esporulación de los patógenos *C. kikuchii* (Ck) y *S. glycines* a partir de muestras de hojas con síntomas “tipo *Septoria*” en marzo 2021. Los valores correspondientes a las muestras de Bigand son promedios de 30 hojas del tercio superior en cada incubación, y los correspondientes a las muestras de Piamonte son promedios de 4 hojas por mitad de canopeo (mitades superior e inferior).

| Localidad | Incubación | <i>Cercospora</i> | <i>Septoria</i> | <i>Colletotrichum</i> |
|-----------|------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| Bigand | 1° | 22 | 6 | 0 |
| | 2° (primeras 48 h oscuridad) | 56 | 4 | 0 |
| | 2° (segundas 48 h con luz*) | 504 | 5 | 1 |
| Piamonte | Mitad superior | 714 | 2 | 1 |
| | Mitad inferior | 250 | 2 | 3 |

* Primeras 48 h de incubación en oscuridad, segundas 48 h de incubación con 16 h luz cercana al UV : 8 h oscuridad.

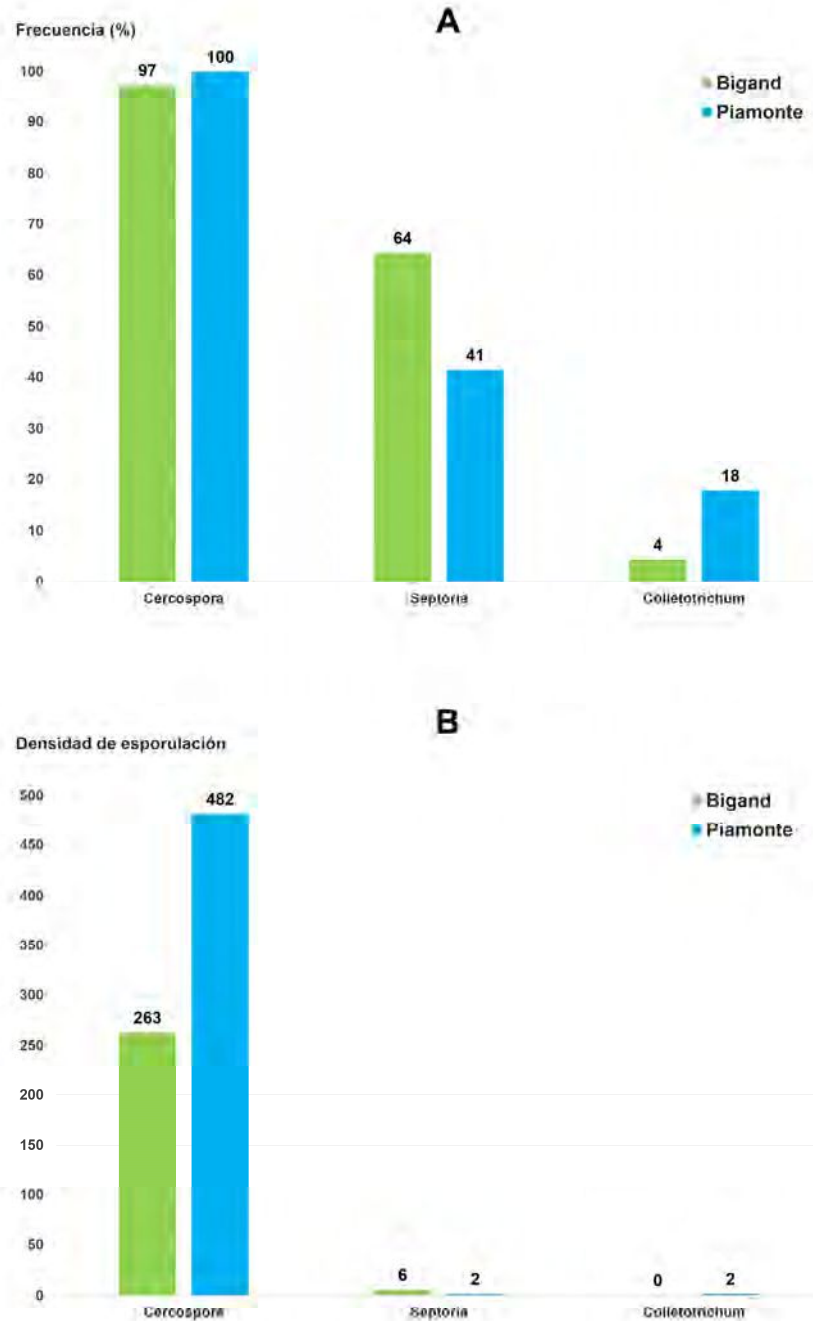


Figura 70. Frecuencia relativa (%) de detección (A) y densidad (N°) de esporulación (B) promedio de los patógenos *C. kikuchii* (Ck) y *S. glycines* a partir de muestras de hojas con síntomas “tipo *Septoria*” recolectadas en marzo 2021 en dos localidades de la provincia de Santa Fe. La frecuencia se expresa en relación al total de submuestras de 1 cm * 1cm incubadas, seleccionadas al azar a partir de las hojas muestreadas. Los valores correspondientes a las muestras de Bigand son promedios de dos incubaciones independientes de 30 hojas cada una (se promedian los datos de la primera incubación y de la segunda luego de 96 h de incubación). Los valores correspondientes a las muestras de Piamonte son promedios de las mitades superior e inferior (4 hojas por mitad de canopeo).

Durante las evaluaciones, se observó esporulación de ambos patógenos (conidios en conidióforos y cirros saliendo de picnidios subepidérmicos) en forma superpuesta o sobrepuesta (uno encima del otro o en la misma superficie de la hoja), o una al lado de la otra (a micrones o milímetros de distancia). Sobre síntomas típicos del TH (superficie foliar coriácea con coloración violeta o morada) se han observado cirros de *S. glycines* y sobre manchas típicas de MM se han observado conidios en conidióforos de *Cercospora* spp. (Figura 71). Tanto *Cercospora* spp. como *S. glycines* esporulan en ambos lados de la hoja, por igual.

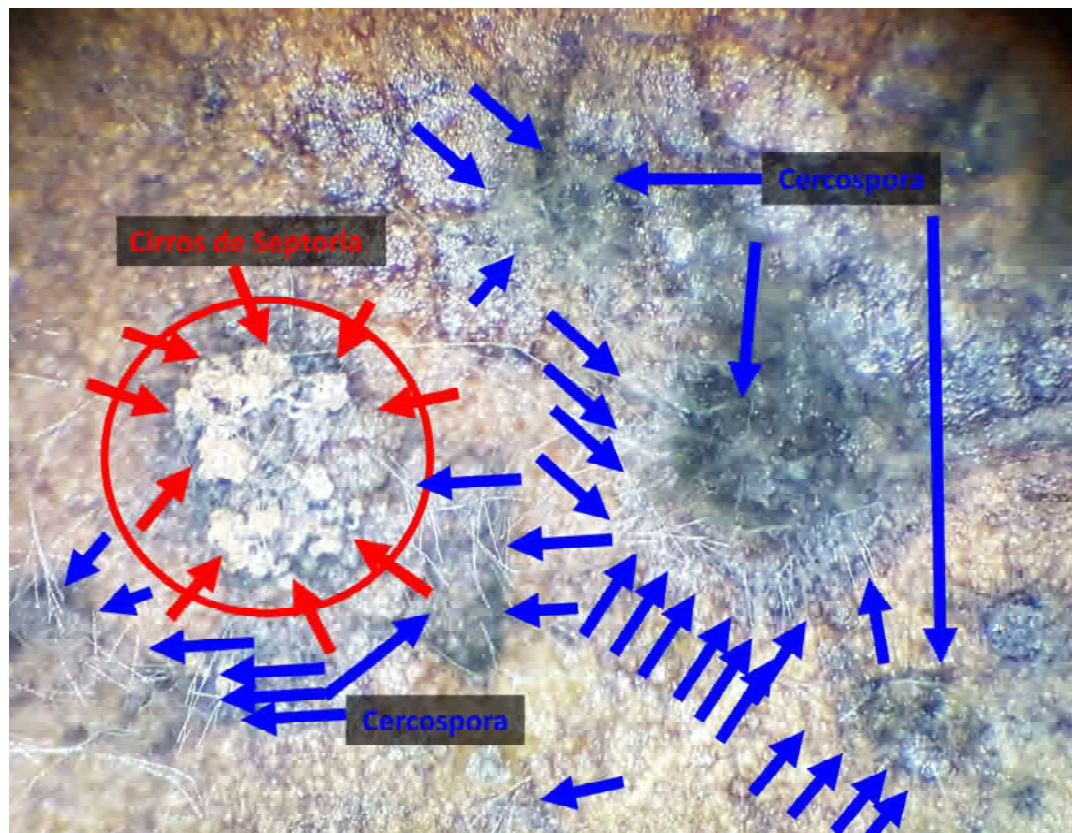


Figura 71. Esporulación de *Cercospora* spp. y *S. glycines* en hojas de soja con síntomas “tipo *Septoria*”, luego de la incubación. Notar la proximidad de ambos patógenos.

La Figura 72 resume los resultados en forma cronológica.

MUESTRAS DE HOJAS CON SÍNTOMAS SIMILARES A LOS DE LA MANCHA MARRÓN DE LA SOJA

| Año | Localidad | Varietal | Canopeo | Resultado de incubación |
|------|-----------|---------------|-----------------|---|
| 2017 | Roldán | DM4915 | tercio superior | 100% <i>Cercospora</i> spp. |
| 2018 | Bigand | ACA 4990 | tercio superior | 100% <i>Cercospora</i> spp. |
| 2019 | Bigand | DM 41014 Ipro | tercio superior | 100% <i>Cercospora</i> spp. |
| 2020 | Bigand | DM4014 | tercio superior | { 91% <i>Cercospora</i> spp. 49.5% <i>S. glycines</i> } |
| 2021 | Bigand | DM4614 | mitad superior | { 97% <i>Cercospora</i> spp. 64% <i>S. glycines</i> } |
| 2021 | Piamonte | NS4309 | mitad superior | { 100% <i>Cercospora</i> spp. 42% <i>S. glycines</i> } |
| | | | mitad inferior | { 100% <i>Cercospora</i> spp. 41% <i>S. glycines</i> } |

Figura 72. Resumen de experimentos de incubación de hojas de soja con síntomas similares a los de Mancha Marrón, en forma cronológica, con los resultados obtenidos en cada año. La frecuencia se expresa en relación al total de submuestras de 1 cm * 1cm incubadas, seleccionadas al azar a partir de las hojas muestreadas.

De acuerdo con el presente hallazgo, debido a la notable diferencia entre los síntomas clásicos o tradicionalmente considerados típicos del TH (denominados “tizón morado”) y los síntomas “tipo *Septoria*” aquí detallados (Figura 73), se propone como hipótesis que estos nuevos síntomas son también síntomas del TH.

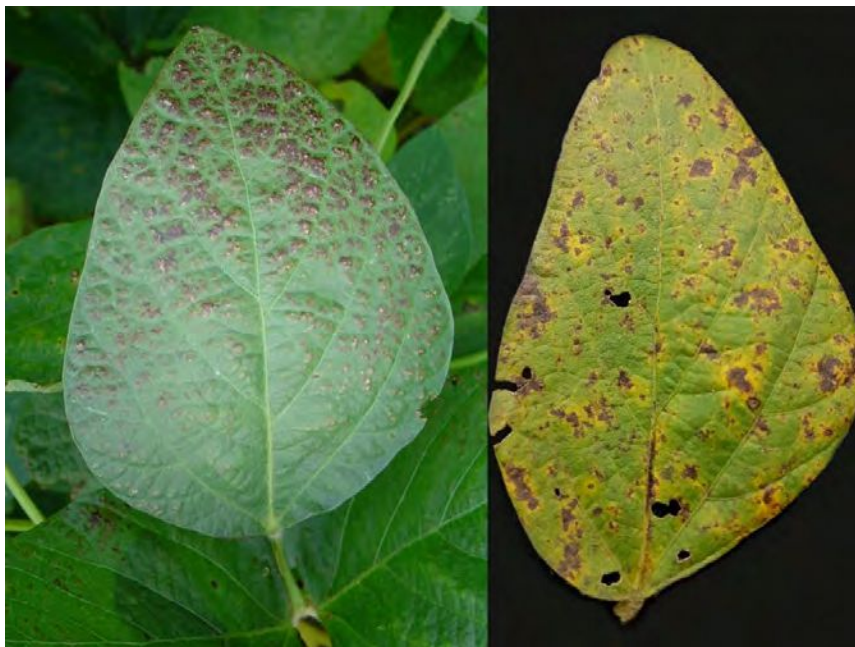


Figura 73. Comparación de síntomas foliares considerados típicos o clásicos o tradicionales del TH o tizón morado de la soja (izquierda) con respecto a los síntomas de manchas “tipo *Septoria*” causadas por *Cercospora* spp. (derecha). Autores: Carmona M (izquierda), Sautua F (derecha).

Fotos adicionales sobre los síntomas “tipo *Septoria*”, propuestos como nuevos síntomas no típicos o no tradicionales del TH se encuentran en el anexo III. Futuros estudios, incluyendo diferentes experimentos, deben confirmar esta hipótesis.

3.4. Secuenciación de genoma de referencia de *Cercospora kikuchii*

La cepa ARG_18_001 se ubicó dentro del clado que incluye otros aislados de *C. kikuchii*, incluido el ex tipo (ex-type), con un 97% de soporte bootstrap (Figura 74).

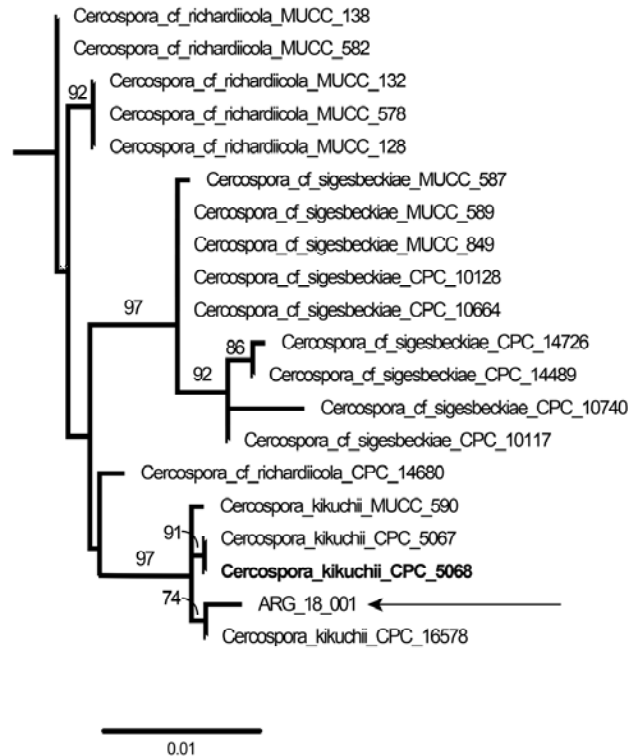


Figura 74. Subárbol de un análisis filogenético de máxima probabilidad de especies de *Cercospora*. La filogenia completa se infirió en RAxML asumiendo el modelo GTRGAMMA integrando datos cortados del genoma de ARG_18_001 con los siguientes siete *loci* de 379 aislados descritos en Groenewald et al. (2013) y en Bakhshi et al. (2018): *actA*, *cmdA*, *nrITS*, *gapdh*, *histone3*, *tefl* y *tub2*. Se muestra el subárbol que incluye ARG_18_001 (no se muestra el resto del árbol) para facilitar la visualización. Las ramas están etiquetadas con valores de soporte bootstrap $\geq 70\%$. La fuente en negrita indica la ubicación del ex tipo (ex-type) de *C. kikuchii*. La flecha indica la ubicación del aislado para el que se secuenció el genoma. La barra de escala indica el número estimado de sustituciones por sitio.

Se ensamblaron *de novo* un total de 33,107,531 lecturas, lo que resultó en 136 scaffolds de al menos 500 pb con el scaffold más grande de 3,211,885 pb y un valor N50 de 898,622 pb. La profundidad de lectura media del ensamblado total (mean coverage of the total assembly) fue de 196.72 veces. El contenido de G + C fue del 53.04%. La predicción génica dio como resultado 14,856 modelos de genes con 14,721 genes codificantes de proteínas y 135 ARN no codificantes, incluido el genoma mitocondrial (Tabla 13). La distribución de las anotaciones de proteínas se resume en la Tabla 14, y la Tabla 15 proporciona el resumen estadístico de los elementos repetitivos identificados. La distribución de los términos de ontología génica funcional (GO) de los genes de *C. kikuchii* ARG_18_001 anotados se ilustra en la Figura 75. La distribución de especies de las principales BLAST hit de los genes codificante de proteínas predichos se muestra en la Figura 76. El borrador del genoma secuenciado se encuentra públicamente disponible en GenBank NCBI NIH con el número de acceso VTAY00000000 (Sautua et al., 2019b).

Tabla 13. Características del genoma de la cepa de *C. kikuchii* ARG_18_001

| Características | <i>C. kikuchii</i> ARG_18_001 |
|--|--------------------------------------|
| Longitud del ensamblado | 33,197,932 |
| Longitud de scaffolds (>= 50000 bp) | 32,541,287 |
| Número de scaffolds (>500 bp) | 136 |
| Número de scaffolds (>1 kb) | 107 |
| Número de scaffolds (>50 kb) | 71 |
| Profundidad de cobertura de secuenciación | 196.72 |
| Contenido de GC (%) | 53.04 |
| Número de genes codificadores de proteínas predichos | 14,721 |
| Densidad de genes (genes/Mb) | 447.5 |
| Longitud promedio de transcritos (pb) | 1,468.7 |
| Longitud promedio de CDS (secuencia codificante) | 1,354.2 |
| Longitud promedio de proteínas (aa) | 451.4 |
| Longitud promedio de exones | 568.6 |
| Longitud promedio de intrones | 82.9 |
| Genes con splicing | 9,702 (66.0%) |
| Número total de intrones | 20,309 |
| Número medio de intrones por gen | 2.0 |
| Número de exones totales | 35,010 |
| Número medio de exones por gen | 2.0 |

Tabla 14. Resumen de la anotación genómica de la cepa de *C. kikuchii* ARG_18_001

| Resumen | Número |
|--|----------------|
| Número de modelos de genes que codifican proteínas | 14,721 |
| Número de modelos con BLAST hit | 13,015 (88.4%) |
| Anotación Blast2GO | 6,296 (42.8%) |
| Anotación PFAM | 5,684 (38.6%) |

Tabla 15. Resumen de elementos repetitivos en el genoma ensamblado de *C. kikuchii* ARG_18_001

| Resumen | Número |
|---|-----------------|
| Total de bases enmascaradas | 178,815 (0.54%) |
| Numero de repeticiones simples | 3,131 |
| Número de repeticiones de baja complejidad | 358 |
| Número de transposones de ADN | 68 |
| Número de LTRs (Long terminal repeats) | 2 |
| Número de LINEs (Long interspersed nuclear elements) | 254 |
| Número de SINEs (Short interspersed nuclear elements) | 21 |

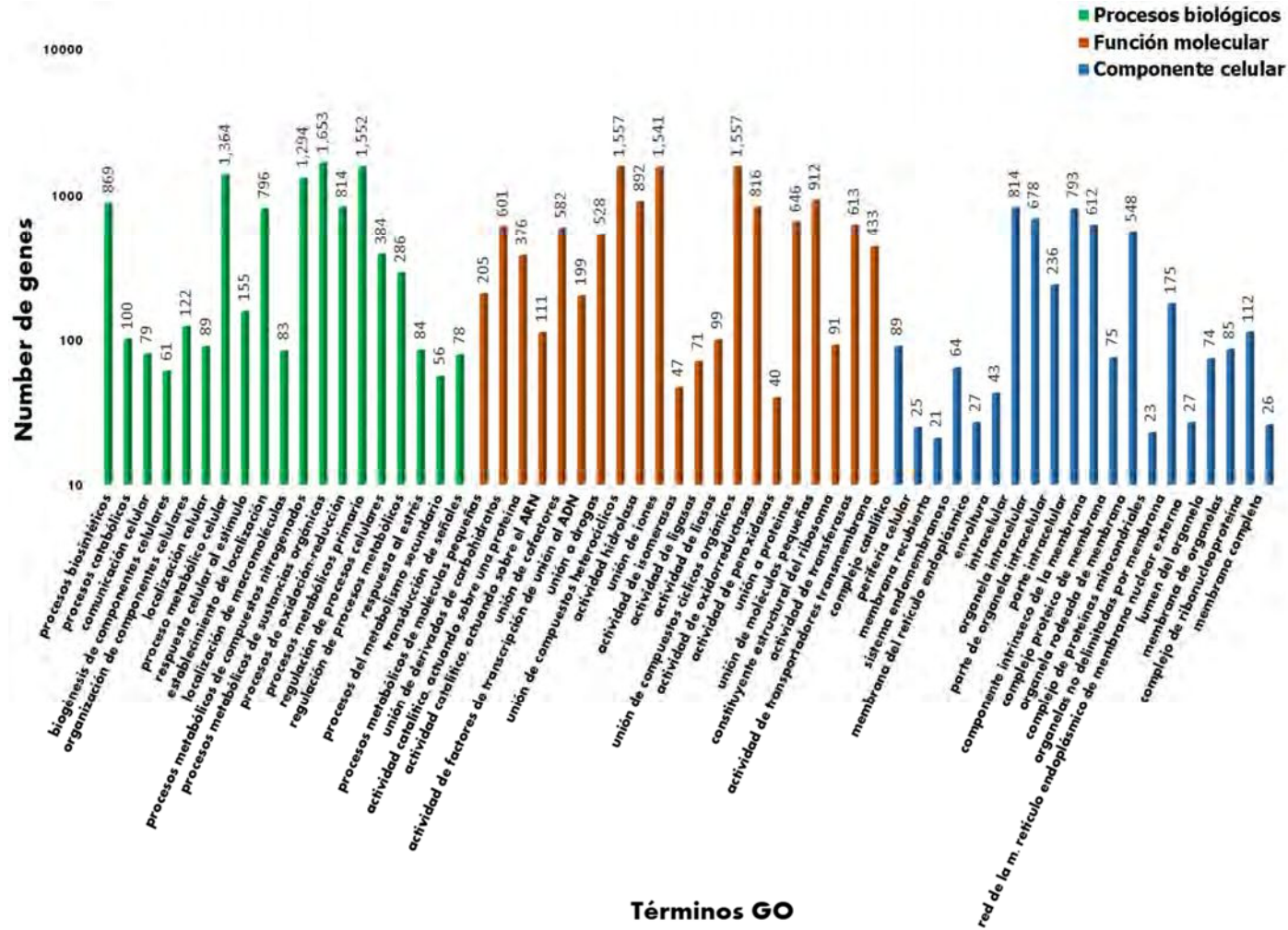


Figura 75. Histograma que representa la distribución de ontología génica de los genes anotados de *C. kikuchii* ARG_18_001. Los genes funcionalmente anotados fueron asignados a tres categorías principales de GO: Proceso Biológico (BP), Función Molecular (MF) y Componente Celular (CC).

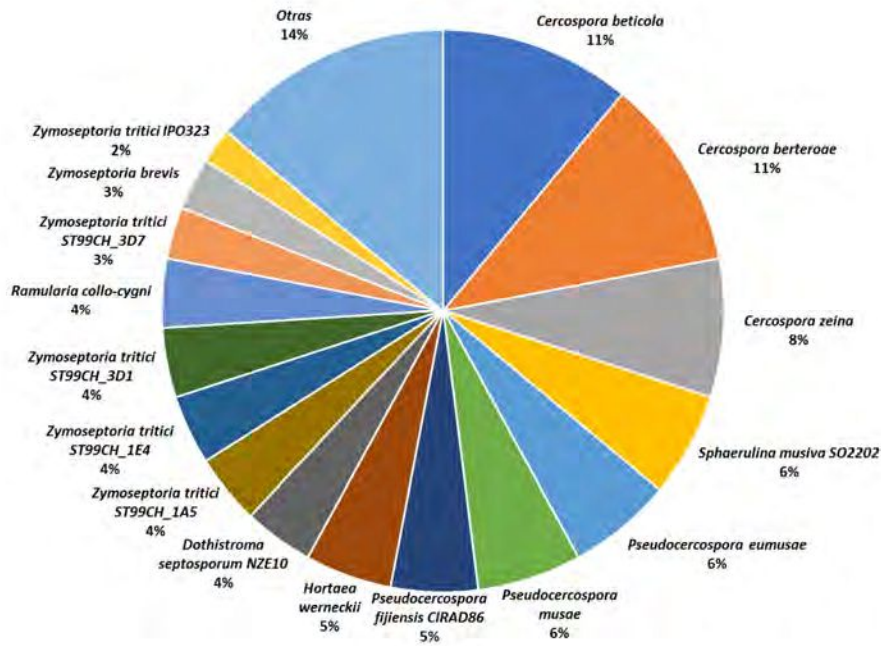


Figura 76. Gráfico circular que denota la distribución de especies basada en el BLAST hit superior de los genes *C. kikuchii* ARG_18_001 consultados contra la base de datos nr con un valor de corte E de $1E-10$. La categoría "Others" (Otros) incluye especies con menos del 1% de representación.

En el genoma obtenido se buscó mediante BLAST local las secuencias conocidas de los idiomorfos *MATI-1-1* (CB0940_05414, NC_036771.1:431992-433155) y *MATI-2-1* (NC_KC960689.1:7574-7761,7810-8111,8160-8845), en dos genomas de *C. beticola*. Solamente se encontró la secuencia de *MATI-1-1* en *C. kikuchii* ARG_18_001, lo que indicaría que *C. kikuchii* es heterotático. La secuencia de nucleótidos se encuentra conservada entre estas especies, donde solo se encontraron 5 SNPs, de los cuales solo 3 implican un cambio de aminoácido (Figura 77).

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|---------|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Identity | | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Cbeticola_CB0940_MAT1-1-1 | Frame 1 | A | T | G | G | C | C | A | C | T | G | A | D | C | G | C | C | A | T | G | A | C | A | G | A | G | A | G | T | F | C | C | G | R | A | A | T | C | T | A | Y | C | C | T | C | C | A | Q | G | T | C | S | T | T | G | C | A | G | S | T | G | A | E | G | G | A | D | C | A | T | M | G | G | C | A | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Ckikuchil_ARG_2018_001_MAT1-1-1 | Frame 1 | A | T | G | G | C | C | A | C | T | G | A | D | C | G | C | C | A | T | G | A | C | A | G | A | G | A | G | T | F | C | C | G | R | A | A | T | C | T | A | Y | C | C | T | C | C | A | Q | G | T | C | S | T | T | G | C | A | G | S | T | G | A | E | G | G | A | D | C | A | T | M | G | G | C | A | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Identity | | 70 80 90 100 110 120 130 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Cbeticola_CB0940_MAT1-1-1 | Frame 1 | A | C | C | C | A | A | T | C | A | T | T | G | G | T | G | C | G | C | T | G | C | A | G | C | A | G | A | G | C | A | G | G | A | A | G | C | C | G | C | G | C | G | T | G | C | A | A | A | N | T | G | C | A | G | C | A | C | C | C | A | G | S | C | A | T | M | G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Ckikuchil_ARG_2018_001_MAT1-1-1 | Frame 1 | A | C | C | C | A | A | T | C | A | T | T | G | G | T | G | C | G | C | T | G | C | A | G | C | A | G | A | G | C | A | G | G | A | A | G | C | C | G | C | G | C | G | T | G | C | A | A | A | N | T | G | C | A | G | C | A | C | C | C | A | G | S | C | A | T | M | G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Identity | | 140 150 160 170 180 190 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Cbeticola_CB0940_MAT1-1-1 | Frame 1 | A | C | T | G | C | C | A | C | T | G | G | C | T | C | T | G | C | C | G | T | G | G | C | G | A | A | G | A | C | C | G | A | G | A | A | G | A | G | C | A | G | C | G | C | A | A | G | A | A | G | G | C | G | A | A | A | T | C | T | G | A | T | C | T | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Ckikuchil_ARG_2018_001_MAT1-1-1 | Frame 1 | A | C | T | G | C | C | A | C | T | G | G | C | T | C | T | G | C | C | G | T | G | G | C | G | A | A | G | A | C | C | G | A | G | A | A | G | A | A | G | C | A | G | C | G | C | A | A | G | A | A | G | G | C | G | A | A | A | T | C | T | G | A | T | C | T | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Identity | | 200 210 220 230 240 250 260 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Cbeticola_CB0940_MAT1-1-1 | Frame 1 | G | A | G | A | C | C | G | G | A | G | G | G | C | P | A | A | K | G | C | R | A | C | P | G | C | T | C | A | A | N | C | T | C | S | C | T | G | W | G | A | T | G | G | C | A | T | A | T | C | G | R | C | A | A | A | T | A | C | T | A | C | A | N | C | A | G | A | G | T | V | G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Ckikuchil_ARG_2018_001_MAT1-1-1 | Frame 1 | G | A | G | A | C | C | G | G | A | G | G | G | C | P | A | A | K | G | C | R | A | C | P | G | C | T | C | A | A | N | C | T | C | S | C | T | G | W | G | A | T | G | G | C | A | T | A | T | C | G | R | C | A | A | A | T | A | C | T | A | C | A | N | C | A | G | A | G | T | V | G | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Identity | | 270 280 290 300 310 320 330 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Cbeticola_CB0940_MAT1-1-1 | Frame 1 | C | T | C | G | C | A | C | C | A | C | A | C | A | C | T | C | A | G | A | A | A | G | C | G | A | T | C | T | C | A | G | G | C | T | G | C | C | T | G | G | C | T | C | A | G | T | T | G | T | G | G | A | A | A | G | C | A | G | A | D | T | C | T | T | T | T | F | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Ckikuchil_ARG_2018_001_MAT1-1-1 | Frame 1 | C | T | C | G | C | A | C | C | A | C | A | C | A | C | T | C | A | G | A | A | A | G | C | G | A | T | C | T | C | A | G | G | C | T | G | C | C | T | G | G | C | T | C | A | G | T | L | T | G | T | G | G | A | A | A | G | C | A | G | A | D | T | C | T | T | T | F | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Identity | | 340 350 360 370 380 390 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Cbeticola_CB0940_MAT1-1-1 | Frame 1 | A | C | G | G | C | A | A | A | G | T | G | G | C | T | T | C | T | T | C | T | T | G | C | C | A | A | G | G | C | A | T | A | C | A | G | C | G | T | T | G | T | G | C | G | C | G | T | A | G | T | G | G | C | G | A | G | A | A | G | A | A | G | A | D | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Ckikuchil_ARG_2018_001_MAT1-1-1 | Frame 1 | A | C | G | G | C | A | A | A | G | T | G | G | C | T | T | C | T | T | G | C | C | A | A | G | G | C | A | T | A | C | A | G | C | G | T | T | G | T | G | C | G | C | G | T | A | G | T | G | G | C | G | A | G | A | A | G | A | A | G | A | D | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Identity | | 400 410 420 430 440 450 460 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Cbeticola_CB0940_MAT1-1-1 | Frame 1 | G | C | T | C | C | G | C | T | T | G | A | C | G | A | G | T | A | C | T | T | F | A | C | C | A | T | C | T | G | C | G | C | A | C | P | A | C | T | C | A | T | C | G | G | C | A | T | C | A | T | C | C | C | G | C | A | G | A | E | G | A | T | G | T | A | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Ckikuchil_ARG_2018_001_MAT1-1-1 | Frame 1 | G | C | T | C | C | G | C | T | T | G | A | C | G | A | G | T | A | C | T | T | F | A | C | C | A | T | C | T | G | C | G | C | A | C | P | A | C | T | C | A | T | C | G | G | C | A | T | C | A | T | C | C | C | G | C | A | G | A | E | G | A | T | G | T | A | T | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Identity | | 470 480 490 500 510 520 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Cbeticola_CB0940_MAT1-1-1 | Frame 1 | C | T | G | G | A | G | A | G | C | A | T | M | G | G | A | T | G | G | C | A | G | G | T | G | C | T | T | C | G | C | C | A | C | A | A | G | A | T | G | G | C | A | N | T | C | C | G | G | A | G | A | A | G | T | G | C | C | G | C | A | G | C | T | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Ckikuchil_ARG_2018_001_MAT1-1-1 | Frame 1 | C | T | G | G | A | G | A | G | C | A | T | M | G | G | A | T | G | G | C | A | G | G | T | G | C | T | T | C | G | C | C | A | C | A | A | G | A | T | G | G | C | A | N | T | C | C | G | G | A | G | A | A | G | T | G | C | C | G | C | A | G | C | T | C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Identity | | 530 540 550 560 570 580 590 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1. Cbeticola_CB0940_MAT1-1-1 | Frame 1 | G | T | G | C | G | C | A | G | S | C | T | F | C | G | A | E | G | C | P | G | T | S | C | C | T | C | G | A | D | C | T | G | C | T | T | T | G | A | C | G | A | A | G | A | E | G | C | A | H | C | A | C | C | A | C | G | A | C | C | A | A | T | C | T | C | G | G | T | G | T | V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. Ckikuchil_ARG_2018_001_MAT1-1-1 | Frame 1 | G | T | G | C | G | C | A | G | S | C | T | F | C | G | A | E | G | C | P | G | T | S | C | C | T | C | G | A | D | C | T | G | C | T | T | T | G | A | C | G | A | A | G | A | E | G | C | A | H | C | A | C | C | A | C | G | A | C | C | A | A | T | C | T | C | G | G | T | G | T | V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

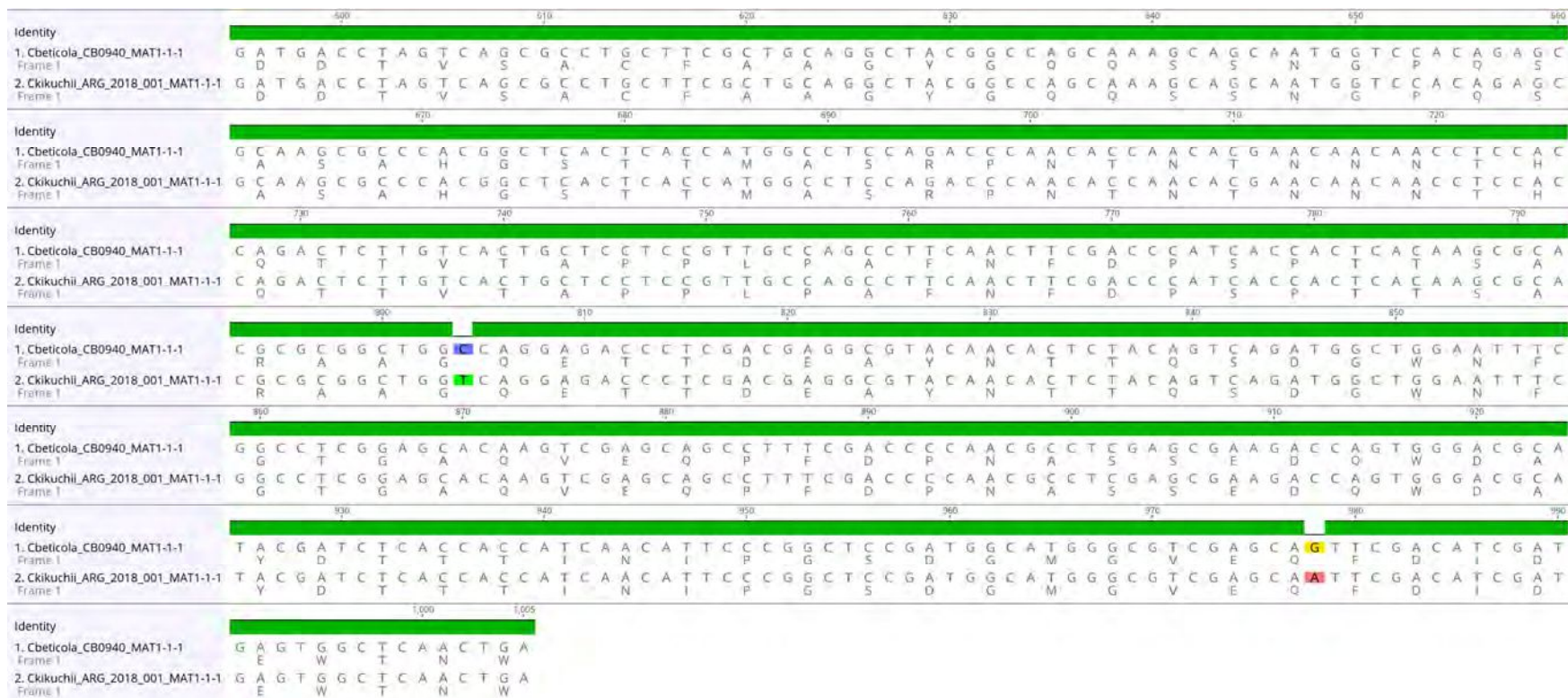


Figura 77. Secuencias de nucleótidos y amino ácidos para el gen *MAT1-1-1* de *C. beticola* CB0940 y *C. kikuchii* ARG_2018_001.

3.5. Secuenciación de genoma de referencia de *Cercospora sojina*

Se ensamblaron *de novo* un total de 40,318,888 lecturas, lo que resultó en 21 scaffolds de al menos 1,000 pb, con el scaffold más grande de 5,892,448 pb y un valor N50 de 4,909,984 pb. La profundidad de lectura media del ensamblado total (mean coverage of the total assembly) fue de 115.26 veces. El contenido de G + C fue del 53.14%. La predicción génica dio como resultado 14,856 modelos de genes con 14,115 genes codificantes de proteínas (Tabla 16). Las Tablas 17 y 18 proporcionan el resumen de los ARNs predichos y el resumen estadístico de los elementos repetitivos identificados, respectivamente. El genoma quedó conformado por 12 cromosomas nucleares y el mitochondrion (Tablas 19 y 20). El borrador del genoma secuenciado se encuentra públicamente disponible en GenBank NCBI NIH dentro del BioProject PRJNA560241 / BioSample SAMN19354503.

Tabla 16. Características del genoma de la cepa de *C. sojina* ARG_09_001.

| Características | <i>C. sojina</i> ARG_09_001 |
|--|-----------------------------|
| Longitud del ensamblado | 40,531,089 |
| Longitud de scaffolds (\geq 50000 bp) | 40,123,062 |
| Número de scaffolds (>1 kp) | 21 |
| Número de scaffolds (>25 kb) | 20 |
| Número de scaffolds (>50 kb) | 14 |
| Profundidad de cobertura de secuenciación | 115.26 |
| Contenido de GC (%) | 53.14 |
| Número de genes codificadores de proteínas predichos | 14,115 |
| Densidad de genes (genes/Mb) | 348.25 |
| Longitud promedio de transcritos (pb) | 1,473.0 |
| Longitud promedio de CDS (secuencia codificante) | 1,324.4 |
| Longitud promedio de proteínas (aa) | 441.5 |
| Longitud promedio de exones | 553.4 |
| Longitud promedio de intrones | 106.7 |
| Genes con splicing | 9,526 (67.49%) |
| Número total de introns | 19,665 |
| Número medio de intrones por gen | 2.0 |
| Número de exones totales | 33,780 |
| Número medio de exones por gen | 2.0 |

Tabla 17. Resumen de ARNs predichos en el genoma ensamblado de *C. sojina* ARG_09_001.

| ARNs | Número |
|----------------------|--------------|
| rRNAs nucleares | 2 (18s y 8s) |
| tRNAs nucleares | 328 |
| tRNAs mitocondriales | 238 |
| rRNAs mitocondriales | 30 |
| genes mitocondriales | 215 |

Tabla 18. Resumen de elementos repetitivos en el genoma ensamblado de *C. sojina* ARG_09_001.

| Resumen | Número |
|---|-----------------|
| Total de bases enmascaradas | 347,375 (0.86%) |
| Numero de repeticiones simples | 6792 |
| Número de repeticiones de baja complejidad | 703 |
| Número de transposones de ADN | 139 |
| Número de LTRs (Long terminal repeats) | 16 |
| Número de LINEs (Long interspersed nuclear elements) | 280 |
| Número de SINEs (Short interspersed nuclear elements) | 118 |

Tabla 19. Cromosomas del genoma ensamblado de *C. sojina* ARG_09_001.

| Sequence ID | Nombre del cromosoma | Completo | Circular |
|--------------|----------------------|----------|----------|
| Cs2018_chr1 | I | si | no |
| Cs2018_chr2 | II | si | no |
| Cs2018_chr3 | III | si | no |
| Cs2018_chr4 | IV | si | no |
| Cs2018_chr5 | V | si | no |
| Cs2018_chr6 | VI | si | no |
| Cs2018_chr7 | VII | si | no |
| Cs2018_chr8 | VIII | si | no |
| Cs2018_chr9 | IX | si | no |
| Cs2018_chr10 | X | si | no |
| Cs2018_chr11 | XI | si | no |
| Cs2018_chr12 | XII | si | no |

Tabla 20. Mitochondrion del genoma ensamblado de *C. sojina* ARG_09_001.

| Sequence ID | Tipo | Completo |
|--------------|---------------|----------|
| Cs2018_mito1 | mitochondrion | no |
| Cs2018_mito2 | mitochondrion | no |
| Cs2018_mito3 | mitochondrion | no |
| Cs2018_mito4 | mitochondrion | no |
| Cs2018_mito5 | mitochondrion | no |
| Cs2018_mito6 | mitochondrion | no |
| Cs2018_mito7 | mitochondrion | no |
| Cs2018_mito8 | mitochondrion | no |
| Cs2018_mito9 | mitochondrion | no |

3.6. Identificación filogenética de los aislados

3.6.1. Análisis filogenético molecular de aislados argentinos

Los 42 aislados utilizados para estudiar la relación filogenética de *Cercospora* spp. agentes causales de TH/MPS en Argentina (incluyendo 39 aislados argentinos y 3 bolivianos) (Tabla 21) se distribuyeron entre ocho linajes (Figura 78). La mayoría de las especies previamente circunscritas representadas por múltiples aislados en la filogenia multilocus concatenada fueron moderada a fuertemente apoyadas como monofiléticas tanto en el análisis bayesiano como en el de máxima verosimilitud (Figura 78). Las especies que son parafiléticas o polifiléticas incluyen *Cercospora chenopodii*, *C. apii*, *C. cf. flagellaris*, *C. richardiicola* y *C. kikuchii*. En cada uno de estos casos, otras especies están anidadas dentro del clado que de otro modo incluye aislados conoespecíficos. *Cercospora pseudochenopodii* está anidada dentro del clado que incluye aislados de *C. chenopodii*. Los aislados de *C. uwebrauniana* y *C. gamsiana* están anidados dentro del clado que incluye todos los aislados de *C. apii*. Los aislados de *Cercospora cf. flagellaris* se dividen en múltiples subclados (*subclades*) que incluyen aislados de *C. gossypii*, *C. cf. brunckii* y *C. convolvulicola*. *Cercospora richardiicola* es polifilética con *C. sigesbeckiae*, *C. sp. N*, *C. sp. M* y *C. rodmanii*, y se mencionan a continuación como el “complejo *C. richardiicola*” (*C. richardiicola* complex, CRC). Finalmente, *C. kikuchii* es parafilético con *C. cf. maloti*, *C. sp. O*, *C. sp. Q* y *C. sp. P* anidado dentro del clado que incluye todos los aislados de *C. kikuchii*. Este clado que incluye aislados de *C. kikuchii*, al que nos referiremos como el “complejo *C. kikuchii*” (*C. kikuchii* complex, CKC), contiene la mayoría de los aislados recolectados para este estudio, incluidos 30 aislados de Argentina (1 recolectado en 2014, 25 en 2016, 1 en 2018 y 3 en 2019) y un aislado de Bolivia. De estos aislados, 30 se asignan a *C. kikuchii* en base al análisis concatenado multilocus y el aislado restante recuperado a partir del hospedante alternativo *Araujia hortorum*, ARG_19_057 de Argentina, se asigna a *C. sp. O* a pesar de ser débilmente compatible como hermano de un solo aislado de *C. sp. O*. Cuatro de los 11 aislados restantes están anidados dentro del CRC (ARG_16_080, ARG_16_120, ARG_16_227 y BOL_17_026), y para los otros cinco su afinidad con cualquier especie descrita previamente no está clara. Se asignó un único aislado dentro del CRC a *C. sp. M* basado en una relación hermana débilmente apoyada con un solo aislado de *C. sp. M* (*C. sp. M_CPC_10553*). Cuatro de los seis aislados restantes fueron asignados a *C. sp. H* (ARG_19_003, ARG_19_006), *C. sp. G* (ARG_16_421) y *C. nicotianae* (BOL_17_034). Los dos últimos aislados no pudieron asignarse definitivamente a una especie debido a su ubicación incierta en la filogenia concatenada. El aislado ARG_16_277 fue débilmente apoyado como hermano de *C. canescens* en la filogenia concatenada multilocus, pero en la filogenia individual de *gapdh*, *his3* y *tefl* este aislado fue fuertemente apoyado como hermano del aislado BOL_17_034, por lo tanto, fue asignado a *C. nicotianae*. El último aislado restante, ARG_19_015, no se asignó a una especie (*especies indet.*) porque su ubicación varió considerablemente entre las filogenias de *locus* individuales. Este aislado fue débilmente apoyado como hermano de *C. sp. H* en la filogenia de *actA*, incierta en la de *his3*, débilmente

apoyado como hermano de *C. sp. G* en la de *tefl*, fuertemente apoyado como anidado dentro de *C. sp. G* en la de *gapdh*, y estrechamente relacionado con aislados de *C. kikuchii* y *C. fagopyri*, aunque con soporte débil, en la filogenia de *cmdA*.

Este es el primer reporte de *C. kikuchii* y *C. sp. O* aislados a partir de *Araujia hortorum*, y *C. sp. H* a partir de *Amaranthus hybridus* (Sautua et al., 2020b).

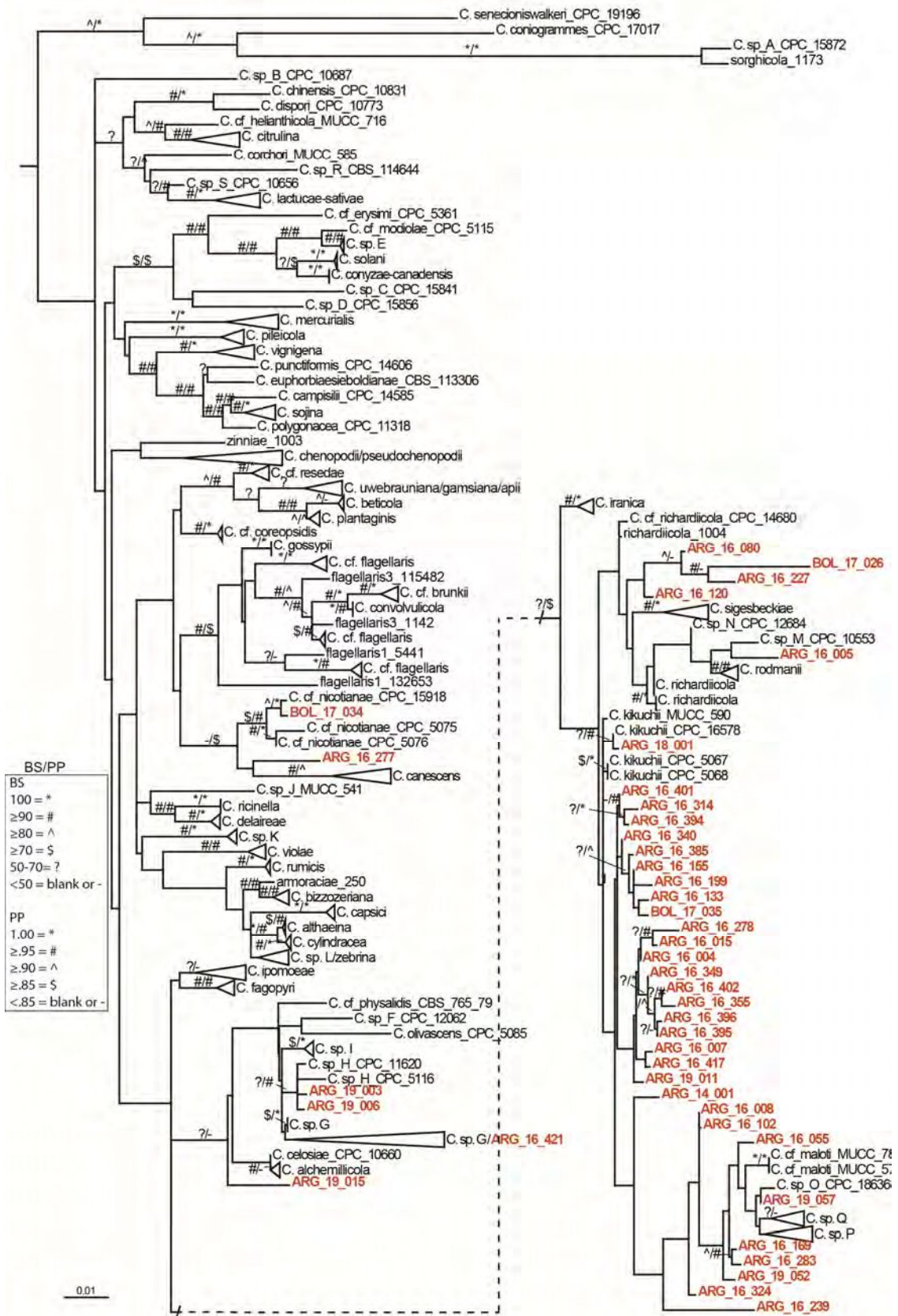


Figura 78. Filogenia de máxima probabilidad (*Maximum likelihood phylogeny*) del género *Cercospora* inferida de una alineación concatenada de secuencias parciales de los genes *nrITS*, *actA*, *cmdA*, *gapdh*, *his3* y *tefl*. Los aislados recolectados y secuenciados para este estudio se resaltan en letra roja y negrita. El árbol está enraizado con *Septoria provencialis*. Algunos clados que no son el foco de este estudio se han colapsado para fines de visualización. Los valores de soporte de bootstrap de máxima verosimilitud (*Maximum-likelihood bootstrap support*, BS) superiores al 50% y las probabilidades posteriores bayesianas (*Bayesian poster probabilities*, PP) superiores a 0,85 se muestran en las ramas (BS/PP). Los símbolos representan el rango de valores indicado en la leyenda. Se encontraron ramas sin etiquetar en la búsqueda de árbol de máxima probabilidad, pero no se encontraron con una frecuencia mayor o igual al 50% entre las búsquedas de réplica de arranque (*bootstrap replicate searches*) y no estuvieron presentes o recibieron poco apoyo (<0,85) en el análisis bayesiano. La barra de escala representa el número estimado de sustituciones por sitio.

Tabla 21. Asignación de especies a cada aislado argentino según el análisis filogenético multilocus.

| Nº | Identificación de aislado | Identidad de especie | Año de aislamiento | Especie hospedante | Variedad de soja | Órgano muestreado | País | Provincia | Localidad |
|----|---------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|-----------|--------------|---------------|
| 1 | ARG_2014_001 | <i>C. kikuchii</i> | 2014 | <i>Glycine max</i> | DM 4670 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Pergamino |
| 2 | ARG_2016_004 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4619 iPRO | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 3 | ARG_2016_005 | <i>C. sp. M</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4619 iPRO | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 4 | ARG_2016_007 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | FN 4.5 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 5 | ARG_2016_008 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | LT 4914 iPRO | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 6 | ARG_2016_015 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | LDC 3.7 | hoja | Argentina | Buenos Aires | Herrera Vegas |
| 7 | ARG_2016_055 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4612 | hoja | Argentina | Buenos Aires | Pergamino |
| 8 | ARG_2016_080 | CRC ^a | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 3810 | hoja | Argentina | Buenos Aires | America |
| 9 | ARG_2016_102 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 6909 iPRO | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas |
| 10 | ARG_2016_120 | CRC | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 6248 RG | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas |
| 11 | ARG_2016_133 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 5909 RG | semilla | Argentina | Salta | Olleros |
| 12 | ARG_2016_155 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 8277 iPRO STS | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas |
| 13 | ARG_2016_169 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 6161 iPRO STS | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas |
| 14 | ARG_2016_199 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | Yanasu | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Palomar |
| 15 | ARG_2016_227 | CRC | 2016 | <i>Glycine max</i> | CZ 6505 B | semilla | Argentina | Tucuman | San Agustin |
| 16 | ARG_2016_239 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | Tarpusqa | semilla | Argentina | Tucuman | San Agustin |
| 17 | ARG_2016_277 | <i>C. nicotianae</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | RA 5715 iPRO | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Garmendia |
| 18 | ARG_2016_278 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 6262 iPRO RSF | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Garmendia |
| 19 | ARG_2016_283 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | MS 6.9 iPRO | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Garmendia |
| 20 | ARG_2016_314 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4612 | semilla | Argentina | Cordoba | Marcos Juarez |
| 21 | ARG_2016_324 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4214 STS | semilla | Argentina | Buenos Aires | Tandil |
| 22 | ARG_2016_340 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 3070 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Energía |

| | | | | | | | | | |
|----|--------------|----------------------|------|----------------------------|------------------|---------|-----------|--------------|-----------------|
| 23 | ARG_2016_349 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4210 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Pieress |
| 24 | ARG_2016_355 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | LDC 3.7 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Tandil |
| 25 | ARG_2016_385 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4214 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Azul |
| 26 | ARG_2016_394 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4712 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Otamendi |
| 27 | ARG_2016_395 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 3302 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Miramar |
| 28 | ARG_2016_396 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 3810 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Gral. Madariaga |
| 29 | ARG_2016_401 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | NA 4413 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Balcarce |
| 30 | ARG_2016_402 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 4619 iPRO STS | semilla | Argentina | Buenos Aires | Chapadmalal |
| 31 | ARG_2016_417 | <i>C. kikuchii</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 5419 iPRO | semilla | Argentina | Buenos Aires | Arrecifes |
| 32 | ARG_2016_421 | <i>C. sp. G</i> | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 7709 iPRO STS | semilla | Argentina | Entre Ríos | La Paz |
| 33 | BOL_2017_026 | CRC | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | Santa Cruz |
| 34 | BOL_2017_034 | <i>C. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | Santa Cruz |
| 35 | BOL_2017_035 | <i>C. kikuchii</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | Santa Cruz |
| 36 | ARG_2018_001 | <i>C. kikuchii</i> | 2018 | <i>Glycine max</i> | DM 62R63 STS RSF | semilla | Argentina | Buenos Aires | San Pedro |
| 37 | ARG_2019_003 | <i>C. sp. H</i> | 2019 | <i>Amaranthus hybridus</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado |
| 38 | ARG_2019_006 | <i>C. sp. H</i> | 2019 | <i>Amaranthus hybridus</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado |
| 39 | ARG_2019_011 | <i>C. kikuchii</i> | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado |
| 40 | ARG_2019_012 | nd ^b | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado |
| 41 | ARG_2019_013 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado |
| 42 | ARG_2019_014 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado |
| 43 | ARG_2019_015 | species indet. | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado |
| 44 | ARG_2019_016 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado |
| 45 | ARG_2019_017 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado |
| 46 | ARG_2019_018 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 47 | ARG_2019_019 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |

| | | | | | | | | | |
|----|--------------|--------------------|------|-------------------------|---------------|------|-----------|--------------|---------------------|
| 48 | ARG_2019_020 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 49 | ARG_2019_029 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma |
| 50 | ARG_2019_030 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma |
| 51 | ARG_2019_031 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma |
| 52 | ARG_2019_032 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma |
| 53 | ARG_2019_033 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma |
| 54 | ARG_2019_034 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma |
| 55 | ARG_2019_035 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma |
| 56 | ARG_2019_036 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma |
| 57 | ARG_2019_037 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 58 | ARG_2019_038 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 59 | ARG_2019_039 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 60 | ARG_2019_040 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 61 | ARG_2019_041 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 62 | ARG_2019_042 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 63 | ARG_2019_043 | nd | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand |
| 64 | ARG_2019_052 | <i>C. kikuchii</i> | 2019 | <i>Araujia hortorum</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | San Andrés de Giles |
| 65 | ARG_2019_057 | <i>C. sp. O</i> | 2019 | <i>Araujia hortorum</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | San Andrés de Giles |

^a CRC, complejo *C. richardiicola*; ^b nd, no determinado en el presente estudio.

3.6.2. Análisis filogenético de aislados bolivianos

Un segundo análisis incluyó 37 aislados bolivianos (Tabla 22). Las secuencias de *cmdA* representaron tres especies distintas basadas en un análisis filogenético multilocus preliminar que incorpora todas las especies conocidas representadas por datos de secuencias disponibles públicamente de Groenewald et al. (2013). Se seleccionaron dos aislados representativos de cada linaje (con distintos haplotipos de calmodulina) para la secuenciación de dos *loci* adicionales, la *his3* y *tefl*, para la identificación de especies como se describió anteriormente (Albu et al. 2016b). Según el análisis filogenético multilocus correspondiente, los 37 aislados bolivianos estudiados pertenecen a tres especies, *C. nicotianae* (N = 14), *C. sp. "P"* (N = 16), un linaje delimitado pero no descrito formalmente por Groenewald et al. (2013) y *C. kikuchii* (N = 7).

Tabla 22. Asignación de especies a cada aislado boliviano según el análisis filogenético multilocus.

| Nº | Identificación de aislado | Identidad de especie | Año de aislamiento | Especie hospedante | Variedad de soja | Órgano muestreado | País | Localidad |
|----|---------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|---------|------------|
| 1 | BOL_2017_001 | <i>C. kikuchii</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 2 | BOL_2017_002 | <i>C. sp. "P"</i> ^a | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 3 | BOL_2017_003 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 4 | BOL_2017_004 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 5 | BOL_2017_005 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 6 | BOL_2017_006 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 7 | BOL_2017_007 | <i>C. kikuchii</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 8 | BOL_2017_008 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 9 | BOL_2017_009 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 10 | BOL_2017_010 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 11 | BOL_2017_011 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 12 | BOL_2017_012 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 13 | BOL_2017_013 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 14 | BOL_2017_014 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 15 | BOL_2017_015 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 16 | BOL_2017_016 | <i>C. kikuchii</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 17 | BOL_2017_017 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 18 | BOL_2017_018 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 19 | BOL_2017_019 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 20 | BOL_2017_020 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 21 | BOL_2017_021 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 22 | BOL_2017_022 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |

| | | | | | | | | |
|----|--------------|--------------------------|------|--------------------|---------------|------|---------|------------|
| 23 | BOL_2017_023 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 24 | BOL_2017_024 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 25 | BOL_2017_025 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 26 | BOL_2017_026 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 27 | BOL_2017_027 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 28 | BOL_2017_028 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 29 | BOL_2017_029 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 30 | BOL_2017_030 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 31 | BOL_2017_031 | <i>C. kikuchii</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 32 | BOL_2017_032 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 33 | BOL_2017_033 | <i>C. cf. nicotianae</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 34 | BOL_2017_034 | <i>C. kikuchii</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 35 | BOL_2017_035 | <i>C. kikuchii</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 36 | BOL_2017_036 | <i>C. sp. "P"</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 37 | BOL_2017_037 | <i>C. kikuchii</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz |
| 38 | BOL_2017_038 | <i>C. kikuchii</i> | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz |

^a *C. sp. "P"*, un linaje delimitado, pero no descrito formalmente por Groenewald et al. (2013)

3.7. Identificación y confirmación de *Cercospora cf. nicotianae* como agente causal del TH

A partir de muestras foliares sintomáticas recolectadas en Santa Cruz, Bolivia, se aislaron 14 cepas (BOL_2017_004, ..._005, ..._007, ..._010, ..._011, ..._012, ..._015, ..._016, ..._018, ..._021, ..._022, ..._029, ..._031, ..._034) que, de acuerdo con el análisis filogenético, pertenecen a la especie *C. cf. nicotianae* (Tabla 22) (Sautua et al., 2019a). Después del aislamiento e incubación, se desarrollaron colonias monospóricas en APD. En SLDA, las colonias grisáceas y blancas produjeron micelios aéreos que cubrieron toda la superficie de las placas de Petri y produjeron conidios después de 21 días de incubación (Figura 79, F, G). Los conidióforos fueron de color marrón oscuro, paredes gruesas, solitarios, rectos o geniculados, de ancho uniforme, multi-septados y de tamaño comprendido entre (135.8-) 199.2 (-372.3) x (2.5-) 4.3 (-5.5) μm con (5-) 16 (-26) septos. Se observaron conidios hialinos, solitarios, rectos, en forma de aguja, truncados en la base, agudos en la punta, de ancho uniforme, indistintamente septados (Figura 79, C-E). El tamaño promedio de 113 conidios colectados a partir de 11 aislados fue de (62.0-) 141.8 (-260.0) x (2.0-) 3.8 (-4.6) μm con (3-) 17 (-25) tabiques. La morfología fue consistente con descripciones previas de *C. nicotianae* (Hsieh y Goh, 1990).

En las pruebas de patogenicidad en invernáculo, dentro de los 21 días posteriores a la inoculación, las hojas exhibieron, por un lado, síntomas de tizón similares a los observados en el campo (Figura 79, A) y, por otro lado, algunas hojas mostraron síntomas similares a manchas (Figura 79, B). Estas manchas se asemejaron a la mancha ojo de rana de la soja causada por *Cercospora sojina* Hara (Carmona et al. 2009), y la mancha ojo de rana en el tabaco causada por *C. nicotianae* (Shew y Lucas 1991; Hartman et al. 2015). Las lesiones extirpadas se incubaron y luego se examinaron microscópicamente para medir conidios y conidióforos, confirmando que *C. cf. nicotianae* fue el agente causal. Por otro lado, se observaron síntomas típicos de TH en las plantas inoculadas con el aislado de referencia *C. kikuchii* ARG_18_001.



Figura 79. Mancha foliar causada por *Cercospora* cf. *nicotianae* a los 26 dpi (A: variedad de soja DM 4612; B: variedad de soja DM 4915), primer plano de la esporulación en hojas de soja (C a E, variedad DM 4612), y colonias creciendo en APD a los 7 días de incubación a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, recuperado de las pruebas de patogenicidad (F: variedad de soja DM 4612; G: variedad de soja NS 5019). Dpi = días post inoculación.

Todas las variedades inoculadas se infectaron y mostraron síntomas de TH. La incidencia de la enfermedad en plantas inoculadas fue del 100%. No hubo respuesta diferencial entre los cultivares. Los controles negativos fueron asintomáticos. Las hojas sintomáticas se incubaron en cámara húmeda como se describió anteriormente. Los aislados se recuperaron de todas las variedades de soja inoculadas, y los conidios, conidióforos y cultivos monospóricos se parecían al inóculo original en APD (Figura 79, C-G), completando los postulados de Koch. En suma, la morfología de los conidios y colonias en APD y SLDA, las pruebas de patogenicidad y la identificación molecular confirmaron que el agente causal de los tejidos sintomáticos es *C. cf. nicotianae*. El presente estudio confirma por primera vez que *C. cf. nicotianae*, previamente asociado con el TH (Sautua et al., 2019a), es un agente causante del TH de la soja (Sautua et al., 2020a).

3.8. Identificación y comparación de genes de patogenicidad y virulencia en especies fitopatógenas de *Cercospora*

3.8.1. Grupos de genes ortólogos

Las especies que comparten un mayor grupo de genes ortólogos con *C. kikuchii* son *C. sigesbeckiae* (13436), *C. flagellaris* (12230), *C. nicotianae* (12139), *C. sojina* (11057) y *C. beticola* (10993) (Tabla 23). Entre estos, *C. kikuchii*, *C. sigesbeckiae*, *C. flagellaris*, *C. nicotianae* y *C. sojina* son patógenos de soja, y todos ellos excepto *C. sojina* son agentes causales del TH/MPS.

Tabla 23. Grupos de proteínas ortólogas predichos con OrthoMCL en función de la similitud de secuencia con *C. kikuchii* ARG_18_001.

| Comparación de especies | Nº genes ortólogos compartidos con <i>C. kikuchii</i> |
|-------------------------|---|
| CKIK - CSIG | 13436 |
| CKIK - CFLA | 12230 |
| CKIK - CNIC | 12139 |
| CKIK - CSOJ11 | 11057 |
| CKIK - CSOJ15 | 11049 |
| CKIK - CSOJ1 | 11045 |
| CKIK - CBET | 10993 |
| CKIK - CZEI | 9048 |
| CKIK - CBRA | 8683 |
| CKIK - RCOL | 8096 |
| CKIK - ZTRI | 7402 |
| CKIK - ARAB | 6565 |
| CKIK - ATHA | 2347 |

CKIK - CSIG = 13436

CKIK - CSIG - CFLA = 12023

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC = 11585

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC - CSOJ11 = 10450

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC - CSOJ11 - CSOJ15 = 10381

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC - CSOJ11 - CSOJ15 - CSOJ1 = 10333

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC - CSOJ11 - CSOJ15 - CSOJ1 - CBET = 9726

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC - CSOJ11 - CSOJ15 - CSOJ1 - CBET - CZEI = 8239

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC - CSOJ11 - CSOJ15 - CSOJ1 - CBET - CZEI - CBRA = 6436

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC - CSOJ11 - CSOJ15 - CSOJ1 - CBET - CZEI - CBRA - RCOL = 5445

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC - CSOJ11 - CSOJ15 - CSOJ1 - CBET - CZEI - CBRA - RCOL - ZTRI = 4867

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC - CSOJ11 - CSOJ15 - CSOJ1 - CBET - CZEI - CBRA - RCOL - ZTRI - ARAB = 4133

CKIK - CSIG - CFLA - CNIC - CSOJ11 - CSOJ15 - CSOJ1 - CBET - CZEI - CBRA - RCOL - ZTRI - ARAB - ATHA = 1597

Tomando como referencia el genoma de *C. sojina* raza 11 de Argentina (Tabla 24):

Tabla 24. Grupos de proteínas ortólogas predichos con OrthoMCL en función de la similitud de secuencia con *C. sojina* ARG_2009_001 raza 11.

| Comparación de especies | Nº genes ortólogos compartidos con <i>C. sojina</i> |
|-------------------------|---|
| CSOJ11 - CSOJ1 | 13049 |
| CSOJ11 - CSOJ15 | 13003 |
| CSOJ11 - CSIG | 11079 |
| CSOJ11 - CFLA | 11062 |
| CSOJ11 - CNIC | 11060 |
| CSOJ11 - CKIK | 11057 |
| CSOJ11 - CBET | 10305 |
| CSOJ11 - CZEI | 8844 |
| CSOJ11 - CBRA | 7922 |
| CSOJ11 - RCOL | 7917 |
| CSOJ11 - ZTRI | 7268 |
| CSOJ11 - ARAB | 6456 |
| CSOJ11 - ATHA | 2337 |

CSOJ11 - CSOJ1 = 13049

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 = 12708

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG = 10901

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG - CFLA = 10582

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG - CFLA - CNIC = 10407

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG - CFLA - CNIC - CKIK = 10333

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG - CFLA - CNIC - CKIK - CBET = 9726

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG - CFLA - CNIC - CKIK - CBET - CZEI = 8239

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG - CFLA - CNIC - CKIK - CBET - CZEI - CBRA = 6436

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG - CFLA - CNIC - CKIK - CBET - CZEI - CBRA - RCOL = 5445

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG - CFLA - CNIC - CKIK - CBET - CZEI - CBRA - RCOL - ZTRI = 4867

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG - CFLA - CNIC - CKIK - CBET - CZEI - CBRA - RCOL - ZTRI - ARAB = 4133

CSOJ11 - CSOJ1 - CSOJ15 - CSIG - CFLA - CNIC - CKIK - CBET - CZEI - CBRA - RCOL - ZTRI - ARAB - ATHA = 1597

3.8.2. Genes de patogenicidad y virulencia

3.8.2.1. Efectores

Los efectores NS1, AVR4, Nip1, CB0940_10646 y Cs_07324 fueron localizados en el genoma de *C. kikuchii* ARG_18_001 y *C. sojina* raza 11 (Tabla 25). Todas las especies analizadas tienen el efector NIS1, el cual se encuentra altamente conservado entre las especies analizadas (Figura 80). Todas las especies analizadas tienen el efector AVR4, pero la secuencia es diferente en *C. sojina*. Para este efector la secuencia de aminoácidos en *C. sojina* es más corta que el resto de las especies de *Cercospora* (Figuras 81 y 82). Asimismo, existe poca variabilidad entre las especies exploradas para los efectores Nip1 (CBET3_03921) y CBET3_10646 (Figuras 83 y 84, respectivamente). En *C. beticola*, se predijo que los sitios de escisión del péptido señal estaban entre los residuos 18 y 19 para Nip1 (CBET3_03921) y entre 16 y 17 para CBET3_10646. El efector Cs_07324 también se encuentra conservado entre especies, con pocas posiciones para las cuales existen SNPs (Figura 85).



Figura 80. Secuencia de péptidos del efector NIS1 en especies de *Cercospora*.



Figura 81. Secuencia de péptidos del efector AVR4 en especies de *Cercospora* (*C. fulvum* = *Cladosporium fulvum*).



Figura 82. Alineación de secuencia de aminoácidos del efector AVR4 en especies de *Cercospora*. Ck = *C. kikuchii*, Csg = *C. sigesbeckiae*, Cbr = *C. brassicicola*, Ca = *C. apii*, Cn = *C. nicotianae*, Cz = *C. zeina*, Cf = *C. flagellaris*, Cs15 = *C. sojina* raza 15, *C. sojina* raza 1, *C. sojina* raza 11.

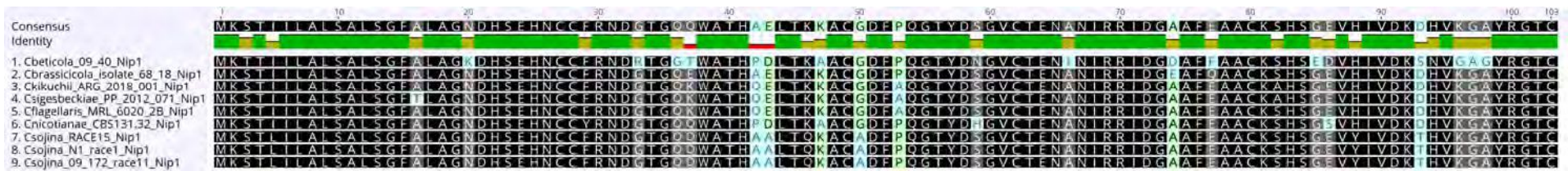


Figura 83. Secuencia de péptidos del efector Nip1 en especies de *Cercospora*.



Figura 84. Secuencia de péptidos del efector CB0940_10646 en especies de *Cercospora*.



Figura 85. Secuencia de péptidos del efector Cs_07324 en especies de *Cercospora*.

3.8.2.1. Melanina- DHN cluster

En todas las especies analizadas se encontraron los 4 genes del cluster de genes biosintéticos de la melanina-DHN descritos por Ebert et al. (2019) para *C. beticola* (CB0940_09636 = THN-reductasa, CB0940_0967 = factor de transcripción CMR1, CB0940_09638 = DHN-melanina PKS, CB0940_09639 = prefoldina) (Tabla 25, Figuras 86 a 91). Se evidenció mayor variabilidad entre especies para las secuencias homólogas a CB0940_09636 y CB0940_09639; y menos variables para CB0940_09637 y CB0940_09638. La DHN-melanina PKS, enzima clave del cluster (CB0940_09638), se encuentra altamente conservada entre las especies de *Cercospora* aquí exploradas hasta la posición 1755, a partir de la cual las especies *C. beticola* y *C. nicotianae* se diferencian del resto en su secuencia de aminoácidos.

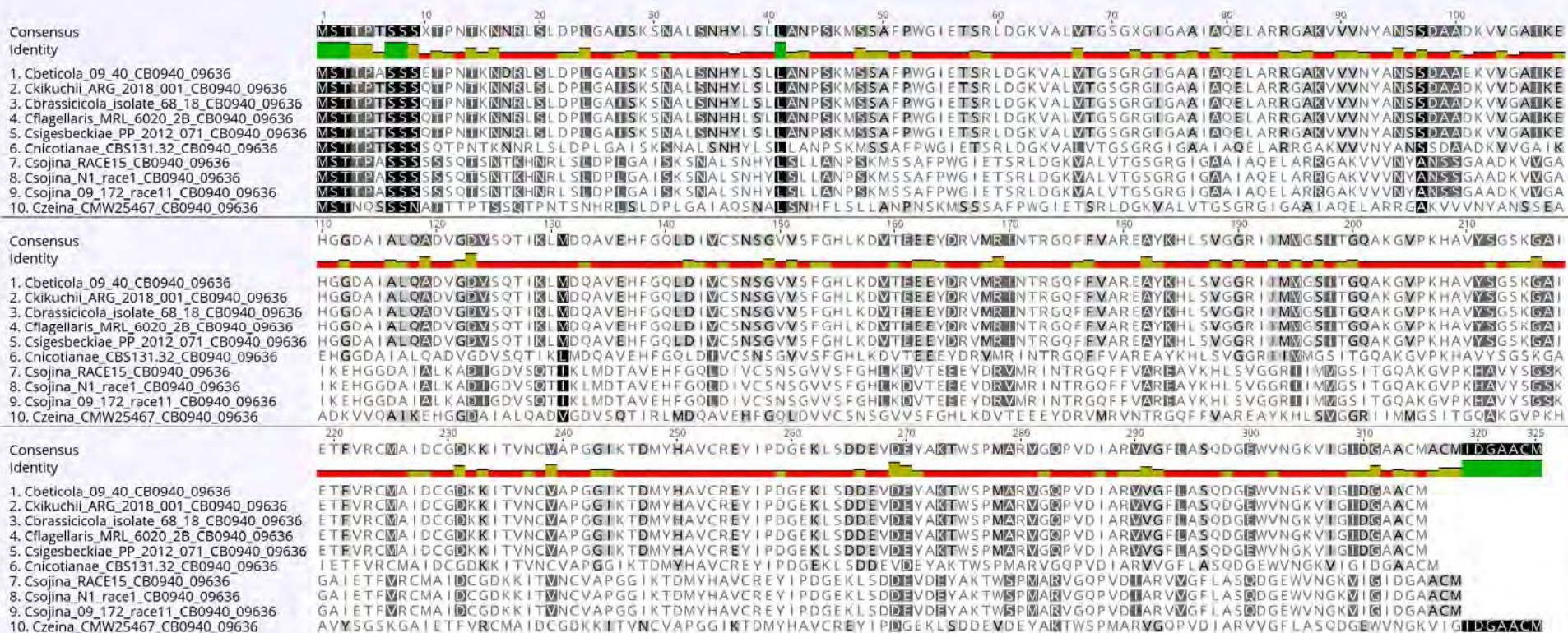


Figura 86. Secuencia de péptidos del gen CB0940_09636 (THN-reductasa) en especies de *Cercospora*.

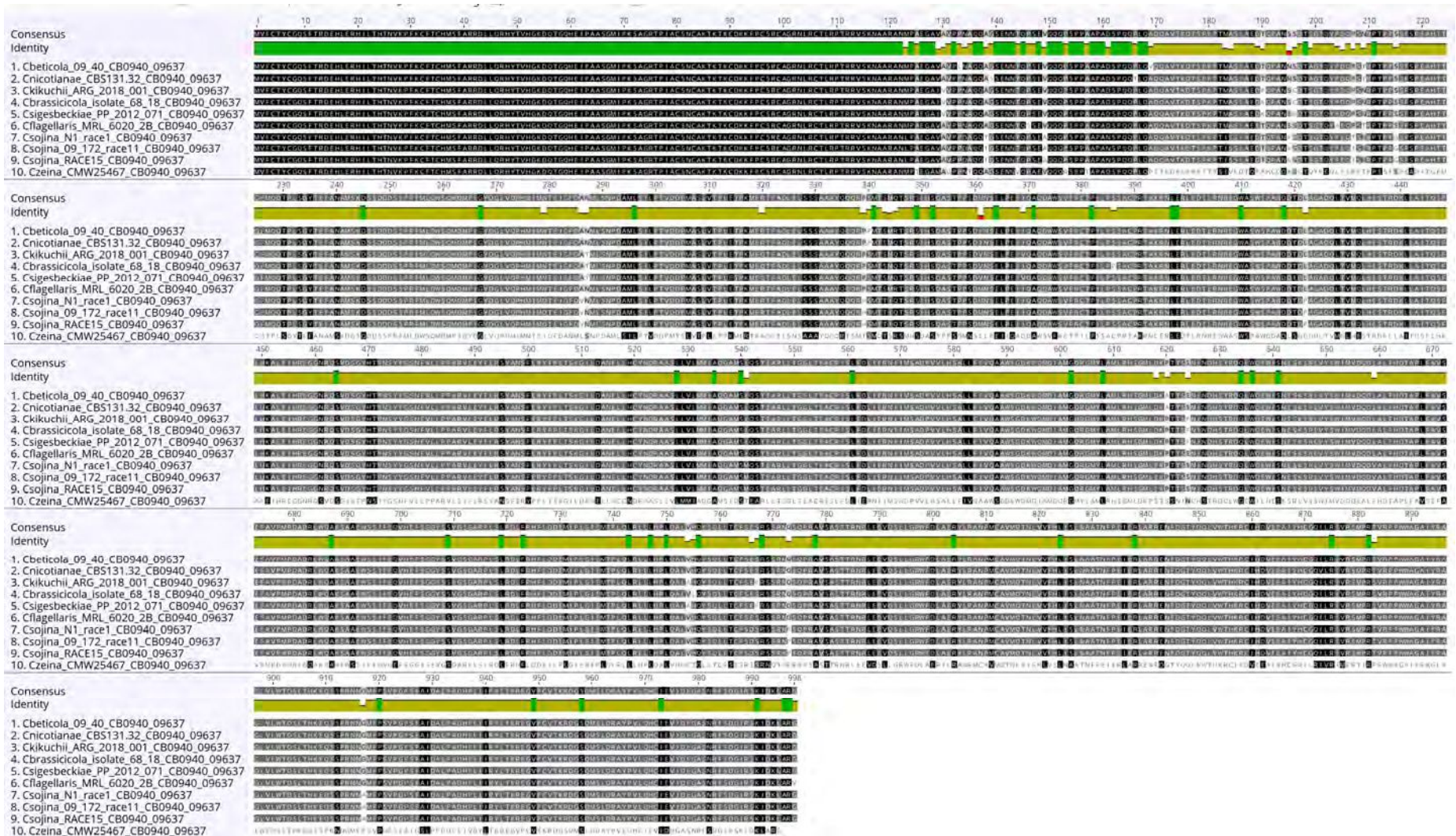


Figura 87. Secuencia de péptidos del gen CB0940_09637 (factor de transcripción CMR1) en especies de *Cercospora*.

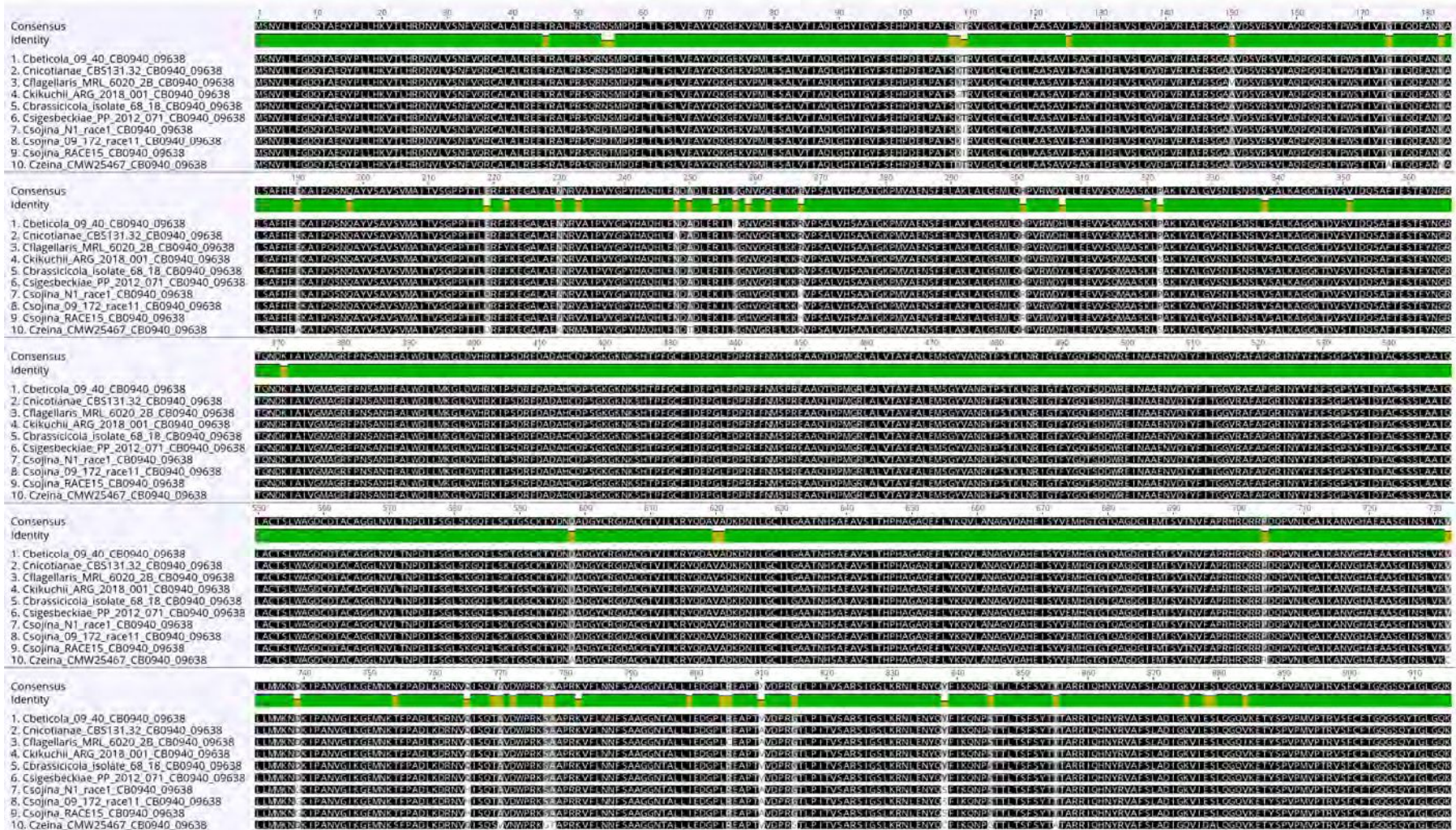


Figura 88. Secuencia de péptidos del gen CB0940_09638 (DHN-melanina PKS) (parte 1 de 3) en especies de *Cercospora*.

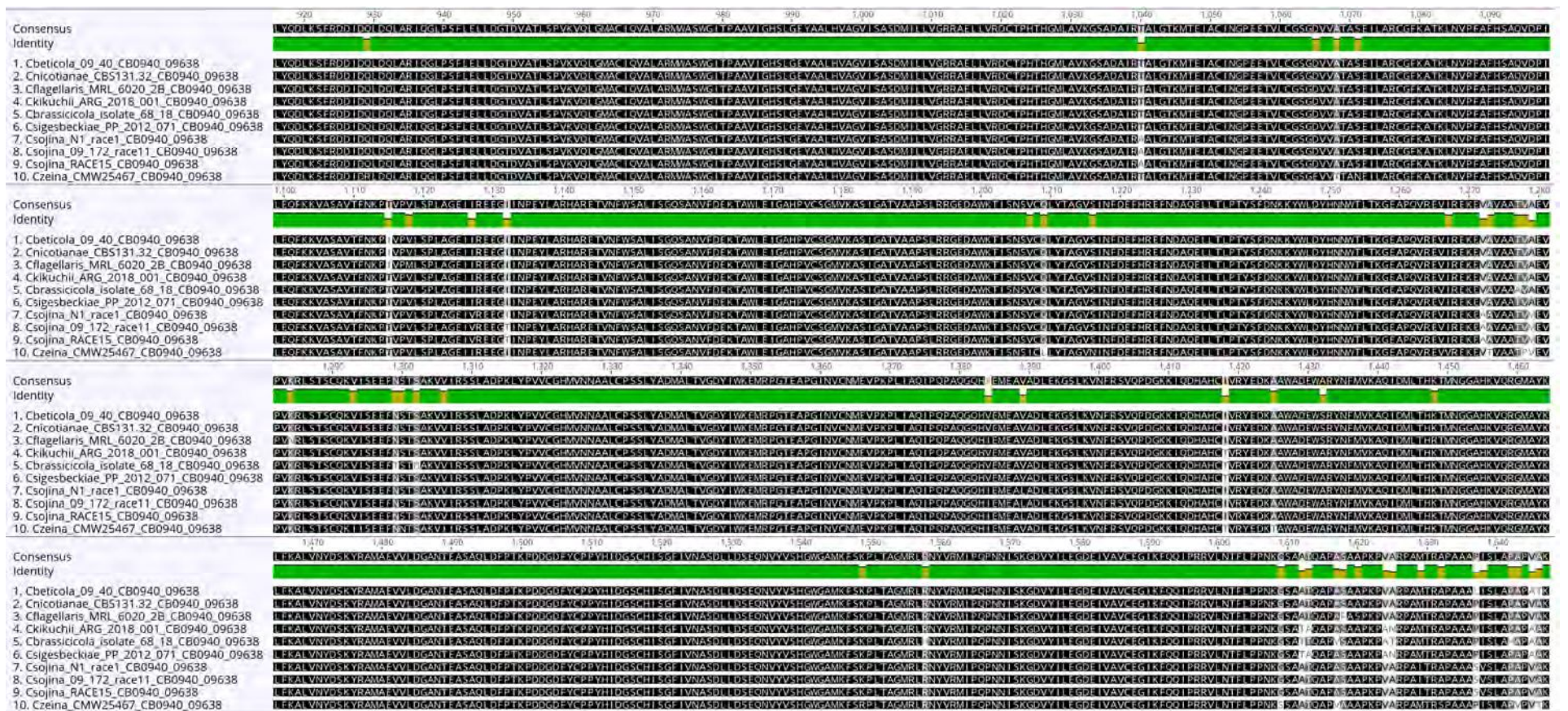


Figura 89. Secuencia de péptidos del efector CB0940_09638 (DHN-melanina PKS) (parte 2 de 3) en especies de *Cercospora*.

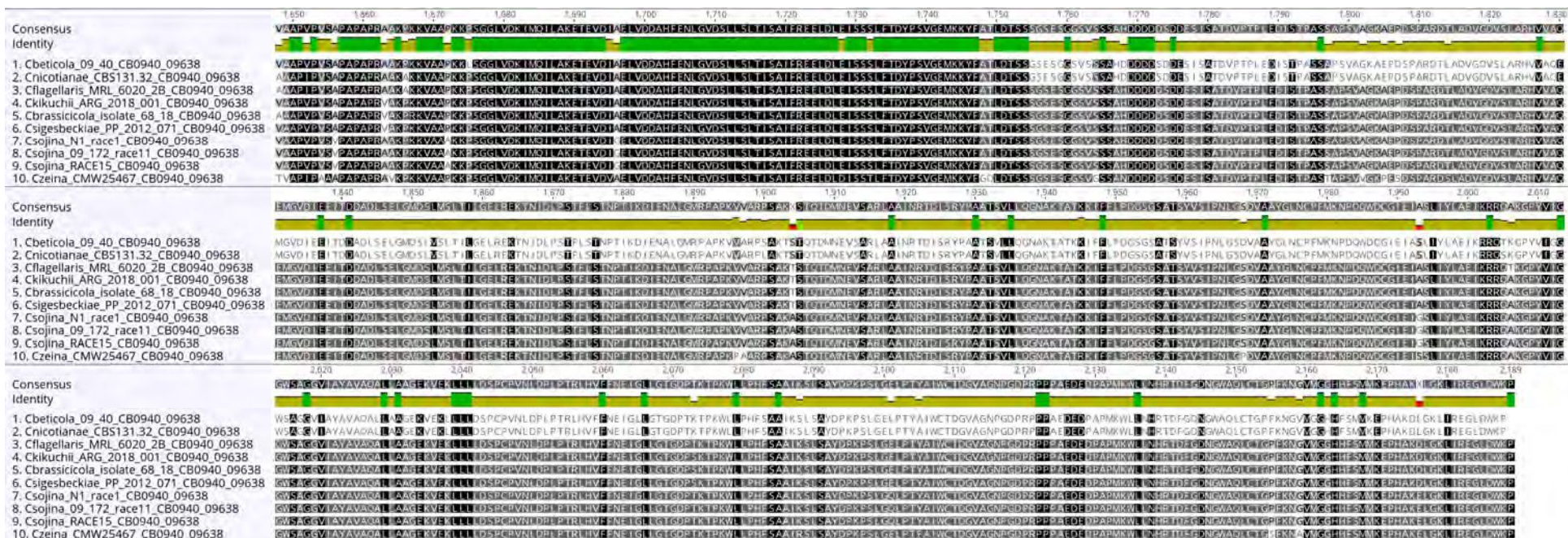


Figura 90. Secuencia de péptidos del efector CB0940_09638 (DHN-melanina PKS) (parte 3 de 3) en especies de *Cercospora*.



Figura 91. Secuencia de péptidos del efector CB0940_09639 (prefoldina) en especies de *Cercospora*.

3.8.2.1. CTB cluster

El cluster CTB se encuentra altamente conservado entre las especies aquí analizadas (Figura 92). En la Tabla 25 se indican las posiciones de inicio y fin de cada gen en el genoma de *C. kikuchii* de referencia.

Tabla 25. Localización de genes de patogenicidad y virulencia en el genoma de *C. kikuchii*.

| Tipo o grupo de genes | Gen | Gen id en <i>C. beticola</i> CB0940 | Localización en genoma <i>C. kikuchii</i> ARG_18_001 ^a | Intrones | Longitud CDS (bp) ^b | Aminoácidos | Función predicha o estimada |
|-----------------------|--------------|-------------------------------------|---|----------|--------------------------------|-------------|---|
| Efectores | AVR4 | 06387 | 105:1324291 - 1324695:- | 0 | 405 | 134 | Proteína efectora |
| Efectores | Nip1 | 03921 | 75:802490 - 802648:- | 1 | 312 | 103 | Proteína efectora |
| Efectores | CB0940_10646 | 10646 | 67:14848 - 15189:- | 2 | 228 | 75 | Proteína efectora |
| Efectores | Cs_07324 | 07205 | 99:1317695 - 1318249:- | 1 | 504 | 167 | Proteína efectora |
| Efectores | NIS1 | 07059 | 99:960918 - 962051:- | 4 | 900 | 299 | Proteína efectora |
| Melanina-DHN cluster | CB0940_09636 | 09636 | 25: 821518 - 822517:- | 1 | 948 | 315 | Tetrahidroxinaftaleno (T4HN) reductasa |
| Melanina-DHN cluster | CB0940_09637 | 09637 | 25: 816083 - 819178:- | 2 | 2997 | 998 | Factor de transcripción (CMR1) |
| Melanina-DHN cluster | CB0940_09638 | 09638 | 25: 799750 - 806319:+ | 0 | 6570 | 2189 | DHN-melanina PKS |
| Melanina-DHN cluster | CB0940_09639 | 09639 | 25: 797467 - 798791:+ | 6 | 1325 | 215 | Prefoldina |
| CTB cluster | ORF10 | 00827 | 90:208802 - 210176:+ | 2 | 1188 | 395 | |
| CTB cluster | CB0940_00828 | 00828 | 90:210573 - 211315:- | 1 | 669 | 222 | Peptidasa señal microsomal subunidad 25 kda |
| CTB cluster | ORF9 | 00829 | 90:211557 - 212532:+ | 3 | 786 | 261 | Proteína con dominio DUF850 |
| CTB cluster | CTB6 | 00830 | 90:213199 - 214272:+ | 0 | 1074 | 357 | Oxidoreductasa dependiente de NADPH |
| CTB cluster | CTB4 | 00831 | 90:214810 - 216504:+ | 3 | 1539 | 512 | Transportador de la superfamilia facilitadora principal (MFS) |
| CTB cluster | CTB2 | 00832 | 90:216993 - 218432:- | 1 | 1389 | 462 | O-metiltransferasa |
| CTB cluster | CTB1 | 00833 | 90:218971 - 226008:- | 8 | 6615 | 2204 | Policétido sintasa (PKS) |
| CTB cluster | CTB3 | 00834 | 90:226855 - 229599:+ | 2 | 2616 | 871 | O-metiltransferasa / monooxigenasa dependiente de FAD |
| CTB cluster | CTB5 | 00835 | 90:230175 - 231820:- | 1 | 1590 | 529 | Oxidoreductasa dependiente de oxígeno, FAD / FMN |
| CTB cluster | CTB7 | 00836 | 90:232444 - 233847:- | 1 | 1260 | 419 | Oxidoreductasa dependiente de FAD / FMN |
| CTB cluster | CTB8 | 00837 | 90:235465 - 236709:+ | 1 | 1194 | 397 | Factor de transcripción de dedos de zinc |
| CTB cluster | ORF11 | 00838 | 90:237130 - 238137:- | 0 | 1008 | 335 | Factor de transcripción truncado |
| CTB cluster | ORF12 | 00839 | 90:241249 - 242094:+ | 0 | 846 | 281 | Factor de transcripción truncado |
| CTB cluster | CB0940_00840 | 00840 | 90:244641 - 247123:+ | 5 | 2124 | 707 | Fenilalanina amoniaco liasa |
| CTB cluster | CFP | 00841 | 90:247704 - 249679:+ | 3 | 1824 | 607 | Transportador de la superfamilia facilitadora principal (MFS) |
| CTB cluster | CTB9 | 00842 | 90:250051 - 251078:- | 1 | 975 | 324 | Dioxigenasa dependiente de alfa-cetoglutarato |
| CTB cluster | CTB10 | 00843 | 90:251632 - 252159:- | 2 | 396 | 131 | Deshidratasa |
| CTB cluster | CTB11 | 00844 | 90:252620 - 253799:- | 1 | 1128 | 375 | Fasciclina beta-ig-h3 |

| | | | | | | | |
|------------------|--------------|-------|----------------------|---|------|-----|--|
| CTB cluster | CTB12 | 00845 | 90:254098 - 256008:+ | 0 | 1911 | 636 | Lacasa / oxidasa de cobre múltiple |
| CTB cluster | CB0940_00846 | 00846 | 90:256094 - 256996:- | 0 | 903 | 300 | Proteína con dominio dedo de zinc U1 |
| CTB cluster | CB0940_00847 | 00847 | 90:257480 - 259509:- | 3 | 1437 | 478 | Proteína fosfatasa pp2a |
| CTB cluster | CB0940_00848 | 00848 | 90:260637 - 261203:- | 0 | 567 | 188 | ADN (citosina-5) -metiltransferasa 3b isoforma 1 |
| CTB ^c | CRG1 | 00377 | 4: 457844 - 459861:+ | 1 | 1953 | 650 | Factor de transcripción |

^a Se indica scaffold : posiciones de inicio y fin de cada gen en el scaffold : sentido de la cadena “+” (positivo, 5'-to-3') o “-” (negativo, 3'-to-5').

^b CDS = región codificante sin incluir intrones, equivalente al ARN mensajero maduro.

^c El gen CRG1 no se encuentra dentro del cluster CTB, sino que está codificado en otra región del genoma distante del cluster CTB.

DHN = dihidroxinaftaleno melanina.

CTB = grupo de genes de biosíntesis de toxina cercosporina.

CFP = cercosporin facilitator protein.

3.9. Identificación de hospedantes alternativos de *Cercospora* spp.

Luego de la incubación de muestras de *Amaranthus hybridus* y *Araujia hortorum*, se observaron típicos conidios en conidióforos libres de *Cercospora* spp. en ambos hospedantes. Se obtuvieron 10 aislados a partir de *Am. hybridus* y 14 a partir de *Ar. hortorum*. Durante las pruebas de patogenicidad en soja se observó infección positiva al igual que los aislados obtenidos a partir de muestras de soja (ver 3.2). Dos aislados representativos obtenidos a partir de *Am. hybridus* (ARG_2019_003 y ARG_2019_006) y otros dos obtenidos a partir de *Ar. hortorum* (ARG_2019_052 y ARG_2019_057) fueron incluidos en el análisis filogenético, ubicándose en los clados *C. sp. H* (aislados a partir de *Am. hybridus*) y *C. sp. O* y *C. kikuchii* (aislados a partir de *Ar. hortorum*), respectivamente (Figura 78). Este es el primer reporte de las especies *C. kikuchii* y *C. sp. O* aisladas a partir de *Ar. hortorum*, y *C. sp. H* aislada a partir de *Am. hybridus* (Sautua et al., 2020b).

3.10. Desarrollo de un método fotográfico para estimar intensidad de TH

Durante la evolución de los síntomas foliares del tizón por *Cercospora*, la intensidad se incrementó en ambas parcelas experimentales a partir de R5. Los síntomas fueron los típicos morados con hojas rugosas (coriáceas). Se tomaron al azar muestras de hojas tanto de la mitad superior como de la mitad inferior, de ambas parcelas. Luego de la incubación se confirmó la presencia solo de *Cercospora* spp.

En las Figuras 93a y 93b se muestran dos ejemplos de los resultados de la validación de la metodología desarrollada. En el punto de muestreo N°1 se contaron 64 folíolos sintomáticos con TH y 39 folíolos no sintomáticos (total de folíolos evaluados = 103), por lo tanto, la incidencia resultó igual al 62%. En el punto de muestreo N°2 se contaron 68 folíolos sintomáticos con TH y 16 folíolos no sintomáticos (total de folíolos evaluados = 84), por lo tanto, la incidencia resultó igual al 81%.



Figura 93. Ejemplo del campo de visión de la cámara fotográfica del canopeo superior para dos puntos de muestreo (a y b) y estimación de la intensidad (incidencia foliar) de TM respectiva.

Las curvas de progreso de la enfermedad se describieron adecuadamente mediante el modelo exponencial $y = y_0 * e^{rt}$ (Figura 94) (Madden et al., 2007). Las tasas de infección del TH fueron 0.064 y

0.056 unidades día⁻¹ para los cultivares 1 y 2, respectivamente (Tabla 26). El modelo predijo que, a partir de la intensidad de la enfermedad = 0, la incidencia del TH alcanzó el 50% a los 45 días desde el inicio de la estimación de intensidad (días desde R5.1) en la parcela 1 (cultivar 1) y el 40% a los 40 días en la parcela 2 (cultivar 2) (Sautua et al., 2018).

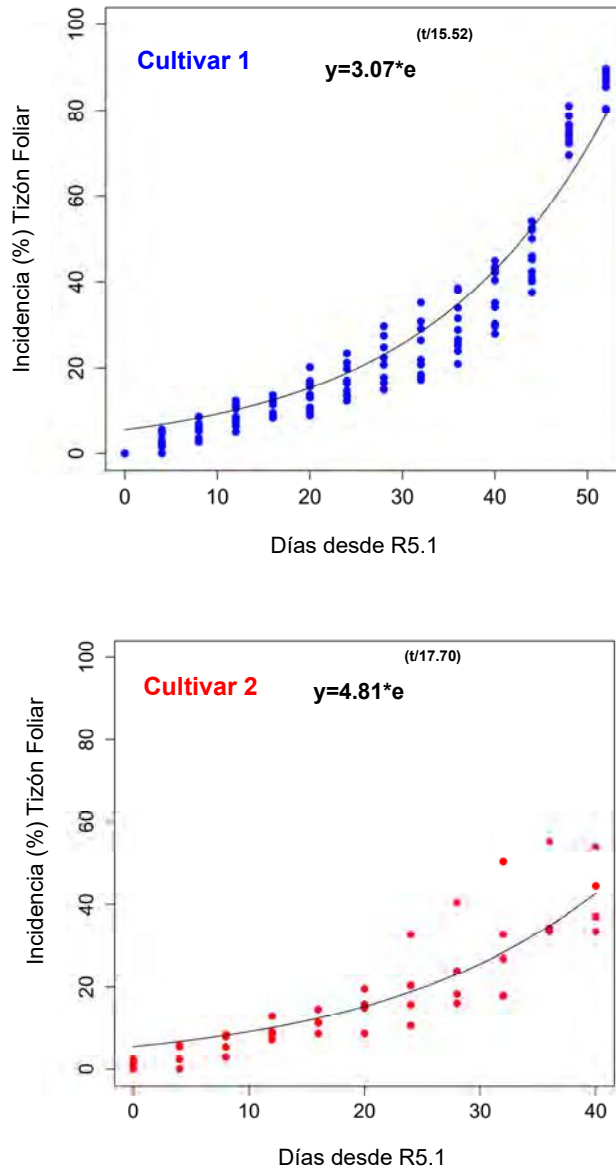


Figura 94. Curvas de progreso del TH y ajuste del modelo exponencial. Las epidemias se desarrollaron en dos poblaciones de soja, cultivar 1: DM3815iPro (puntos azules) y cultivar 2: MS4.9iPro (puntos rojos). Las evaluaciones comenzaron en R5.1, antes de la aparición de los síntomas (Incidencia = 0%)

Tabla 26. Estimación de parámetros de ajuste del modelo exponencial para las dos epidemias de TH graficadas en la Figura 92. y = incidencia (%) TH, rE = tasa de infección, t = tiempo desde inicio de la epidemia, ESR = error standard residual.

| Cultivar | Parámetro | Estimación | Error Std. | t value | Pr(> t) |
|----------|-----------|------------|------------|---------|----------|
| 1 | y_0 | 3.0732 | 0.2261 | 13.59 | < 0.0001 |
| | rE | 15.524 | 0.3795 | 40.9 | < 0.0001 |
| | ESR | 5.169 | | | |
| 2 | y_0 | 4.8078 | 0.9709 | 4.952 | < 0.0001 |
| | rE | 17.7032 | 1.8482 | 9.578 | < 0.0001 |
| | ESR | 7.148 | | | |

En todos los casos, el ICC fue mayor que 0.87 y el r mayor que 0.76, confirmando la confiabilidad del método para cuantificar y monitorear la intensidad del TH (Tabla 27) (Pérez-Hernández et al., 2018).

Tabla 27. Confiabilidad intra e inter evaluador de las evaluaciones de campo de la incidencia de TH de *Cercospora*.

| Confiabilidad intra evaluador | Evaluador 1 | | | Evaluador 2 | | |
|-------------------------------|-------------|---------|----------|-------------|---------|----------|
| | ICC | Pearson | p-value | ICC | Pearson | p-value |
| Evaluación 1 (aleatorización) | 0.87 | 0.78 | < 0.0001 | 0.97 | 0.93 | < 0.0001 |
| Evaluación 2 (aleatorización) | 0.96 | 0.93 | < 0.0001 | 0.94 | 0.89 | < 0.0001 |
| Evaluación 1 vs 2 | 0.92 | 0.76 | < 0.0001 | 0.94 | 0.95 | < 0.0001 |

| Confiabilidad inter evaluador | Evaluación 1 | | | Evaluación 2 | | |
|-------------------------------|--------------|---------|----------|--------------|---------|----------|
| | ICC | Pearson | p-value | ICC | Pearson | p-value |
| Evaluador 1 - Evaluador 2 | 0.95 | 0.90 | < 0.0001 | 0.97 | 0.94 | < 0.0001 |
| Evaluador 2 - Evaluador 1 | 0.96 | 0.93 | < 0.0001 | 0.94 | 0.90 | < 0.0001 |

3.11. Evaluación de la MPS sobre la germinación de la semilla y desarrollo de la plántula de soja

Se constató la presencia de *Cercospora* spp. principalmente en la semilla sintomática con MPS (Figura 95), con ambos medios de cultivo utilizados. No se detectó la presencia de otros patógenos.

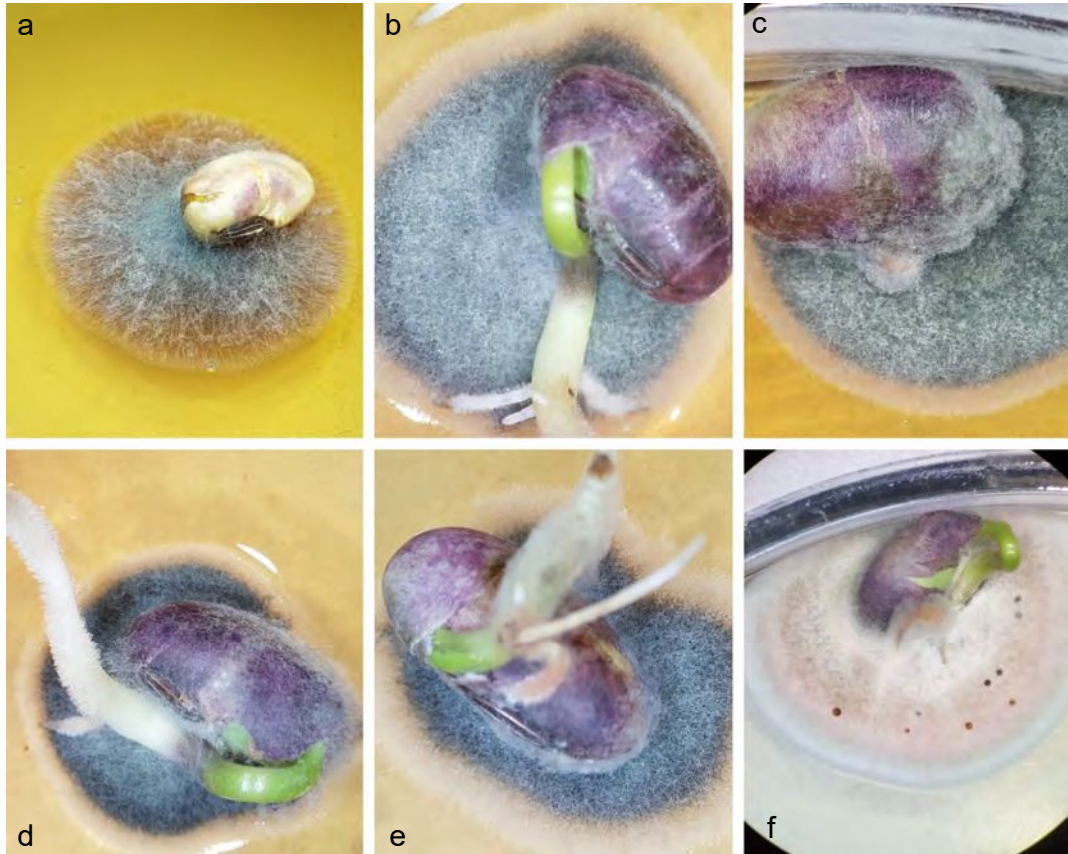


Figura 95. Detección de crecimiento de colonia de *Cercospora* spp. a partir de semillas sintomáticas de MPS en agar con decocción de hoja de soja (SLDA) (a-e) y agar papa dextrosa (APD) (f).

Sobre un total de 200 semillas incubadas, se detectó la presencia de *Cercospora* spp. en el 17.5% de las semillas sintomáticas, mientras que el porcentaje de infección fue del 0.5% para 200 semillas asintomáticas (Tabla 28). Esta diferencia de incidencia (presencia detectable) entre semillas con y sin síntomas fue estadísticamente altamente significativa ($p < 0.001$). Por otro lado, ambos medios de cultivo utilizados tuvieron una sensibilidad de detección similar ($p = 0.47$). Estas variables (síntomas y medio de cultivo) no interaccionaron entre sí ($p = 0.27$).

Tabla 28. Porcentaje de semillas con detección de *Cercospora* spp. (porcentaje de infección).

| Medio de cultivo | Asintomáticas | Sintomáticas | Total |
|------------------|---------------|--------------|-------|
| APD | 1% | 15% | 8% |
| SLDA | 0% | 20% | 10% |
| Total | 0.5% | 17.5% | |

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|-----------|-----|----------------|-------------------|--------|
| infeccion | 400 | 0,09 | 0,09 | 304,50 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|----------------|-------|-----|------|-------|---------|
| Modelo. | 3,02 | 3 | 1,01 | 13,40 | <0,0001 |
| sintomas | 2,89 | 1 | 2,89 | 38,48 | <0,0001 |
| medio | 0,04 | 1 | 0,04 | 0,53 | 0,4659 |
| sintomas*medio | 0,09 | 1 | 0,09 | 1,20 | 0,2743 |
| Error | 29,74 | 396 | 0,08 | | |
| Total | 32,76 | 399 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05378

Error: 0,0751 gl: 396

| sintomas | Medias | n | E.E. | |
|----------|--------|-----|------|---|
| no | 0,01 | 200 | 0,02 | A |
| si | 0,17 | 200 | 0,02 | B |

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05378

Error: 0,0751 gl: 396

| medio | Medias | n | E.E. | |
|-------|--------|-----|------|---|
| APD | 0,08 | 200 | 0,02 | A |
| SLDA | 0,10 | 200 | 0,02 | A |

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

En el ensayo en invernáculo, las temperaturas medias diurnas fueron de 33°C. A los 4 días de la siembra se comenzó a observar el inicio de emergencia (Figura 96). La emergencia (VE) se alcanzó a los 8 días desde la siembra,



Figura 96. Inicio de emergencia en invernáculo a los 4 días desde la siembra.

Ambos grupos de semillas, tanto sintomáticas como asintomáticas, tuvieron un porcentaje de emergencia superior al 80%. No hubo diferencias significativas para el porcentaje de emergencia en los dos grupos de tratamiento ($\chi^2 = 2.9022$, valor $p = 0.08846$) (Figura 97).

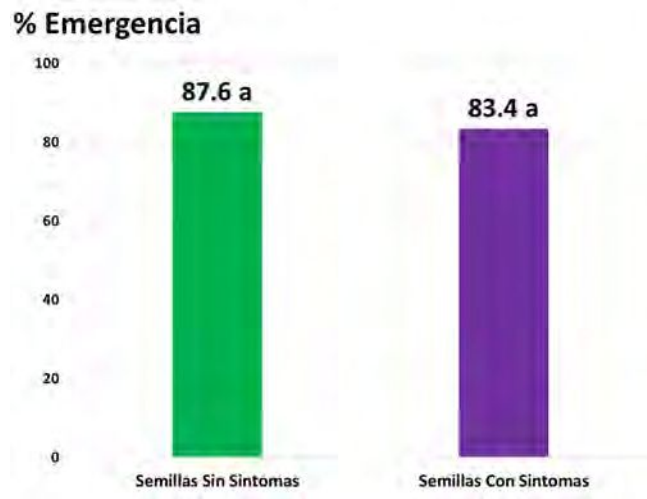


Figura 97. Porcentaje de emergencia de semillas de soja con y sin síntomas de MPS.

4. DISCUSIÓN

El extenso trabajo de muestreo de campos de soja principalmente en Argentina y también en Santa Cruz, Bolivia, durante 7 años evidenció que el TH/MPS es una enfermedad que posee un 100% de prevalencia con elevados niveles de incidencia y severidad en todas las regiones productoras de soja de la Argentina y en Santa Cruz, Bolivia. Todos los campos relevados presentaron síntomas de TH/MPS. Lo mismo ha ocurrido en Brasil, de acuerdo con lo recientemente reportado por de Mello et al. (2021a), luego de relevar 9 estados de Brasil durante 9 campañas agrícolas. Tanto en Bolivia como en Brasil, el TH/MPS fue considerada durante los últimos años como una enfermedad secundaria, siendo la roya de la soja la principal enfermedad del cultivo por la cual se toman las decisiones de control químico (Carmona et al., 2017a). Esta evidencia revela con qué grado de magnitud se ha extendido esta enfermedad en todo Sudamérica. Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados, se considera que el TH/MPS es una de las enfermedades que más ha crecido en la Argentina en el cultivo de soja. En consecuencia, el estudio de este patosistema reviste una importancia capital para su manejo agronómico.

Las características morfológicas de los 516 aislados argentinos y 38 aislados bolivianos que se estudiaron, junto con las pruebas de patogenicidad, permitieron reconocer y diagnosticar al género *Cercospora* spp. como agente causal del TH/MPS. Las dimensiones estimadas de los conidios y conidióforos de los aislados argentinos y bolivianos coinciden con las reportadas previamente. Por ejemplo, Yeh (1980) reportó para un promedio de cinco aislados, cuatro de E.E. U.U. y uno de Taiwán, un largo de conidios entre 50 y 325 μm con una media de 171.2 μm . Mientras que en la presente tesis, para un promedio de 471 conidios provenientes de 21 aislados argentinos, el largo de conidio se estimó entre 58 y 446 μm con una media de 175.4 μm ; y para un promedio de 209 conidios provenientes de 21 aislados bolivianos, el largo de conidio se estimó entre 62 y 320 μm con una media de 150.6 μm . Si bien los mecanismos genéticos asociados con la conidiogénesis son complejos y permanecen en gran parte indefinidos en numerosos hongos fitopatógenos (Zheng et al., 2012), estas características fenotípicas parecerían estar fuertemente conservadas, genéticamente gobernadas, con escasa variabilidad (Wu et al., 2018; Krizsán et al., 2019). Asimismo, se ha confirmado que las características morfológicas tales como las dimensiones de conidios y conidióforos y las características de las colonias en medios de cultivo clásicos no proveen información para distinguir las diferentes especies dentro del género *Cercospora*, agentes causales de la enfermedad.

Por otro lado, el análisis filogenético realizado permitió identificar a nivel de especies la gran mayoría de los aislados estudiados en dicho análisis. No se encontraron diferencias entre especies ni ningún patrón asociativo en función del origen botánico (hojas vs semillas). En el análisis se incluyeron datos de genes que faltaban en algunos aislados en los estudios de Groenewald et al. (2013) y Bahkshi et al. (2018) por dos razones. Primero, estos datos ayudan a proporcionar información filogenética adicional que puede ayudar a fortalecer la columna vertebral de la filogenia y ayudar con una ubicación más sólida de los aislados bajo estudio. En segundo lugar, Bahkshi afirma que los datos de GAPDH se

encuentran entre los *loci* más informativos que se han evaluado para el análisis filogenético de *Cercospora*. Se ha decidido no secuenciar *nrITS* para los aislados aquí estudiados, ya que, si bien algunos sitios son variables y representan estados de caracteres derivados compartidos en el locus *nrITS*, lo que puede ayudar a fortalecer un poco la columna vertebral, es poco probable que estos datos sean informativos a la profundidad filogenética en la que se ha trabajado, dados los pocos sitios filogenéticamente informativos en el resto de *Cercospora* en este locus. Con respecto a GAPDH, si bien no están disponibles para todas las especies de *Cercospora*, ignorar que estos datos están disponibles para varias especies no es aceptable dados los resultados presentados por Bahkshi et al. (2018). El impacto de los datos faltantes en la inferencia filogenética es controvertido (Lemmon et al. 2009; Roure et al. 2013). Pareciera que los datos faltantes pueden conducir a estimaciones falsas de los parámetros del modelo, reducir la resolución y reducir la capacidad de inferir sustituciones múltiples (impactando las longitudes de las ramas en un marco probabilístico). No obstante, estos impactos parecen ocurrir solo cuando los datos faltantes se introducen sistemáticamente y se generalizan (la mayoría de los datos faltantes), lo que no es el caso en el presente estudio (ver Roure et al. 2013). A pesar de que los estudios previos de simulación indican que la cantidad limitada de datos faltantes en el presente estudio no tendrían ningún impacto en el análisis, se hicieron algunos análisis adicionales de sensibilidad para evaluar este problema potencial. En estos análisis, se incluyó y excluyó GAPDH, además de incluir *nrITS*, pero excluyendo *ITS* en los análisis concatenados, y también se ejecutaron múltiples análisis de un solo gen. Hubo una notable congruencia entre los análisis y ningún conflicto fuertemente respaldado. Los *loci* individuales que se han secuenciado para aislados de *Cercospora* a través de múltiples estudios filogenéticos contienen relativamente poca señal filogenética aislada. Esta es probablemente la razón por la que los diferentes investigadores han optado hasta el presente por continuar realizando análisis filogenéticos concatenados a pesar de las limitaciones conocidas (Doyle et al., 2014, 2015). Si bien esto puede ser un problema en *Cercospora*, actualmente los datos no están disponibles para abordar esta pregunta fuera de lo que ya se ha hecho (evaluar árboles genéticos individuales). Los análisis aquí desarrollados no muestran un conflicto fuertemente respaldado entre árboles genéticos individuales para la ubicación de aislados. En los casos en los que hubo conflicto entre árboles genéticos individuales, se ha discutido en la sección de resultados. En conclusión, el análisis realizado, incluyendo todos los datos genéticos (todos los *loci*) es la forma más apropiada de analizar estos datos en la actualidad. Los modelos de mejor ajuste seleccionados por PartitionFinder (*nrITS* - SYM + I + gamma; *gapdh*, *cal*, *his*, *actin*, *tef* - GTR + I + gamma) están a disposición en github (<https://github.com/vinsondoyle/SautuaPMS2020>).

De los 42 aislados incluidos en el análisis filogenético de Argentina, la gran mayoría (71%) se identificó como *C. kikuchii*, representando la especie predominante. De estos 30 aislados, 29 se obtuvieron de Argentina (1 recolectado en 2014, 25 en 2016, 1 en 2018 y 3 en 2019) y 1 aislado de Bolivia (recolectado en 2017). Estos resultados confirman lo reportado por estudios previos de Sudamérica (Soares et al., 2015). Otras especies no reportadas previamente en Argentina se han

identificado en el presente estudio como agentes causales del TH/MPS en Argentina. Unos 4 aislados fueron identificados dentro del complejo *C. richardiicola* (CRC), el cual es polifilético con *C. sigesbeckiae*, *C. sp. N*, *C. sp. M* y *C. rodmanii*. Otros 5 aislados fueron identificados como linajes delimitados (*C. sp. M*, *C. sp. G*, *C. sp. H*, *C. sp. O*), pero no descritos formalmente por Groenewald et al. (2013). Un aislado fue identificado como *C. nicotianae*, y otro aislado no pudo ser identificado. Se necesitan estudios adicionales para poder definir *loci* adicionales que puedan incrementar aún más el poder de resolución de la filogenia. En Bolivia, de los 37 aislados estudiados la gran mayoría se identificó como *C. nicotianae* (38%) y el linaje *C. sp. P* (43%), mientras que solo un 19% se identificó como *C. kikuchii*. Se confirma que las especies *C. flagellaris* y *C. sigesbeckiae*, presentes en EE. UU. (Albu et al., 2016), no están presentes en Argentina y Bolivia. Por primera vez, se ha confirmado que la especie *C. nicotianae*, presente en Bolivia y Argentina, es un agente causal del TH/PMS. Previamente, esta especie ya había sido aislada a partir de *Glycine max* (Groenewald et al. 2013), pero nunca se había comprobado su capacidad patogénica como agente causal de TH/MPS. Posiblemente otras especies aún no identificadas también sean parte de este complejo críptico de especies agentes causales de esta enfermedad. Recientemente, Vaghefi et al. (2021) realizaron un análisis filogenético molecular, reportando sobre cuatro nuevas especies dentro del complejo de especies de *C. beticola*, agentes causales de la viruela de la acelga y de la remolacha, aisladas de Hawái y New York, EE. UU. Los 5 genes aquí usados para el análisis filogenético (*actA*, *cmdA*, *gapdh*, *his3* y *tefl*) carecieron en algunos casos de poder de resolución (por ej. el aislado ARG_19_015 no se asignó a una especie, *especies indet.*). En estos casos se necesitan incorporar al análisis secuencias de un mayor número de genes. Por ejemplo, Soares et al. (2015) usaron secuencias parciales de los genes β -tubulin (*tub*) y cercosporin facilitator protein (*cfp*), además de los genes aquí explorados. Estos autores encontraron 4 linajes al utilizar los 7 genes (*nrITS*, *actA*, *cmdA*, *his3*, *tefl*, *cfp*, *tub*): 1 y 2 (Argentina y Brasil), 3 (Brasil) y 4 (EE. UU.); donde los primeros 3 contuvieron la especie *C. kikuchii* y el 4 a *C. flagellaris*. Cada linaje exhibió una relación hermana con los clados restantes. Cuando colocaron los linajes dentro de un contexto filogenético más amplio, incluyendo solo 18 especies de *Cercospora* spp. y llevando a cabo un análisis de filogenia bayesiana, encontraron que la mayoría de los aislados del linaje 1 formaron un clado monofilético, con la única excepción de un aislado argentino, que anidaba dentro de un clado con *C. sigesbeckiae*, con una relación hermana con *C. kikuchii*. Algunos de los aislados del linaje 2 se agruparon con dos especies no descritas, *Cercospora* sp. P y *Cercospora* sp. Q, y con *C. alchemillicola*. Estos resultados son similares a los aquí descritos, con la excepción de que en el presente trabajo no se encontró ningún aislado agrupado con *C. sigesbeckiae*. El estudio de Soares et al. (2015) abarcó un muestreo de menor número de localidades (2 de Bs As, 1 de La Pampa, 1 de Tucumán y 1 de Salta), donde por ej. de 39 aislados argentinos, 22 (56%) correspondieron solo a la localidad de 9 de Julio (Bs As). Por otro lado, Albu et al. (2016b) evidenciaron que las secuencias de *nrITS* no realizan aporte alguno a la resolución de la filogenia de las especies causantes de TH/MPS. En el presente trabajo se buscó explorar el aporte del gen *gapdh*, recientemente reportado por Bakhshi et al. (2018). Futuros

estudios con mayor poder de resolución, combinando todos estos genes (*actA*, *cmdA*, *his3*, *tef1*, *gapdh*, *tub*, *cfp*) y quizás genes adicionales, en un único análisis filogenético, resolverán la filogenia de las especies involucradas en distintas regiones productoras de soja.

Por primera vez en el mundo, se logró ensamblar un borrador de secuencias de genoma para la especie *C. kikuchii*, a partir de una cepa de referencia (ARG_2018_001) aislada en la provincia de Buenos Aires. El genoma se encuentra disponible en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/VTAY00000000>), siendo el primer borrador de genoma de referencia para esta especie y será de utilidad para futuros estudios de este patosistema. Asimismo, se generó un borrador de secuencia de genoma para *C. sojina* raza 11, aislado en Argentina. Este representa el primer genoma secuenciado de *C. sojina* de origen argentino.

A partir de los genomas ensamblados de *C. kikuchii* y *C. sojina* raza 11 de Argentina, se pudo identificar varios genes de patogenicidad y virulencia presentes en especies fitopatógenas emparentadas de *Cercospora*. Los efectores NIS1, AVR4, Nip1, CB0940_10646 y Cs_07324, varios genes del cluster o grupo de genes biosintéticos (biosynthetic gene cluster) de la toxina cercosporina y 4 genes del cluster de genes biosintéticos de la Melanina- DHN fueron localizados en ambos genomas y comparados con otras especies de *Cercospora* spp. El análisis de genes ortólogos entre las especies de *Cercospora* spp. aquí exploradas sugiere que éstas poseen mecanismos de patogenicidad/virulencia similares.

Los alineamientos de los 5 efectores explorados (NIS1, AVR4, Nip1, CB0940_10646, Cs_07324) evidenciaron que la secuencia de aminoácidos se encuentra conservada entre las especies fitopatógenas de *Cercospora* aquí exploradas. Sin embargo, en el caso de AVR4 estudios futuros deberán elucidar si las diferencias observadas en la secuencia de aminoácidos para *C. sojina* tienen o no un impacto en la funcionalidad y patogenicidad de esta proteína efectora. Efectores como NIS1, AVR4, Nip1 también se encuentran presentes en los genomas de otros géneros de hongos fitopatógenos. Ebert et al. (2021) pudieron identificar 26 homólogos de CbNip1 a través de NCBI BLASTp ($E < 10^{-6}$) contra la base de datos no redundante (NR) en *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Stemphylium lycopersici*, *Didymella exigua*, *Plenodomus tracheiphilus* y *Z. passerinii*. El análisis tBLASTn utilizando la proteína CbNip1 como consulta (querie) de estos autores sugiere una organización potencialmente ancestral de este gen, respaldado por la identificación de un arreglo similar en la cepa de *C. kikuchii* ARG_18_001. Todos los homólogos, excepto los de *Fusarium fujikuroi* y *Colletotrichum asianum*, codifican una señal predicha para la secreción y abarcan los seis residuos de cisteína conservados, espaciados de manera similar. Esta evidencia sugiere que estas especies utilizarían las mismas estrategias de infección. Por otro lado, de acuerdo con Calegari Fagundes (2018), las búsquedas de homología con BLASTp contra la base de datos NCBI nr y JGI MycoCosm revelaron que solo tres especies de *Cercospora* poseen secuencias genómicas con homólogos de Cs_07324: *C. zeaemaydis* (Cerzm1_93113; 75% de identidad), *C. beticola* (CB0940_07205; 91% de identidad) y *C. berteroae* (CBER1_11401; 94% de identidad). Posteriormente, en la presente tesis se encontró la

secuencia homóloga de Cs_07324 en *C. kikuchii*, *C. flagellaris*, *C. sigesbeckiae*, *C. nicotianae*, *C. beticola*, *C. brassicicola* y *C. zeina*. Luego se buscaron secuencias homólogas de los efectores CB0940_10646 y Cs_07324 en los genomas de *Z. tritici*, *R. collo-cygni* y *Colletotrichum fructicola*, mediante búsqueda local con BLAST. Ninguna de estas dos secuencias fue encontrada en ninguno de esos 3 genomas. Estos resultados sugieren que algunos de estos genes efectores (CB0940_10646 y Cs_07324) y genes similares podrían estar restringidos a especies dentro del género *Cercospora*.

En la presente tesis, durante la exploración de los 22 genes hasta ahora conocidos del cluster CTB, la alineación de la secuencia de aminoácidos mostró que varias especies fitopatógenas de *Cercospora*, incluyendo *C. kikuchii* y *C. sojina*, comparten el mismo orden en tándem, confirmando que el cluster se encuentra altamente conservado entre estas especies. Recientemente, de Jonge et al. (2018) descubrieron y confirmaron por primera vez que el patógeno del manzano *Colletotrichum fioriniae* también posee los genes de biosíntesis y produce cercosporina *in planta*. Este importante hallazgo reporta el primer caso de un fitopatógeno fuera de la familia Mycosphaerellaceae con capacidad de síntesis de cercosporina. Por lo tanto, contrariamente a lo que previamente se creía que esta toxina solamente era producida por patógenos del género *Cercospora*, otros patógenos vegetales como *Colletotrichum* también albergan el grupo CTB, probablemente como resultado de la transferencia horizontal de todo el cluster de genes CTB. Por lo tanto, la evidencia confirma que la toxina cercosporina es un factor de patogenicidad y virulencia clave para las especies fitopatógenas de *Cercospora* y de otros fitopatógenos como *C. fioriniae*. Sin embargo, estudios previos no han logrado detectar la producción de cercosporina *in vitro* o *in planta* en *C. sojina* (Goodwin et al., 2001; Luo et al., 2018). Estudios futuros deberán dilucidar si la especie patógena de soja, *C. sojina*, puede sintetizar esta toxina *in vivo*, o en caso contrario, si solo conserva el cluster de genes para su biosíntesis por qué no sintetiza la toxina. Se cree que *C. sojina* produce otra fitotoxina que facilita el proceso de infección (Świdarska-Burek et al., 2020). Las beticolinas son un grupo de fitotoxinas hospedante-no específicas, de las cuales 20 miembros (B0 a B19) han sido identificados al ser producidas por y aisladas a partir de *C. beticola* (Milat y Blein, 1995; Goudet et al., 1998, 2000). Todas las moléculas de las diferentes beticolinas tienen un átomo de cloro unido al anillo aromático central, mientras que su estructura básica octocíclica se compone de dos subunidades: una antraquinona parcialmente hidrogenada y una xantona parcialmente hidrogenada que están conectadas a través de un anillo de siete miembros (Ducrot et al., 1994, 1996; Simon - Plas et al., 1996; Goudet et al., 1998, 2000). Se desconoce cuál es la vía biosintética de estas toxinas (hasta ahora no se han encontrado genes que codifiquen sus enzimas biosintéticas). Durante estudios de la biología de los efectores y clusters de genes biosintéticos de metabolitos secundarios, incluyendo toxinas y vías de biosíntesis de perilenquinona, se ha detectado un cluster candidato para los genes de biosíntesis de beticolinas en *C. beticola* (Ebert, com. pers.). Por lo tanto, se desconoce si *C. kikuchii* o *C. sojina* producen o no beticolinas o moléculas similares. Estudios adicionales son necesarios para identificar fitotoxinas del género *Cercospora*, hasta ahora no detectadas.

Durante la exploración de los genes de patogenicidad y virulencia conocidos en *Cercospora*, en la presente tesis se detectaron 4 genes previamente descriptos en *C. beticola*, involucrados en la biosíntesis de melanina-DHN (Ebert et al., 2019). Si bien el gen central, que codifica para la melanina-DHN PKS (una policétido sintasa), se encuentra conservado entre las especies exploradas, algunos genes como CB0940_09636 (tetrahidroxinaftaleno reductasa) y CB0940_09639 (prefoldina) presentan cierta variabilidad entre especies de *Cercospora* que quizás podrían contribuir en diferencias de patogenicidad. Se cree que este cluster es más amplio, incluyendo genes adicionales (Schumacher, 2016; Ebert et al., 2019), por lo que se necesitan más estudios para dilucidar por completo su estructura y variabilidad en especies patógenas de soja como *C. kikuchii* y *C. sojina*.

Durante las campañas agrícolas 2016/2017, 2017/2018, 2018/2019, 2019/2020 y 2020/2021, se realizaron relevamientos de enfermedades en cultivos de soja en la zona núcleo de la región Pampeana. Uno de los hallazgos más importantes que se descubrieron durante el presente trabajo, es la detección de nuevos síntomas del TH causado por *Cercospora* spp. Estos síntomas generalmente son asociados con otras enfermedades como la Mancha Marrón de la soja (MM), causada por *S. glycines*, por productores y técnicos. Pero cuando estos folíolos fueron incubados en laboratorio, se han detectado ambos patógenos, tanto *Cercospora* spp. como *S. glycines*, asociados a tales síntomas. Estos resultados confirman que *Cercospora* spp. y *S. glycines* son los dos patógenos más importantes dentro del complejo de las EFC en Argentina. Además, son coincidentes con lo reportado en Brasil (Martins et al., 2004). Realizando un análisis global de todas las campañas agrícolas relevadas y de todos los folíolos incubados, el patógeno predominante en las lesiones descriptas correspondió a *Cercospora* spp. Para estimar la intensidad de cada patógeno en un mismo trozo de tejido vegetal incubado se propuso cuantificar la densidad de esporulación cuantificando el número de “focos” de esporulación. *S. glycines* forma picnidios subepidérmicos y lo que se detecta son los cirros que salen a la superficie durante la incubación, mientras que *Cercospora* spp. se reproduce como conidios en conidióforos libres. Si bien este método propuesto no es perfecto debido a la marcada diferencia morfológica entre ambos patógenos, es una aproximación para la estimación de la intensidad de cada uno. Tanto la frecuencia de detección como la intensidad (densidad de esporulación) en las muestras incubadas fue siempre mayor para *Cercospora* spp. Si bien estos resultados no son conclusivos, algunos de estos síntomas o manchas podrían estar causados por *Cercospora* spp. Una hipótesis es que el TH comienza con pequeñas manchas que finalmente terminan coalesciendo a medidas que la enfermedad avanza en su desarrollo e incrementa su intensidad. Todas las muestras evaluadas en el presente estudio fueron recolectadas en la provincia de Santa Fe, y predominantemente en Bigand, en lotes con muchos años de monocultivo de soja. En este ambiente, parecería que las poblaciones de *Cercospora* spp. y *S. glycines* están presentes por igual, asociadas, después de alcanzar un punto de equilibrio como componentes del complejo de EFC de la soja. Cuando se analizaron muestras de otra localidad, Piamonte, se obtuvieron los mismos resultados. Por lo tanto, futuros estudios deberían explorar otros ambientes de la región pampeana y extra pampeana

para verificar si se repiten o no los resultados hallados. Síntomas similares fueron detectados en Louisiana, EE. UU., y asociados a *Cercospora* spp. (Price PP III, com. pers.). Durante las pruebas de patogenicidad llevados a cabo con los aislados recuperados de estos síntomas, los síntomas iniciales fueron similares a los observados a campo, pero estos resultados no son concluyentes. Por lo tanto, futuros experimentos serán clave para dilucidar cuál/es de las siguientes hipótesis que aquí se plantean son la/s verdadera/s:

(1) los síntomas aquí descritos como síntomas de TH “tipo *Septoria*” son efectivamente síntomas de TH causados por *Cercospora* spp, y por lo tanto estos síntomas no son distinguibles a campo respecto de los síntomas de la MM;

(2) los síntomas aquí descritos como síntomas de TH “tipo *Septoria*” son una mezcla de síntomas causados tanto por *S. glycines* como por *Cercospora* spp., es decir, están presentes los dos patógenos al mismo tiempo causando síntomas muy similares entre sí, y dependiendo de determinadas condiciones que se deben determinar (por ej. variables ambientales o fisiológicas o moleculares de cada variedad de soja), predominan los síntomas de uno u otro patógeno;

(3) los síntomas aquí descritos como síntomas de TH “tipo *Septoria*” corresponden en realidad a síntomas de la MM causados por *S. glycines*, pero sin embargo, otros patógenos causantes de EFC podrían estar presentes independientemente de los síntomas observados en un determinado momento y, al incubarse las hojas en laboratorio, se detectan aquellos patógenos que aún no habían expresado síntomas pero podrían hacerlo en estadios más avanzados del cultivo o ante determinados estímulos ambientales;

(4) los síntomas aquí descritos como síntomas de TH “tipo *Septoria*” son una etapa menos avanzada de los síntomas de tizón foliar reportados por Silva (2014) (Figura 10);

(5) uno de los dos patógenos (*Cercospora* spp. o *S. glycines*) podría ser el que primero necrosa el tejido (debido a la actividad de toxinas, enzimas, etc.), y luego el otro aprovecha la disponibilidad de nutrientes en el tejido necrosado, creciendo a partir del mismo; y

(6) los síntomas aquí descritos como “tipo *Septoria*” causados por *Cercospora* spp. podrían ser característicos en algunas variedades de soja y, dependiendo de la interacción genética hospedante-patógeno (genes de resistencia vs. genes de patogenicidad y virulencia), podrían predominar unos u otros síntomas.

Debido a que la cercosporina es de color púrpura-rojizo brillante y juega un papel importante en la patogenicidad, la expresión de síntomas, la colonización de las cubiertas de las semillas y la virulencia de la enfermedad (Kilpatrick y Johnson, 1956; Ilyas, 1975; Fajola 1978; Upchurch, 1991a; Velicheti, 1994), históricamente se creyó que el color morado de las hojas corresponde a la acumulación de esta toxina en los tejidos afectados. Silva et al. (2015a,b; 2016, 2018) estudiaron esta problemática y describieron síntomas no de manchas foliares como los aquí reportados, sino de tizón foliar (Figuras

10b y 96). Estos investigadores reportaron que la concentración de cercosporina en hojas moradas es tres veces menor que en hojas con TH, sugiriendo que los niveles altos de cercosporina no cambian el color de las hojas a púrpura, sino que causan necrosis y tizón foliar. Además, reportaron que altos niveles de coumestrol (COU) se asociaron con los síntomas morados del TH. El COU es un compuesto orgánico natural de la clase de fitoquímicos conocidos como cumestanos. Es un isoflavonoide que se acumula en respuestas de defensa ante la presencia de patógenos y también ante estrés abiótico como elevados contenidos de ozono (Keen y Taylor, 1975). Esta molécula posee una fuerte actividad antioxidante. El COU es capaz de atravesar las membranas celulares debido a su bajo peso molecular y estructura estable, pudiendo interactuar con las enzimas y receptores de las células. Silva et al. (2018) encontraron que el COU está restringido a las áreas pigmentadas de las hojas moradas, y la pigmentación está restringida a las superficies adaxiales, lo que sugiere que el COU puede estar actuando como protector solar. Aunque el COU está asociado con el síntoma de la hoja púrpura, no es la causa directa de la decoloración, ya que el COU es incoloro. La cuantificación de la clorofila a y b, y los carotenoides totales, sugirió que las hojas con tizón, pero no púrpuras o asintomáticas, estaban sufriendo estrés fotooxidativo. Debido a que el síntoma violeta se asoció con concentraciones elevadas de COU, menor biomasa de *C. flagellaris* y concentraciones más bajas de cercosporina, estos investigadores sugieren que el síntoma púrpura (tizón morado) es una reacción de defensa de la planta de soja a la enfermedad. Esta respuesta estaría mediada en parte por el COU, que proporciona un alto nivel de actividad antioxidante y, por tanto, una resistencia parcial al TH (Figuras 10a, 11, 96a). Mientras que el verdadero síntoma de la enfermedad causada por *Cercospora* spp. es el “tizón de la hoja” (TH) o “tizón foliar” (Figuras 10b, 96b). Estos síntomas inician con necrosis foliar, causada entre otros por la cercosporina, la que termina atizonando las hojas. En base a esta reciente investigación, se especula que la hipótesis (1) podría ser en algunos casos cierta, ya que las muestras con síntomas “tipo *Septoria*” fueron muestreadas del tercio superior del canopeo, cuando al mismo tiempo otras hojas expresaban síntomas considerados típicos del TH o tizón morado de la soja. Si bien la investigación de Silva et al. (2018) no es concluyente, es un aporte importante en la dirección del esclarecimiento de esta problemática. Estos hallazgos representan el primer informe de acumulación de COU en hojas moradas de soja afectadas por TH y también demuestran que COU puede estar asociado con resistencia a *C. flagellaris* a través de su actividad antioxidante. Adicionalmente, estos investigadores han encontrado otras moléculas asociadas con el síntoma púrpura; pero, estas bandas aún no se han identificado. A pesar de su clasificación como fitoalexina, el COU a 19 y 190 μM no inhibió el crecimiento de tres aislados de *C. flagellaris* en placas con APD o V8 (*in vitro*). Sin embargo, el COU tiene una fuerte actividad antioxidante, como lo demostraron los análisis de DPPH (ensayo del 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, que muestra la capacidad de aceptar hidrógeno hacia los antioxidantes) de aquel estudio. La alta concentración de COU en las hojas de color púrpura sugiere que la vía del fenilpropanoide se desencadenó para producir clases de flavonoides que tienen una alta actividad antioxidante, pero no necesariamente una alta actividad antifúngica. Otros estudios también encontraron una asociación entre la decoloración (marrón rojizo,

magenta o púrpura) y la acumulación de fitoalexinas, incluido el COU (Zähringer et al., 1980; Ingham et al., 1981; Graham y Graham, 1996;). Si bien Silva et al. (2018) concluyen que se requieren análisis adicionales para caracterizar de manera integral este síntoma, proponen que la decoloración púrpura de las hojas afectadas por el TH es una respuesta al estrés oxidativo inducido por la cercosporina, que es un inductor conocido de ROS. La planta responde a este estrés produciendo COU, un eficaz antioxidante. Por último, sostienen la hipótesis de que la decoloración púrpura es una respuesta al estrés en la que se producen derivados de **pterocarpina** (derivados de isoflavonoides que se encuentran en la familia Fabaceae), que es una reacción común al estrés biótico y abiótico. Si la producción de biomasa del patógeno y cercosporina excede la capacidad antioxidante de la planta, se producirían síntomas de clorosis y tizón. Por lo tanto, el síntoma de la hoja púrpura en las plantas de soja afectadas por TH puede considerarse una respuesta de resistencia parcial a la infección por el patógeno. Por lo tanto, en concordancia con los resultados de los trabajos de investigación de Silva et al. (2014) (Figura 98) y los de la presente tesis, se propone el nombre “tizón foliar” o “tizón de la hoja (TH) de soja por *Cercospora*” para designar la enfermedad en su aspecto foliar.

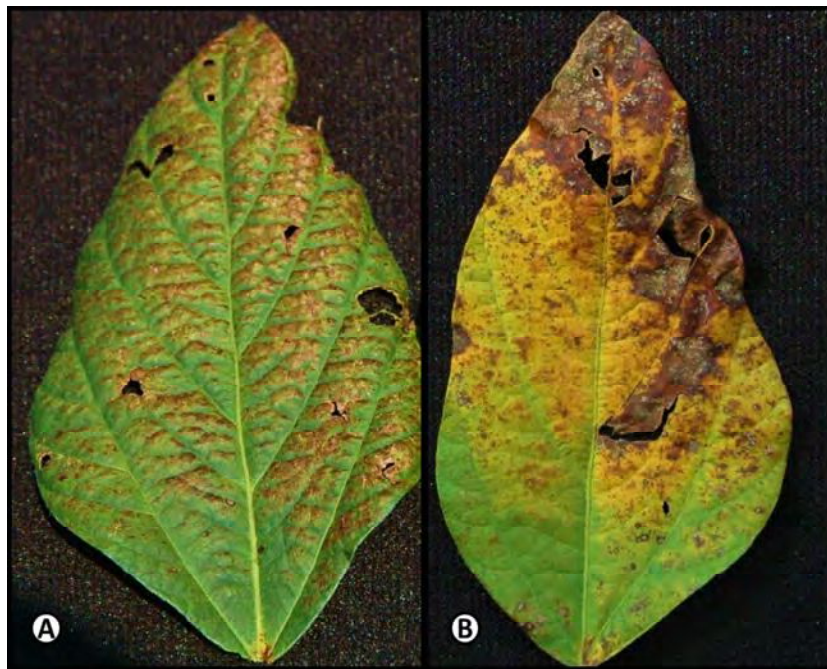


Figura 98. A) Hojas de soja que muestran el síntoma de tizón morado o violeta. B) Síntoma de hoja de soja mostrando tizón o atizonamiento. Ambos síntomas están causados por *C. flagellaris* en EE. UU. Autor: Silva, 2014

Previamente, Choquer et al. (2005) habían observado síntomas de tizón causados por *C. nicotianae* en hojas de tabaco durante pruebas de patogenicidad, coincidentes con los propuestos por Silva et al. (2018) (Figura 99). En forma similar, recientemente en Brasil se reportó la detección de dos

síntomas foliares diferentes del tizón del café, causado por *Cercospora coffeicola* (Andrade et al., 2021; Vale et al., 2021).



Figura 99. Síntomas de tizón causados por *C. nicotianae* en hojas de tabaco durante pruebas de patogenicidad conducidas por Choquer et al. (2005).

Independientemente de las hipótesis pendientes que necesitan aún ser abordadas en futuros estudios, el presente trabajo deja en claro que la estimación de los síntomas visuales del TH a campo tiene una exactitud muy limitada, ya que por un lado la incubación de material vegetal verde a partir de R4/R5 evidencia la presencia asintomática de cepas patógenas de *Cercospora* spp. Estos resultados son coincidentes con más de 16 años de investigación en estos patosistemas, liderados por Carmona y Scandiani, en los que se ha confirmado el extenso período de incubación y latencia que poseen las EFC, donde incluso hojas verdes, aparentemente sanas, muestreadas en el campo, revelan la presencia de los patógenos agentes causales de EFC luego de la incubación en laboratorio (Sautua, 2005; Carmona 2006, 2013, 2014; Carmona y Reis, 2012; Carmona et al., 2004, 2009, 2010, 2011a,d, 2013, 2015a,b, 2017a). Particularmente para el TH/MPS, esto fue demostrado por Chanda et al. (2014). Por otro lado, incluso síntomas causados por otros agentes causales de EFC como la MM, causada por *S. glycines*, y las bacteriosis causadas por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Coerper) Gardan y *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Nakano), pueden ser indistinguibles a campo en sus etapas iniciales respecto a los causados por la MM o el TH. Esta problemática suma desafíos adicionales al estudio y manejo de estos patosistemas. Muchos técnicos están actualmente evaluando síntomas de TH causados por *Cercospora* como si fueran síntomas la MM. Es por esta razón que ensayos realizados a campo para la evaluación sanitaria de variedades de soja y de fungicidas, no deberían basarse solamente en la estimación visual de los síntomas visibles al momento de la estimación de la intensidad de enfermedad, sino que además deben complementarse y avalarse con la incubación del material vegetal en laboratorio.

Por lo tanto, de acuerdo con los hallazgos de la presente tesis, se recomienda como obligatorio la incubación del material vegetal evaluado para tener precisión en el diagnóstico de los agentes causales de las EFC. La evaluación a campo de síntomas visuales por sí solo no garantiza la certeza del diagnóstico. En sistemas agrícolas con muchos años de agricultura y monocultivo de soja, se recomienda la evaluación de la intensidad de EFC como severidad (%) de manchas foliares de EFC en forma global. Esta variable incluiría los síntomas causados por *S. glycines*, *Cercospora* spp. y otros patógenos como *Colletotrichum* spp. En el 100% de las hojas coriáceas con coloraciones púrpura o violácea se ha confirmado la presencia de *Cercospora* spp. en forma predominante. Sin embargo, en manchas típicamente no asociadas a campo con *Cercospora* spp. por parte de técnicos y productores, se ha confirmado su presencia en forma predominante, por lo que no es correcto atribuir esos síntomas exclusivamente a la MM causada por *S. glycines*. Históricamente se asoció a la MM con el tercio inferior del canopeo de soja porque los síntomas de la MM son más frecuentemente encontrados en ese tercio, desde estadios fenológicos vegetativos (V8). Esto se debe a que *S. glycines* sobrevive en rastrojos infestados de soja (además de semilla), y sus conidios se dispersan con la salpicadura de las gotas de lluvia en forma vertical en el canopeo. Además, *S. glycines* es más sensible a la radiación (Rasanayagam et al., 1995). Por otro lado, la biología del género *Cercospora* se asoció siempre con la luz, y por lo tanto con el tercio superior del canopeo de soja, donde históricamente se visualizaron siempre los primeros síntomas de “tizón morado” a partir de estadios reproductivos (R4). En la presente tesis, los resultados de la incubación en oscuridad durante las primeras 48 hs y con luz las siguientes 48 hs, confirmaron la importancia de la luz para la estimulación de la esporulación de *Cercospora* (Figuras 63, 64, 66, 67). Además, *Cercospora* tiene un período de incubación más prolongado (Chanda et al., 2014) que *S. glycines* (Lin y Mideros, 2021). Sin embargo, en los lotes relevados en el presente estudio, no se evidenció diferencias en los resultados entre tercios o mitades superior e inferior del canopeo. Ambos patógenos estuvieron presentes en ambos tercios o mitades y siempre con predominancia de *Cercospora* spp. Estos resultados plantean el interrogante de si actualmente, luego de muchos años de siembra de soja con sistema de siembra directa y en muchos casos bajo monocultivo, se sigue manteniendo la predominancia de *S. glycines* en el tercio inferior / mitad inferior y *Cercospora* en el tercio superior.

Similarmente, otro aspecto que se deduce a partir del planteo de esta problemática, es que si bien actualmente se están desarrollando diferentes softwares que permitirían en el futuro el diagnóstico automatizado de enfermedades a partir de fotografías (Karlekar y Seal, 2020; Vishnoi et al., 2020), éstos serían incapaces de detectar síntomas que se están incubando y aún no se expresaron. Además, los algoritmos deberían depurarse y sofisticarse en gran medida para que puedan detectar síntomas muy similares causados por patógenos diferentes. Por lo tanto, se plantea la hipótesis que será necesario resolver con experimentación futura, sobre si para este tipo de patosistema con prolongados períodos de incubación y latencia, como por ej. el de las EFC de la soja, sea necesario utilizar una técnica de detección molecular a campo, como por ejemplo la planteada por Hu et al. (2019) para detectar múltiples

patógenos foliares de trigo usando un secuenciador portátil. Estos investigadores sugieren que con esta metodología están proporcionando la base para el desarrollo futuro de un sistema de monitoreo de enfermedades de trigo *in situ*. Estudios similares se han desarrollado para la detección a campo (*in situ*) de resistencia a estrobilurinas para el oídio del trigo (Dodhia et al., 2021).

El método fotográfico desarrollado para estimar la intensidad del TH (incidencia) demostró ser objetivo, práctico y repetible en la evaluación a campo. Si bien este método no resuelve la problemática previamente expuesta, permite muestrear un mayor número de campos en menor tiempo, y con mayor precisión respecto a estimaciones visuales de severidad. Sin embargo, el tiempo adicional necesario para evaluar las fotos en gabinete podría insumir el mismo tiempo necesario para la evaluación tradicional *in situ* de estimación visual del porcentaje de severidad foliar. Además, el evaluador también debe estar muy entrenado en el reconocimiento de los síntomas (los síntomas considerados clásicos o típicos del TH, ya que los síntomas “tipo Septoria” deben evaluarse en laboratorio, incubando el material foliar muestreado). De todas maneras, una clara ventaja de este método es facilitar la estimación de la incidencia del TH minimizando los sesgos psicofísicos inherentes a las evaluaciones de campo. Otra ventaja es que, al estimar la incidencia, es más preciso y objetivo que la tradicional estimación visual de la severidad foliar. Por lo tanto, este sistema se puede utilizar de forma fiable para obtener mediciones precisas de la incidencia de TH. Además, el sistema se puede utilizar en estudios comparativos, como los de epidemiología, comportamiento sanitario de diferentes variedades de soja y ensayos de fungicidas para evaluar TH/MPS. Incluso en el futuro, se podría desarrollar un método de captura fotográfica automatizada mediante el uso de drones, lo que aumentaría exponencialmente la capacidad de muestreo diario (Gao et al., 2020). No se deja de enfatizar, sin embargo, que estos sistemas no pueden al menos por el momento reemplazar al evaluador humano entrenado para detectar los síntomas específicos de cada enfermedad. Los algoritmos que se están desarrollando están aún en etapas iniciales y distan mucho de poder reconocer con elevada precisión los síntomas de enfermedades, especialmente las EFC por su problemática aquí expuesta.

La caracterización epidemiológica del TH es central para su manejo, pero el progreso temporal del TH era poco conocido, en parte, debido a la falta de métodos objetivos para evaluar la fase foliar de la enfermedad en el campo. Usando el método fotográfico aquí propuesto, el progreso temporal de dos epidemias del TH fue monitoreado y caracterizado en dos parcelas experimentales en Argentina en la campaña agrícola 2017/2018. El desarrollo exponencial de las epidemias de TH aquí descritas es coincidente con las evaluaciones de Rupe et al. (1982) para *Cercospora zea-maydis* en el cultivo de maíz. El método aquí desarrollado para evaluar la intensidad del TH y los resultados sobre la caracterización de las epidemias de TH proporcionan una importante herramienta para el estudio del progreso temporal del TH y eventualmente sobre el control y manejo de la enfermedad. Además de minimizar los sesgos psicofísicos, inherentes a las evaluaciones de campo del TH, el sistema aquí descrito permite el muestreo de numerosos folíolos y evaluaciones precisas de la incidencia del TH en

gabinete. El método fotográfico resultó objetivo, repetible, así como más rápido y práctico que los enfoques de evaluación del TH comúnmente hoy utilizados a campo (estimación visual de severidad foliar). Este sistema se puede usar de manera confiable en estudios comparativos, como epidemiológicos del TH y ensayos de fungicidas.

Un aspecto importante de este patosistema es la disminución de calidad de la semilla infectada. Una semilla es de baja calidad cuando tiene un PG entre 75 y 84%, un vigor a 15°C entre 55 y 74% y semillas con 11 a 20% de patógenos (Scandiani y Luque, 2009; Formento et al., 2016). Recientemente, Turner et al. (2020) reportaron que semillas de soja no infectadas con MPS tuvieron un mayor porcentaje de germinación y vigor de la plántula en comparación con la semilla infectada. La germinación fue 30,9% mayor y el vigor 58,3% mayor en semillas no infectadas. Este reporte contrasta con todos los reportes previos, en los que nunca se verificó que la MPS afectara el poder germinativo de la semilla o la emergencia de plántulas de soja. Para poner a prueba el efecto de esta enfermedad con aislados de *Cercospora* spp. y variedades de soja de Argentina, se llevó a cabo un estudio similar. En el presente estudio, se verificó la presencia de *Cercospora* spp. en un lote de semilla comercial con síntomas de MPS de 17.5%. Al comparar el efecto de la presencia/ausencia de síntomas de MPS sobre la germinación/emergencia, se verificó que la MPS no afecta dichos procesos. Estos resultados son coincidentes con lo previamente reportado en la bibliografía (Hepperly y Sinclair, 1981; Franca Neto y West, 1989; Formento et al., 2016).

Otro aspecto relevante para el manejo agronómico del TH/MPS es la confirmación de diversos hospedantes secundarios u alternativos de especies de *Cercospora* spp. causantes de TH/MPS. En el presente estudio, si bien es exploratorio y preliminar, por primera vez en Argentina se confirmaron los hospedantes alternativos o secundarios de *Cercospora* spp., *Am. hybridus* y *Ar. hortorum*. Borges et al. (2018) secuenciaron parcialmente siete genes nucleares de 36 aislados de *Cercospora* spp. obtenidos a partir de especies hospedantes distintas de la soja, muestreadas en Brasil (15 especies) y en EE. UU. (6 especies). Entre las malezas se incluyó la especie *Amaranthus palmeri*. Luego realizaron un estudio filogenético obteniendo 5 linajes genealógicos. El linaje 1 contuvo a *C. kikuchii* como único miembro, que supuestamente solamente infecta soja; y el resto de los linajes son especies de *Cercospora* spp. capaces de infectar múltiples hospedantes, entre especies ornamentales y malezas. En aquel estudio, las ubicaciones genealógicas no estuvieron relacionadas con la asociación de hospedantes. Sin embargo, en este estudio un aislado obtenido a partir de *Ar. hortorum* (ARG_2019_052) se ubicó en el clado de *C. kikuchii*. Por lo tanto, se necesitan realizar estudios adicionales, más abarcativos, para dilucidar si realmente el “linaje 1” obtenido en los estudios de Soares et al. (2015) y Borges et al. (2018), que contiene solamente a la especie *C. kikuchii*, realmente contiene o no individuos que solamente infectan soja. Borges et al. (2018) concluyen que la ausencia en el linaje 1 (monofilético para *C. kikuchii*) de especies hospedantes distintas de la soja sugiere que este linaje puede ser hospedante-específico, pero que se necesitan realizar más muestreos para confirmar esta hipótesis; y que el complejo patrón de los

arreglos de múltiples especies y el intercambio de síntomas observados en este patosistema requiere una reevaluación del concepto de que la mayoría de las especies de *Cercospora* spp. son estrictamente específicas de un determinado hospedante. En este sentido, estudios recientes inclinarían la balanza en este sentido. Por ejemplo, *Cercospora brachiata* fue reportada recientemente por primera vez como agente causal de la mancha foliar del amaranto delgado (*Amaranthus viridis*) en Brasil (Vieira et al., 2019). En EE. UU., Doyle et al. (2019) han confirmado recientemente por primera vez la presencia de *C. flagellaris* infectando plantaciones comerciales de *Cannabis sativa* para uso medicinal. En Corea del Sur, Park et al. (2020) reportaron por primera vez tizón por *Cercospora* en melón (*Cucumis melo* L.) causado por *C. cf. flagellaris*. En China, Chai et al. (2021) reportaron por primera vez tizón por *Cercospora* en Okra (*Abelmoschus esculentus*) causado por *C. cf. flagellaris*. En Irán, recientemente Bakhshi et al. (2021) encontraron que *C. cf. flagellaris* fue la especie dominante en síntomas de tizón en poroto (*Phaseolus vulgaris*) y caupí (*Vigna unguiculata*). En Argentina, *Conyza bonariensis* fue recientemente confirmada como hospedante alternativo de varias especies dentro del complejo de especies de *Colletotrichum*, incluyendo los agentes causales de antracnosis en soja y antracnosis y pudrición del tallo en maíz (*C. truncatum*, *C. orchidearum*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola*, *C. boninense* y *C. destructivum*) (Bonacci et al., 2020). De acuerdo con el análisis de estos autores, *Conyza* spp. podría ser un hospedante alternativo de especies de *Cercospora*. Por lo tanto, queda confirmado que varios hospedantes alternativos son una probable fuente de inóculo primario y por ende un reservorio potencial del TH/MPS en campos de soja. Este aspecto fue anteriormente subestimado y, de acuerdo con los estudios realizados principalmente en Brasil y en menor medida en esta tesis, y si bien hay que profundizar el muestreo de varios hospedantes potenciales en diversas regiones de Argentina, los hospedantes secundarios u alternativos parecerían ser una fuente importante de inóculo primario para el ciclo de la TH/MPS en Argentina. Es importante resaltar que, en cuanto al manejo agronómico, este aspecto deber ser tenido en cuenta. Futuros estudios deberán estimar el impacto epidemiológico de este reservorio del patógeno y también su contribución en la variabilidad genética de las distintas especies patógenas que albergan.

CAPÍTULO 3

Análisis de la sensibilidad y resistencia de aislados argentinos de *Cercospora* spp. causantes de tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla de soja a fungicidas

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Manejo químico del TH/MPS

El uso de fungicidas constituye una herramienta táctica de gran utilidad que debe formar parte de una estrategia definida del manejo integrado de las enfermedades (**MIE**) (Hirooka y Ishii, 2013). Cuando la resistencia genética, la rotación de cultivos, el tratamiento de semillas y las demás prácticas culturales no reducen o eliminan el inóculo y son insuficientes para evitar pérdidas económicas, el control químico con aplicaciones a los órganos aéreos es una medida de manejo de emergencia. En Argentina, el control químico se utiliza para el manejo de las EFC como grupo, dentro del cual se encuentra el TH/MPS (Carmona et al., 2011d, 2015b; 2017a).

Dado que esta práctica significa un costo adicional de producción (20 a 30 US\$/ha), se debe determinar cuidadosamente la necesidad puntual de esta aplicación en cada lote-ambiente particular. Para cumplir este objetivo se deben estudiar las características particulares que poseen las EFC, que las diferencian de otras enfermedades, como por ejemplo la Mancha ojo de rana (MOR). Para el manejo químico de la MOR en Argentina, se ha diseñado un umbral de daño económico (**UDE**) clásico, ya que es una mancha foliar con un período de incubación corto (enfermedad subaguda) (Carmona et al., 2015c). En cambio, las EFC presentan períodos de incubación y latencia (tiempo desde la infección hasta la aparición de síntomas y fructificaciones, respectivamente) prolongados (Kulik, 1984; Sinclair, 1991; Larran et al., 2002; Klingelfuss & Yorinori, 2001; Yorinori, 2011). Es decir, hay infecciones que avanzan lentamente y que no son visualizadas en el corto plazo como sucede con otras enfermedades. Por ello, los síntomas de las EFC se desarrollan más intensamente hacia el final del ciclo del cultivo, a partir de R5.5 (llenado de grano), alcanzando su plenitud en los estadios R6-R7 (semilla completamente desarrollada – inicio de maduración fisiológica) (Klingelfuss & Yorinori, 2001). Específicamente para el TH, Chanda et al. (2014) desarrollaron un protocolo para la detección de *C. kikuchii* en hojas de soja infectadas naturalmente, basado en PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR). Estos investigadores documentaron un prolongado período de infección latente antes de la aparición de síntomas visibles,

iniciando en el estadio V3 (22 días desde la siembra). Esta característica de esta enfermedad dificulta la adopción del control químico, ya que, en los estadios avanzados del cultivo, cuando se observan los síntomas (R5.5-R7), el daño causado por las EFC ya se produjo durante el período crítico de generación del rendimiento (R3-R5.5) y es tarde para realizar una aplicación de fungicidas.

Actualmente, gran parte de las decisiones químicas para el control de las EFC están frecuentemente determinadas por el estado fenológico del cultivo (visión fitocéntrica que indica aplicar en R3 o R5) o por el precio de la tonelada de soja, obteniendo resultados erráticos e inestables y vinculados las condiciones ambientales. Este problema debería ser resuelto mediante el desarrollo de conocimiento y tecnología que permita indicar con precisión el momento de la aplicación de fungicidas, su relación con el ambiente (Swoboda & Pedersen, 2009) y garantizar un uso racional de productos y el retorno económico al productor. Para abordar esta problemática en Argentina, Carmona et al. (2010, 2011a, 2015b, 2018a) determinaron por un lado las condiciones ambientales y agronómicas que favorecen el desarrollo epidemiológico de las EFC, y por otro lado desarrollaron y validaron un sistema de puntuación para orientar la decisión de aplicación de fungicidas para el manejo de las EFC, especialmente para mancha marrón (*S. glycines*) y TH/MPS (*C. kikuchii*). El sistema guía el control químico de estas enfermedades, garantizando en la mayoría de los casos el retorno económico de la aplicación. El sistema orienta el momento de la aplicación de fungicidas para el control de las EFC, evitando aplicaciones innecesarias o fijas por fenología y asegurando una respuesta en los rendimientos con un margen económico neto de la aplicación rentable.

1.2. Fungicidas usados en Argentina para el control de las EFC

Los fungicidas son sustancias químicas de origen natural o sintético que, aplicados a las plantas, las protegen de la penetración y/o posterior desarrollo de hongos patógenos en sus tejidos. La acción fungicida generalmente se expresa en una de dos maneras físicamente visibles: la inhibición de la germinación de esporas o la inhibición del crecimiento micelial general de los hongos. La mayoría de los fungicidas impiden la germinación de esporas o directamente las matan, inmediatamente después de iniciado el proceso de germinación de aquellas. Algunos de estos inhibidores químicos también retardan o detienen el crecimiento de hongos cuando se aplican después de que la etapa infecciosa se ha desarrollado. Todos los fungicidas son inhibidores metabólicos, es decir, bloquean algún proceso metabólico vital de los hongos. El **mecanismo bioquímico o modo de acción (MoA)** hace referencia a cómo la molécula fungicida ejerce su acción bioquímicamente, es decir, cual es el lugar, enzima o ruta metabólica específica dentro de la célula fúngica donde actúa. De esta manera, caracteriza el proceso toxicodinámico por el cual el terapéutico ejerce la acción biológica sobre el microorganismo (Reis y Carmona, 2013a).

La **fungitoxicidad** es un atributo propio de la molécula fungicida, y la **sensibilidad** está relacionada con la estructura del sitio en donde actúa el fungicida en la especie de hongo considerada. Por lo tanto, el producto químico, en razón de sus características moleculares, presenta fungitoxicidad (es tóxico al hongo y el fungicida es usado para su control). Por otro lado, el hongo, en razón de sus características genéticas, presenta o no sensibilidad a una dada molécula. Si el hongo es naturalmente sensible al fungicida, éste presenta fungitoxicidad, en caso contrario, es atóxico. De esta manera, si la molécula es atóxica, el hongo es considerado naturalmente insensible, atributo que depende de las interacciones entre las características de la molécula y de la genética del hongo. No todos los hongos son sensibles a todos los fungicidas, algunos son siempre insensibles a ciertas moléculas. De manera similar, no todas las sustancias químicas fungicidas tienen propiedades tóxicas por igual para todos los hongos. Edgington et al. (1971) propusieron un criterio de clasificación de fungitoxicidad para una determinada combinación de ingrediente activo (**i.a.**) fungicida y una especie fúngica, basado en la concentración de i.a. capaz de inhibir el 50% de la germinación de esporas o del crecimiento micelial. La comunidad científica internacional la denomina concentración efectiva (**EC₅₀**, del inglés: *effective concentration*). La EC₅₀ se determina experimentalmente *in vitro* para la población de un determinado patógeno. El criterio propuesto por Edgington et al. (1971), si bien es obsoleto, sirve de referencia ya que no se cuenta con datos experimentales actuales organizados para cada género y especie de hongo. De acuerdo con este criterio de clasificación de fungitoxicidad, se considera una sustancia como altamente fungitóxico si presenta $EC_{50} \leq 1 \mu\text{g/mL}$, moderadamente fungitóxico si tiene una EC₅₀ entre 1 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y no tóxico cuando presenta $EC_{50} \geq 50 \mu\text{g/mL}$. Por lo tanto, un valor bajo de EC₅₀ indica que un determinado i.a. fungicida posee una elevada acción fungicida contra los géneros o especies o aislados evaluados.

El Comité de acción para la resistencia a fungicidas (**FRAC**, del inglés: *Fungicide Resistance Action Committee*) ha clasificado los fungicidas de acuerdo con el MoA y el concomitante riesgo a generar resistencia. Los principales MoA más importantes actualmente en uso a nivel mundial incluyen el grupo de los inhibidores de la quinona externa (**QoIs**, del inglés: *quinone outside inhibitor fungicides*), químicamente conocidos como estrobilurinas; los inhibidores de la desmetilación (**DMIs**, del inglés: *demethylation inhibitor fungicides*), dentro del cual se encuentran los fungicidas conocidos según su composición química como triazoles; los inhibidores de la succinato deshidrogenasa (**SDHIs**, del inglés: *succinate dehydrogenase inhibitor fungicides*), químicamente conocidos como carboxamidas; inhibidores de la β -tubulina y consecuentemente la mitosis o división celular, químicamente conocidos como los benzimidazoles (**MBC**, del inglés: *methyl benzimidazole carbamate*) y los fungicidas de acción multisitio (**M**). A continuación, se detalla cada grupo.

1.2.1 Desorganización de las funciones de membrana celular. Inhibición de la biosíntesis de esteroides (IBE) (G). Fungicidas inhibidores de la desmetilación (DMIs) (G1).

La función de los esteroides es, principalmente, la de mantener la integridad y la fluidez de la membrana citoplasmática (Rodríguez, 2018). Éstos están presentes en todos los organismos eucariotas. En el caso de los hongos, la biosíntesis de los esteroides se realiza a partir de acetil-coA (Alcazar-Fuoli y Mellado, 2013). Con este último se produce **ergosterol**, que en la mayoría de los hongos es el principal esteroide (Yang et al., 2015). El papel que desempeña el ergosterol en el mantenimiento de la función de la membrana es único. Tal es así que una reducción en su disponibilidad produce la ruptura de la membrana y la consecuente salida de electrolitos y pérdida de funcionalidad de las células generando la muerte de las mismas (Jordá y Puig, 2020). La citada ruta de biosíntesis del ergosterol se encuentra presente en la mayoría de los hongos (Ascomycetes, Deuteromycetes y Basidiomycetes) pero está ausente en los Oomycetes (Géneros *Bremia*, *Peronospora*, *Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Phytophthora*, *Pythium*, etc.). Por lo tanto, este último grupo es insensible a este tipo de fungicidas, ya que no sintetizan el ergosterol. Además, estos inhibidores de la biosíntesis de esteroides no se pueden utilizar para inhibir la germinación de esporas. En este caso las mismas dependen de reservas de esteroides que se encuentran almacenadas y la germinación puede proceder en ausencia de su biosíntesis (Reis y Carmona, 2013a).

Los inhibidores de la biosíntesis de esteroides (IBE) inhiben la formación y selectividad de la membrana plasmática. Los inhibidores de la desmetilación o fungicidas DMI son un subgrupo dentro de los IBE, y actúan específicamente durante la ruta metabólica de síntesis de esteroides, inhibiendo la enzima 14 α -desmetilasa, codificada por el gen *cyp51* (Ziogas y Malandrakis, 2015). De esta manera, el MoA es la inhibición de la desmetilación en la posición 14 del lanosterol o en la posición 24 del metileno dihidroesteroide, precursores del ergosterol. Esta enzima **CYP51** requiere la acción conjunta con la hemoproteína NADPH citocromo P450 reductasa (CPR, del inglés: *cytochrome P450 reductase*) como su socio redox principal para la actividad funcional. CPR es una flavoproteína que contiene cantidades iguales de los cofactores flavina adenina dinucleótido (FAD) y mononucleótido de flavina (FMN), cada uno localizados dentro de su propio dominio estructural, unidos entre sí por una región de puente péptido-helicoidal (Murataliev et al., 2004). La mayoría de los triazoles se unen fuertemente a la enzima CYP51, como por ejemplo epoxiconazole (K_d , 17 nM), tebuconazole (K_d , 27 nM) y triadimenol (K_d , 30 nM), excepto el prothioconazole, que se une débilmente (K_d , 14 μ M), de una manera atípica, no a través de la coordinación directa con el átomo de hierro del grupo hemo (K_d = dissociation constant = constante de disociación). En este último caso, la forma prothioconazole-desthio es el derivado activo del prothioconazole, que demostró ser el inhibidor más potente de CYP51 (Mullins et al., 2011; Parker et al., 2011, 2013; Price et al., 2015b). Este grupo de fungicidas se caracteriza por su amplio espectro de acción (Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes), movilidad sistémica, y acción protectora, curativa y erradicante. Ejemplos de i.a. DMIs son: difenoconazole, cyproconazole, epoxiconazole, tebuconazole, prothioconazole, etc (Figura 100).

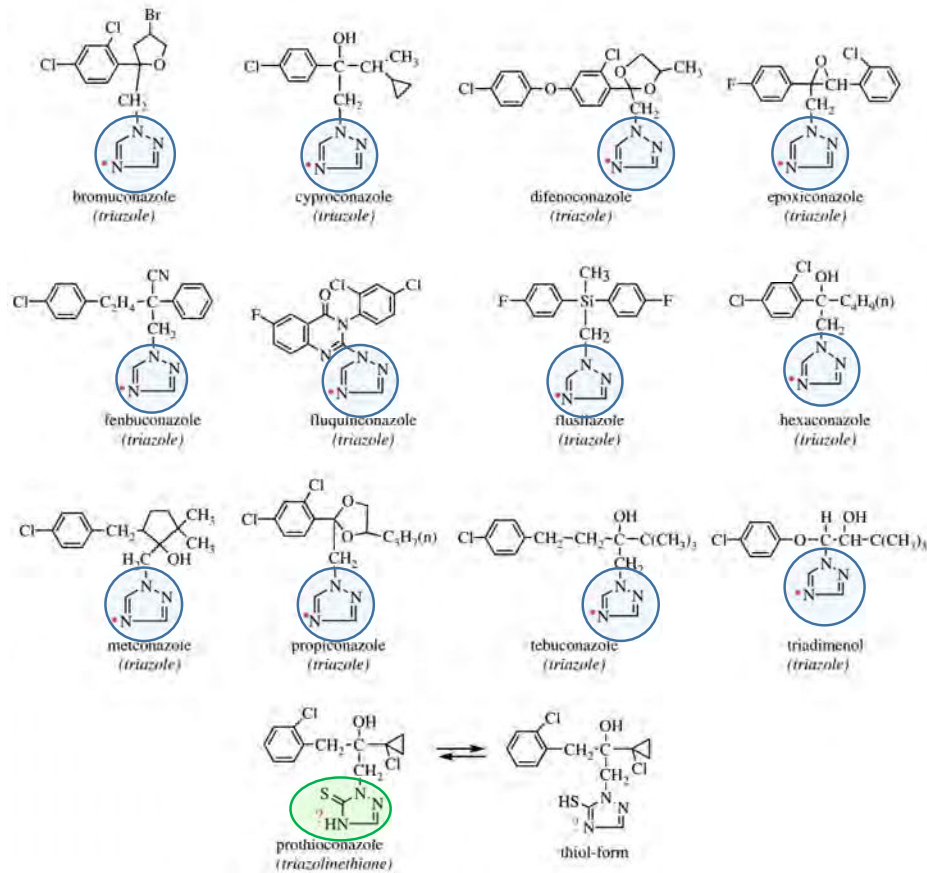


Figura 100. Estructura molecular de varios fungicidas inhibidores de la esterol 14α -desmetilación (DMI). Con un círculo se indica el grupo 1,2,4-triazol en cada molécula. El átomo de N no protonado (\bullet) de los derivados de piridina, pirimidina, imidazol y triazol coordina el hierro hemo de la esterol 14α -desmetilasa (Cyp51). Adaptado de: Leroux y Walker, 2011.

1.2.2. Fungicidas inhibidores de la respiración celular (C).

1.2.2.1. Inhibidores del complejo mitocondrial III (C3).

Estos fungicidas inhiben la respiración mitocondrial de los hongos al bloquear la cadena de transporte de electrones. Esta acción interfiere la formación de ATP, energía vital para el crecimiento y todas las funciones celulares de los hongos. Actúan inhibiendo la respiración en un punto específico: se unen al sitio de unión externo de la coenzima Q en el complejo enzimático III, por lo que se los denomina fungicidas QoI (del inglés: *quinone outside inhibitor*) (Bartlett et al., 2002). Es decir, que los fungicidas QoI inhiben la respiración mitocondrial de los hongos al unirse al complejo enzimático citocromo bcl (complejo III, ubicado en la membrana mitocondrial), específicamente en el sitio de unión denominado Qo, en referencia al sitio de unión externo de la quinona o coenzima Q (inhibición competitiva) (Link

et al., 2003; Sierotzki, 2015). Químicamente se conocen como estrobilurinas, ya que la molécula inicial se aisló del hongo *Strobilurus tenacellus*. El estado de desarrollo del ciclo vital de los hongos que posee mayor sensibilidad a las estrobilurinas es la germinación de las esporas, ya que es una etapa en la que la cantidad de energía celular requerida para penetrar al hospedante es máxima (Solomon et al., 2003; Divon y Fluhr, 2007). Este es un momento crítico para el desarrollo del patógeno ya que, si no logra penetrar en el menor tiempo posible, corre el riesgo de ser expuesto a condiciones ambientales desfavorables (ej. desecación) y morir (Agrios, 2005). Es por ello que los fungicidas QoI poseen una elevada acción preventiva, cuando son aplicados en el momento correcto, es decir, antes de la deposición/germinación de las esporas sobre la superficie de las plantas. El espectro de actividad de este grupo es amplio. Ejemplos de i.a. QoIs son: azoxistrobina, kresoxim-metil, trifloxistrobina, picoxistrobina, piraclostrobina, etc (Figura 101).

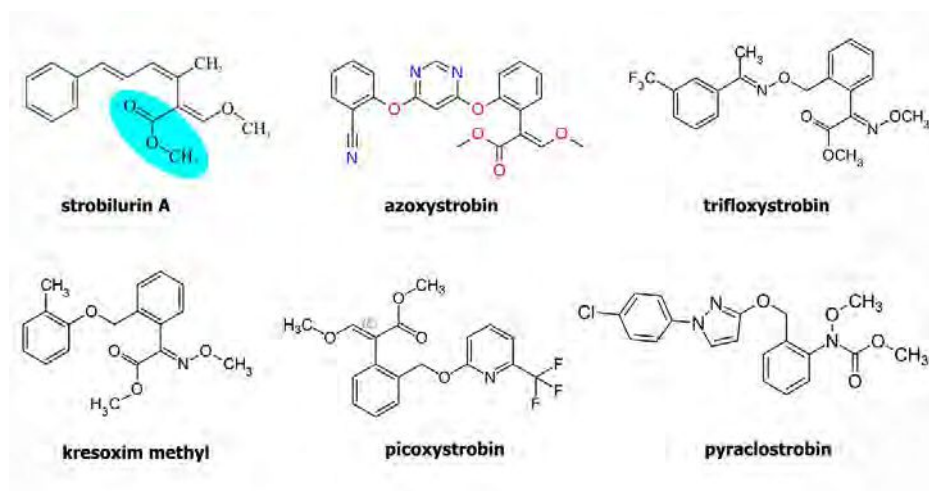


Figura 101. Estructura molecular de varios fungicidas inhibidores de la quinona externa (QoI) en el complejo mitocondrial III. Los ingredientes activos de las estrobilurinas son análogos sintéticos de metabolitos secundarios naturales conocidos como ácidos p-metoxiacrílicos, como por ejemplo strobilurin A, en la que se indica en azul el grupo éster metílico.

1.2.2.2. Inhibidores del complejo mitocondrial II (C2).

La enzima succinato deshidrogenasa (SDH), o complejo enzimático mitocondrial II, es una flavoproteína ligada a la membrana mitocondrial interna que interviene tanto en el ciclo de Krebs como en la cadena de transporte de electrones durante la respiración celular. Este complejo enzimático contiene cuatro subunidades: una flavoproteína (SDHA), una subunidad de hierro-azufre (SDHB) y dos

subunidades de anclaje de membrana (SDHC y SDHD). Al igual que los inhibidores del complejo mitocondrial III, estos fungicidas inhiben la respiración mitocondrial por el bloqueo de la transferencia de electrones, pero específicamente inhibiendo el complejo II o SDH. Por esta razón se los denomina fungicidas SDHI (inhibidores de la enzima succinato deshidrogenasa). Químicamente se conocen como carboxamidas, y trabajan de manera muy similar a las estrobilurinas, anulando los sistemas de producción de energía sobre los cuales los hongos se basan para crecer y proliferar. Esta es la razón por la cual las carboxamidas también se comportan de manera protectora o preventiva, al ser más eficientes en la inhibición de la germinación de las esporas de los hongos. También poseen actividad persistente al interactuar con diferentes componentes foliares de la planta. Asimismo, al igual que los QoI, padecen de un alto riesgo de generar resistencia en los hongos cuando se usa frecuentemente, a bajas dosis y en forma individual. Ejemplos de i.a. SDHIs son: pydiflumetofen, benzovindiflupyr, bixafen, fluindapyr, fluxapyroxad, furametpyr, inpyrfluxam, isopyrazam, penflufen, penthiopyrad, sedaxane (Figura 102).

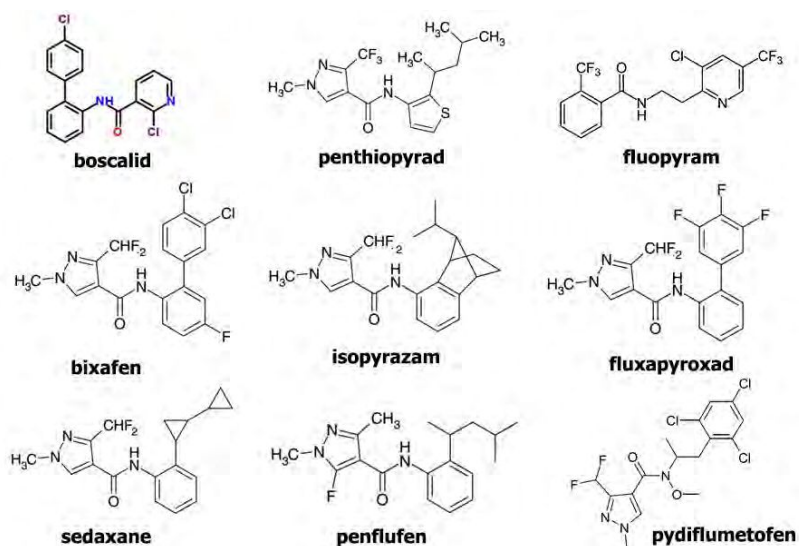


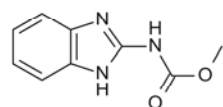
Figura 102. Estructura molecular de varios fungicidas inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHI).

1.2.3. Fungicidas inhibidores de la β -tubulina

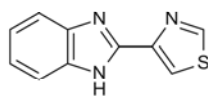
Pertencen al grupo de los MBC, más comúnmente conocidos como benzimidazoles. Los i.a. de este MoA actúan principalmente mediante la unión a la tubulina fúngica inhibiendo el ensamblaje de los microtúbulos y consecuentemente interfiriendo la mitosis y el normal desarrollo del citoesqueleto de hongos (Davidse, 1986; Davidse, 1988). La familia de las tubulinas está formada por las proteínas globulares: tubulinas alfa (α), beta (β) y gamma (γ). La tubulina es un dímero de proteínas, constituida por subunidades α y β . Los microtúbulos son hélices alternadas de α y β -tubulinas que forman parte

esencial del citoesqueleto de la célula fúngica. Además, son activas en la formación del huso mitótico o meiótico y en la segregación de los cromosomas durante la división celular. Los fungicidas de este grupo desintegran la tubulina evitando el ensamblaje de microtúbulos y por lo tanto bloqueando la división celular (Young, 2015). El sitio bioquímico de acción es un aminoácido de la β -tubulina. De esta forma, los benzimidazoles interfieren la mitosis durante la división de la metafase. El huso mitótico es destruido y los núcleos hijos fracasan en separarse, resultando en la muerte de la célula (Davidse, 1986; Davidse e Ishii, 1995; Delp, 1995). Los benzimidazoles o MBC tales como el carbendazim, el benomil y el metil tiofanato no afectan la germinación de esporas, pero inhiben la elongación del tubo germinativo y el crecimiento del micelio a bajas concentraciones (Davidse, 1986). Poseen actividad en un amplio rango de Ascomycetes, Deuteromycetes y Basidiomycetes. Sin embargo, aunque la β -tubulina está altamente conservada entre los hongos, la sensibilidad a una determinada molécula MBC difiere entre diferentes especies fitopatógenas debido a diferencias en la secuencia de aminoácidos que conforman la β -tubulina (Zhu et al., 2018). Ejemplos de i.a. MBC son: benomil, carbendazim, fuberidazol, tiabendazol, tiofanato metílico (Figura 103).

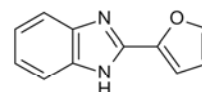
Benzimidazoles



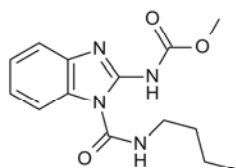
carbendazim



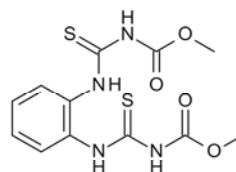
thiabendazole



fuberidazole



benomyl



thiophanate-methyl

Figura 103. Estructura molecular de diferentes benzimidazoles. Fuente: Young, 2015.

1.2.4. Fungicidas de acción multisitio

Los fungicidas de acción multisitio son aquellos que actúan en múltiples enzimas y moléculas de la célula fúngica, es decir, poseen múltiples sitios de acción. En general, son fungicidas no penetrantes, tópicos o inmóviles, que permanecen en la superficie vegetal sin ingresar a los tejidos de la planta, o con una penetración mínima. Son denominados de contacto o protectores, de acción residual, en relación a la absorción de los fungicidas por el inóculo (esporas). En general, tienden a ser de amplio espectro, y se usan casi siempre como preventivos o protectores (en relación al momento de aplicación

y las subfases del proceso de infección interferidas) (Thind y Hollomon, 2018). Forman una capa sobre la superficie vegetal (hojas o semillas) que dificulta el desarrollo del hongo antes de su penetración en el hospedante. Debido a su MoA, los fungicidas multisitio se consideran un grupo de bajo riesgo para la generación de resistencia por parte de los patógenos. En las últimas décadas, casi no se han reportado casos de resistencia de campo contra fungicidas de acción multisitio. Por lo tanto, estos i.a. ofrecen la posibilidad de ser usados como fungicidas acompañantes en las mezclas de i.a. unisitio o alternar con fungicidas monisitio y otros fungicidas con riesgo de generación de resistencia media a alta. Por esta razón, los fungicidas multisitio se consideran una herramienta valiosa para manejar la resistencia al prevenir o retrasar su desarrollo (Gullino et al., 2010). Ejemplos de fungicidas multisitio son: chlorothalonil, mancozeb, thiram, captan, folpet, cobre, azufre (Figura 104).

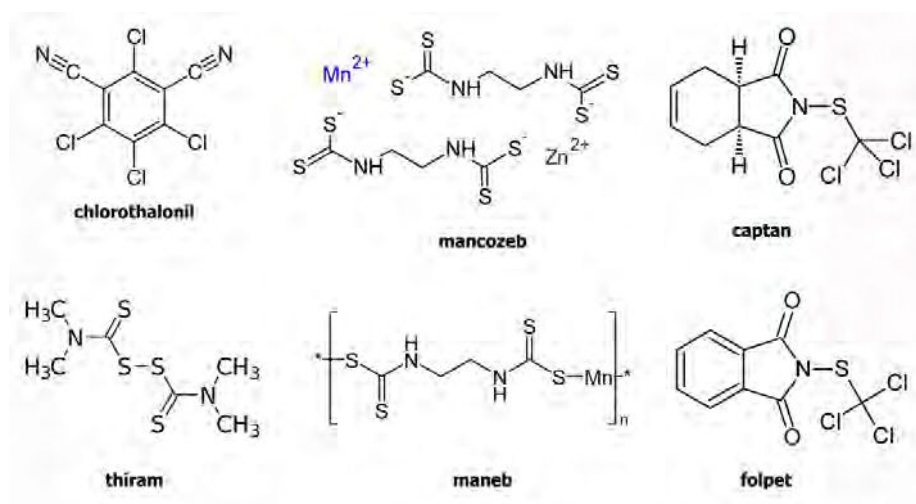


Figura 104. Estructura molecular de diferentes fungicidas de acción multisitio. Fuente: Zamora-Sequeira et al. 2019 (mancozeb).

1.2.5. Mezclas comerciales de ingredientes activos fungicidas

Con la necesidad de combinar diferentes MoA, aumentar el espectro de acción y retrasar el surgimiento de resistencia de hongos a los diferentes i.a. fungicidas, la utilización de mezclas comerciales de estrobilurinas asociadas con triazoles marcó un nuevo concepto en la protección química de los cultivos (Carmona et al., 2011d). Mediante esta mezcla, se logró aumentar no sólo el espectro de acción sino también el período de protección (persistencia) en numerosos y diversos cultivos. Estas mezclas combinan diferentes MoA de los i.a. junto con diferentes tipos de movimientos de las moléculas en la planta. Las mismas consideraciones aplican para las “triples mezclas”, las cuales incluyendo carboxamidas (SDHIs), estrobilurinas (QoIs) y triazoles (DMIs). Actualmente, estas triple mezclas son

las que poseen el mayor nivel de control y persistencia observados a campo cuando son usados para la protección contra enfermedades en cultivos extensivos de grano (Carmona et al., 2017a). Si bien las mezclas de estrobilurinas más carboxamidas aumentan la eficiencia de control, sus MoA son similares (inhibición de la respiración celular). Por lo tanto, es muy importante mezclar estos dos MoA semejantes con un tercero bien diferente, como por ejemplo los triazoles, para disminuir o retrasar la generación de resistencia por parte de los patógenos (Carmona y Sautua, 2017; Carmona et al., 2018b). Los fungicidas SDHI se han introducido al mercado recientemente, en los últimos años, y siempre en mezclas con DMI + QoI. La primer triple mezcla introducida en Argentina se desarrolló para el cultivo de soja en el 2015 (Carmona MA y Sautua FS, sin publicar), incluyendo los i.a. fluxaproxad (SDHI) + pyraclostrobin (QoI) + epoxiconazole (DMI). Por lo tanto, en las mezclas de i.a. se combinan el efecto preventivo (estrobilurina, carboxamida) más el curativo (triazol). Estas dobles y triples mezclas comerciales son las que actualmente se utilizan en la Argentina para el manejo de las EFC de la soja.

1.3. Resistencia a fungicidas

El control químico de las enfermedades de cultivos es una de las medidas de manejo destinadas a la protección vegetal más empleadas en la agricultura moderna debido, en parte, a la escasez de cultivares genéticamente resistentes y, también, a que los fungicidas se han convertido en una parte integral de la producción eficiente de alimentos (Morton y Staub, 2008; Hirooka e Ishii, 2013; Oliver y Hewitt, 2014). Sin embargo, las poblaciones de hongos objeto de control pueden generar resistencia a diferentes fungicidas, tornando a estos insumos fitosanitarios ineficientes, lo que a su vez genera graves problemas para los productores agrícolas, las empresas y a la comunidad en general (Garrán et al., 2001; Brent y Hollomon, 2007; Brent, 2012; Mikaberidze y McDonald, 2015; Carmona y Sautua, 2017; Fones et al., 2020). El surgimiento de resistencia a los diferentes i.a. fungicidas en los diferentes hongos agentes causales de enfermedades se ha tornado hoy en día uno de los aspectos más importantes de la agricultura moderna (Russell, 1995; Brent y Hollomon, 2007; Deising et al., 2008; Hahn, 2014; Hobbelen et al., 2014; Hollomon, 2015; Lucas et al., 2015; Carmona et al., 2018b; Fisher et al., 2018).

La resistencia se detecta por primera vez a campo cuando tarde o temprano, luego de algunos años de uso comercial de un producto fungicida, surgen poblaciones del hongo patógeno objeto de control que ya no son lo suficientemente sensibles para ser controladas adecuadamente. Generalmente, la resistencia aparece o surge como una respuesta al uso repetido de un determinado i.a. fungicida, o al uso repetido de otro i.a. que está relacionado química y/o bioquímicamente a través de un MoA antifúngico común (Brent y Hollomon, 2007). En la práctica, la primera evidencia de aquella alteración es observada por el productor agrícola, que reclama “fallas de control”. En esa situación, el control pasó de ser eficiente o económico a ineficiente y antieconómico y, el productor, al comparar con campañas anteriores, observa y detecta que la eficiencia del fungicida disminuyó (Arduim et al., 2007; Ishii, 2015).

Este fenómeno se debe a la reducción de sensibilidad a un determinado i.a. fungicida por parte de una subpoblación del patógeno causante de la enfermedad. La reducción de la sensibilidad de los patógenos a los fungicidas ocurre, por lo general, como una respuesta al uso repetido de un fungicida sitio específico, o al uso repetido de otro fungicida que posee un MoA en común. La pérdida total de sensibilidad ocurre cuando un hongo sensible se torna totalmente insensible o totalmente resistente a un fungicida. De esta manera, dos definiciones básicas de resistencia a fungicidas deben primero ser consideradas (Delp y Dekker, 1985; Russell, 2003b): la “resistencia de campo” (field resistance), que se caracteriza por la aparición de cepas resistentes que se pueden vincular causalmente con la disminución de la eficiencia de control de los fungicidas cuando se usan de acuerdo a las recomendaciones de la etiqueta; y la “resistencia de laboratorio” (laboratory resistance), que sólo puede demostrarse en situaciones especiales de laboratorio.

Por definición, la resistencia a los fungicidas implica una adquirida y heredable reducción de la sensibilidad de un hongo a un i.a. antifúngico específico (Beckerman, 2013). Este proceso biológico ocurre cuando algunos individuos de la población fúngica que se encuentra bajo estrés por ser sometida a la acción del i.a. fungicida, logran sobrevivir, multiplicarse y propagarse (Hobbelen et al., 2014). Este proceso involucra una sustitución genética gradual de la población susceptible original del patógeno por una nueva población genética y bioquímicamente distinta, que confiere resistencia. Existen diferentes mecanismos bioquímicos que confieren resistencia a los fungicidas, pero el más común implica una alteración en el gen que codifica para la proteína o enzima sitio de acción primario de la molécula fungicida dentro de la célula del patógeno objeto de control (Brent y Hollomon, 1998). Este desarrollo puede ser discreto (como resultado de una única mutación génica) o gradual (considerado como poligénica) (Brent y Hollomon, 2007). Las cepas resistentes se originan de mutaciones genéticas espontáneas. Las mutaciones más comunes son mutaciones puntuales, que resultan de una incorporación incorrecta de nucleótidos durante la replicación del ADN, o de una reparación propensa a errores del ADN dañado (Marquardt, 1972). Una mutación puntual se produce cuando se altera un solo par de bases. Las mutaciones puntuales pueden tener uno de los tres efectos siguientes. En primer lugar, la sustitución de una base puede ser una mutación silenciosa, o sea, el codón alterado produce el mismo aminoácido. En segundo lugar, la sustitución de base puede ser una mutación sin sentido en que el codón alterado da lugar a un aminoácido diferente. En tercer lugar, la sustitución de una base puede producir una mutación sin sentido y el codón alterado puede corresponder a una señal de terminación (codón de stop o de terminación). Las mutaciones sinónimas son las mutaciones localizadas en la región codificante de un gen que no dan lugar a cambio de aminoácido (a veces también llamadas silenciosas, aunque este término significa que no tienen un efecto observable en el fenotipo del organismo). Estas mutaciones se producen debido a que el código genético es degenerado y algunos aminoácidos son codificados por diferentes combinaciones de tres nucleótidos. En otras ocasiones, la mutación altera la base situada en la tercera posición del codón, pero no causa sustitución aminoacídica. Las sustituciones nucleotídicas

que provocan un cambio de un aminoácido por otro se denominan **mutaciones no sinónimas**. En hongos, las tasas de mutación espontánea se correlacionan con los niveles de estrés en el entorno a los que son expuestos, por lo que esta característica bien puede ser adaptativa (Stanhope y Daida, 1997; Lamb et al., 2008). La frecuencia de tales mutaciones que podrían alterar la composición de aminoácidos, o crear codones de terminación (stop), está en el rango de 10^{-9} (Gressel y Levy, 2006). Sin embargo, debido a que el tamaño de las poblaciones naturales de patógenos causantes de enfermedades de cultivos es muy grande, es probable que las mutaciones puntuales ocurran diariamente, incluso durante epidemias moderadas (Hollomon y Brent, 2009). La sustitución de formas susceptibles por las resistentes sucede porque, bajo la acción continua del fungicida, la forma resistente se multiplica más rápidamente que la forma susceptible. Finalmente, estas cepas que logran sobrevivir empiezan a dominar esa población haciendo totalmente ineficiente al fungicida en cuestión (van den Bosch et al., 2011). De esta manera, la evolución de la resistencia a fungicidas puede ser dividida en dos fases: la de *emergencia* y la de *selección* (Brent et al., 1990; Brent y Hollomon, 1998). Durante la fase de emergencia, las cepas resistentes surgen o se generan a través de mutaciones escasas y raras, y luego, subsecuente y gradualmente invaden la población del patógeno. La longitud de la fase de emergencia, denominado tiempo de emergencia, puede ser definido como el tiempo que va desde la introducción de un nuevo MoA fungicida hasta que la cepa resistente logra establecer una subpoblación suficiente como para no ser exterminada aleatoriamente. La evolución de la resistencia entra entonces en la fase de selección, en la cual la aplicación de fungicidas incrementa la frecuencia de las cepas resistentes en la población patogénica global. El tiempo de emergencia de la resistencia (tiempo en que tarda en surgir la resistencia a un determinado i.a. fungicida en la población de un determinado patógeno desde el inicio de uso) es función del efecto combinado de la dosis sobre la densidad de la población del patógeno, la tasa de mutación y la probabilidad de invasión (fase de selección) (Hobbelen et al., 2014). El mismo principio puede observarse con el quiebre de variedades o cultivares resistentes: cuando cultivares con un gen de resistencia particular se cultivan extensivamente, las poblaciones de hongos pueden someterse a una fuerte presión de selección, lo que resulta en un aumento frecuencia de aislados virulentos hacia el correspondiente gen de resistencia (Van de Wouw y Howlett, 2012). Por lo tanto, a mayor presión de selección menor el tiempo en que la población de patógenos logrará quebrar esa resistencia o volverse resistentes a los fungicidas usados en forma continua sobre la población del patógeno.

Los fungicidas, por su propia naturaleza, pueden ser productos químicos altamente específicos que afectan a hongos patógenos específicos. Esta especificidad a menudo puede resultar en una rápida evolución de los patógenos. Por lo tanto, un factor importante para determinar el riesgo de resistencia a un fungicida particular es la base genética de la resistencia al compuesto en particular (Russell, 1995). Una pérdida abrupta de la eficacia de control es más probable cuando la resistencia es conferida por la mutación de un único gen importante. Es por ello que el sitio de acción del fungicida y el grado de especificidad de éste es uno de los aspectos más importantes que impulsan la evolución de los patógenos.

De manera que, fungicidas que tienen un solo MoA en una sola enzima o molécula fúngica específica (monositio o unisitio), por lo general, tienden a favorecer una generación y evolución más rápida de la resistencia. Ejemplos de este tipo de i.a. fungicidas son los inhibidores de la β -tubulina (benzimidazoles) (Davidse 1977, 1986, 1988; Davidse e Ishii, 1995; Delp, 1995; Davidson et al., 2006), los fungicidas QoI (estrobilurinas) (Gisi et al., 2002; Fisher y Meunier, 2008; Ishii, 2010; Sierotzki H, 2015) y los fungicidas SDHI (carboxamidas) (Avenot y Michailides, 2010; Fraaije et al., 2012; Scalliet et al., 2012; Stammler et al., 2015), entre otros. Este fenómeno se denomina **resistencia “cualitativa”** y no puede ser invertido fácilmente, incluso si se interrumpen o discontinúan los tratamientos. Por otro lado, otros grupos de fungicidas como por ejemplo los fungicidas DMI (triazoles) si bien poseen un solo sitio de acción, tienden a desarrollar **resistencia “cuantitativa”**, gobernada por varios factores génicos, la cual se acumula en el tiempo dando cambios graduales en la sensibilidad de la población de hongos, que pueden disminuir cuando se retiran las aplicaciones de fungicida (Stergiopoulos et al., 2003; Fraaije et al., 2011; Leroux y Walker, 2011; Ziogas y Malandrakis, 2015). De esta manera, el conocimiento del MoA de un i.a. puede indicar el nivel de riesgo a generar resistencia por parte de los hongos patógenos. Un MoA monositio altamente específico, en comparación con otro multisitio (varios sitios de control), es un indicador de riesgo (Steffens et al., 1996; Brent y Hollomon, 1998). Es por ello que la completa dependencia del control químico de un solo producto o MoA y la ausencia de rotación es la forma más eficiente de seleccionar hacia la resistencia contra la mayoría de los químicos (Gressel y Levy, 2006). Asimismo, la **resistencia cruzada** tiene un mayor riesgo de ocurrencia para grupos de MoA unisitio. Este fenómeno implica que moléculas fungitóxicas que pertenecen al mismo grupo químico con el mismo MoA (gobernados por el mismo factor génico), tienen la mayor probabilidad de no ser efectivas contra una cepa que ha generado resistencia contra otra molécula del mismo grupo de resistencia cruzada, aun cuando nunca fueron utilizadas contra ese patógeno (Brent y Hollomon, 1998). Este fenómeno implica que estas cepas de hongos que son resistentes a ese fungicida muy probablemente serán también resistentes a otros fungicidas relacionados, aun cuando todavía no han sido expuestos a aquellos, ya que poseen el mismo MoA.

1.3.1. Resistencia a Inhibidores de la quinona externa (QoIs)

En células eucariotas, la respiración celular se lleva a cabo mediante la cadena de transporte de electrones, la quimiosmosis forman la fosforilación oxidativa. La cadena de transporte de electrones se realiza por medio de una serie de proteínas y moléculas orgánicas que se encuentran en la membrana interna de las mitocondrias (Kühlbrandt, 2015). Los electrones pasan de un miembro de la cadena de transporte a otro en una serie de reacciones redox. La energía liberada en estas reacciones se captura como un gradiente de protones (gradiente electroquímico), que luego se usa para producir ATP en un proceso llamado quimiosmosis. Juntas, la cadena de transporte de electrones y la quimiosmosis forman la fosforilación oxidativa (Nolfi-Donagan et al., 2020). La cadena de transporte de electrones ocurre en

una colección de proteínas y moléculas orgánicas incrustadas en la membrana interna, la mayoría de ellas organizadas en cuatro grandes complejos enzimáticos, denominados complejos I al IV. En eucariotas, muchas copias de estas moléculas se encuentran en la membrana mitocondrial interna. A medida que los electrones viajan a través de la cadena, van de un nivel de energía más alto a uno más bajo, pasando de moléculas menos ávidas de electrones a más ávidas de electrones. La energía se libera en estas transferencias de electrones “cuesta abajo”, y varios de los complejos de proteínas utilizan la energía liberada para bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, formando un gradiente de protones. El tercer complejo enzimático, denominado citocromo bc₁, es una enzima multisubunitaria unida a la membrana interna de las mitocondrias, que participa de la cadena de transporte de electrones catalizando la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c y acopla esta transferencia de electrones a la translocación vectorial de protones a través de la membrana mitocondrial interna. El citocromo b es la subunidad central incrustada en la membrana que forma los sitios de unión (pocket binding) de ubiquinol denominados Q_o (o = outside, externo) y Q_i (inside, interno). De esta manera, el complejo citocromo bc₁ interviene en la respiración celular y la generación bioquímica de adenosín trifosfato (ATP) mediante fosforilación oxidativa (Keilin, 1925; Trumpower, 1990). La subunidad b del complejo enzimático III está codificada por el gen mitocondrial *cytb* (citocromo b). Mutaciones puntuales en *cytb* son atribuidas como las responsables de producir resistencia a los fungicidas QoI en hongos patógenos, al producir sustituciones de aminoácidos en la enzima codificada por dicho gen (Bolton et al., 2013; Sierotzki, 2015; FRAC, 2016). La transversión no sinónima (una mutación de nucleótidos que altera la secuencia de aminoácidos de una proteína) en *cytb* que conduce a una sustitución del aminoácido glicina (en la cepa sensible) por alanina (en la cepa resistente) en el codón 143 (G143A), confiere elevados niveles de resistencia a fungicidas QoIs sin efectos negativos sobre la actividad de la enzima (Sierotzki et al., 2000a, 2000b, 2007; Gisi et al., 2000, 2002; Bartlett et al., 2002; Bolton et al., 2013). Hasta el momento se han determinado tres mutaciones puntuales en *cytb* de aislados de hongos fitopatógenos provenientes de campo, denominadas G143A, F129L y G137R, que confieren resistencia a fungicidas QoIs (Sierotzki, 2015; FRAC, 2016). Diferentes aislados con mutaciones en diferentes codones en el *cytb* pueden tener diferentes niveles de resistencia. La resistencia conferida por mutaciones en las ubicaciones F129L y G137R generalmente se ha caracterizado como parcial, con factores de resistencia que van de 5 a 15 (FRAC, 2016). Por otro lado, la mutación G143A resulta en resistencia completa a los fungicidas QoI, con factores de resistencia en el orden de 100 (FRAC, 2016). La mutación G143A es la que más se ha correlacionado con la resistencia a fungicidas QoIs en una amplia variedad de hongos patógenos de muchos hospedantes diversos, ya que tiene el efecto más fuerte y también es la que está más extendida en términos de número de especies de patógenos afectadas, así como su frecuencia en las poblaciones naturales de aquellos (Ma y Michailides, 2005; Torriani et al., 2009; Castroagudín et al., 2015; Sierotzki, 2015; FRAC, 2016). La tasa de mutación en genes mitocondriales es mayor que la tasa de mutación de genes nucleares (Torriani et al., 2014).

La resistencia cruzada, conferida por una mutación puntual en particular (G143A, F129L o G137R), puede conferir resistencia a diferentes i.a. del mismo grupo QoIs. Todos los fungicidas QoI están en un grupo de resistencia cruzada entre sí (Heaney et al., 2000; Hnátová et al., 2003; Pasche et al., 2004; Wise et al., 2008, 2009; Oliveira et al., 2015). La presencia de la mutación G143A siempre se correlaciona bien con la resistencia cruzada hacia fungicidas QoI (Bolton et al., 2012b; Kim et al., 2003b).

En varios estudios se han detectado mutaciones que confieren resistencia a fungicidas QoI en especies patógenas del género *Cercospora*. Por ejemplo, Zhang et al. (2012a,b) detectaron por primera vez en EE.UU. 15 aislados de *C. sojina* altamente resistentes, provenientes del estado de Tennessee, con valores de EC₅₀ aproximadamente 249 a 7144 veces mayor que la concentración de referencia (baseline) para azoxistrobina, piraclostrobina y trifloxistrobina. En este estudio se utilizó el método de la inhibición del 50% de la germinación de conidios. Zeng et al. (2015) comprobaron que estos aislados resistentes de *C. sojina* contienen la mutación G143A en el gen del citocromo b, es decir, una transversión de guanina por citosina en la segunda posición del codón 143, que causa una sustitución de aminoácido de alanina por glicina. Por otro lado, Bolton et al. (2012) analizaron 992 aislados de *C. beticola* provenientes de campos, causante de la enfermedad más importante de la remolacha azucarera en EE.UU., denominada mancha foliar por *Cercospora*, provenientes de los estados de Minnesota y North Dakota, mediante PCR real time. Estos autores identificaron aislados con la mutación G143A en 12 campos. Recientemente, Albu et al. (2016a), Sautua et al. (2019a) y de Mello et al. (2021a) encontraron la mutación G143A como responsable de la resistencia observada a campo en aislados de *Cercospora* causantes de TH en Louisiana (E.E. U.U.), Bolivia y Brazil, respectivamente.

1.3.1.1. La vía alternativa de la oxidasa alternativa (AOX)

En los últimos años se ha documentado, mediante experimentos *in vitro*, la capacidad que poseen algunos hongos de utilizar una vía de oxidación alternativa mediante la enzima oxidasa alternativa (AOX, del inglés: *alternative oxidase*) (Ziogas et al. 1997; Wood y Hollomon, 2003). Sin embargo, no se sabe con qué frecuencia este proceso puede ocurrir espontáneamente *in vivo*. La AOX es una enzima que forma parte de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria de diferentes organismos (Day et al., 1995; Vanlerberghe, 1997, 2013). La oxidasa proporciona una ruta alternativa para el pasaje de los electrones a través de la cadena de transporte de electrones para reducir el oxígeno, evitando el complejo III (citocromo bc1) en el ciclo respiratorio. Debido a que varios pasos de bombeo de protones se omiten en esta vía alternativa, la activación de la AOX reduce la generación de ATP (Wood y Hollomon, 2003). Esta enzima se identificó por primera vez como una vía oxidativa distinta de la del citocromo c oxidasa ya que la AOX es resistente a la inhibición por el cianuro (Moore y Siedow, 1991). También se ha documentado que en algunos casos el crecimiento *in vitro* de aislados resistentes

a QoI se inhibe solo en presencia de inhibidores de la AOX. Algunos hongos tienen la capacidad de utilizar esta ruta de respiración alternativa, sin pasar por el complejo III, durante el transporte de electrones, en el ciclo de la respiración y, en consecuencia, evitar los efectos de los fungicidas QoI *in vitro*, lo que afecta significativamente los valores de concentración efectiva (EC_{50}) (Ziogas et al., 1997; Avila-Adame y Köller, 2003; Miguez et al., 2004). Sin embargo, este fenómeno se cree que ocurre sólo *in vitro*, y que *in vivo* es impedido por flavonas vegetales (Bartlett et al., 2002), ya que este mecanismo no es capaz de causar problemas de manejo de enfermedades a campo (Joseph-Horne y Hollomon, 2000). En términos prácticos, la AOX es una oxidasa terminal insensible a estrobilurinas que permite a los electrones desviarse desde el ubiquinol y evitar (bypass) al complejo III. Su síntesis es constitutiva en algunos hongos, pero en muchos otros es inducida por la inhibición de la vía principal. La AOX proporciona una vía metabólica insensible a estrobilurinas para la oxidación del NADH, pero la producción y conservación de energía es menos eficaz respecto a la cadena respiratoria completa.

Estudios previos indicaron que la oxidación alternativa se produce en algunas especies de *Cercospora*, y moléculas inhibitoras de AOX pueden ser utilizados para inhibir esta vía alternativa (Bradley y Pedersen, 2011; Zhang et al., 2012a, 2012b). Sin embargo, algunos trabajos de investigación han indicado que el SHAM (del inglés: salicylhydroxamic acid) y el galato de propilo (PG, del inglés: propyl gallate), otro inhibidor de AOX, pueden ser tóxicos para algunos hongos *in vitro* (Seyran et al., 2010; Liang et al., 2019). Estudios bioquímicos mostraron que el SHAM inhibió significativamente la actividad peroxidasa de *Botrytis cinerea* y la actividad esterasa de *Sclerotinia sclerotiorum* (Liang et al., 2019). Estos estudios demostraron que el SHAM produjo una fuerte inhibición *per se* sobre el crecimiento micelial de *Fusicladium effusum*, *B. cinerea* y *S. sclerotiorum*. Price et al. (2015a) determinaron que el SHAM fue tóxico para aislados de *C. flagellaris* de EE. UU., y por lo tanto utilizaron PG para el estudio de la respiración alternativa. Estos investigadores determinaron que el PG no afectó significativamente el crecimiento radial de los aislados de *Cercospora* de Louisiana.

1.3.2. Resistencia a Inhibidores de la desmetilación (DMIs)

La resistencia a los fungicidas DMI es un fenómeno complejo. Este grupo de i.a. fungicidas poseen un riesgo de generación de resistencia medio, del tipo poligénica (De Waard y Van Nistelrooy, 1990). De hecho, los primeros estudios sobre la resistencia a fungicidas DMI, utilizando experimentos cruzados, han demostrado la participación de hasta nueve genes diferentes, con efectos aditivos sobre la reducción de la sensibilidad de los aislados de diversos patógenos, avalando el modelo de control poligénico (De Waard y Van Nistelrooy, 1990; Gisi et al., 2000; Wood et al., 2001; Luo et al., 2008a,b; Cools y Fraaije, 2012; Cools et al., 2012; Talas y McDonald, 2015; Ziogas y Malandrakis, 2015; He et al., 2019; Mair et al., 2020).

Algunas mutaciones puntuales conocidas confieren tolerancia a fungicidas DMI. Por ejemplo,

una única mutación en el gen *cyp51* que codifica para la 14 α -desmetilasa, que resulta en la sustitución de TAT (en la cepa sensible) por TTT (en la cepa resistente) en el codón 136, conduce a la sustitución del aminoácido tirosina (Y) (en la cepa sensible) por fenilalanina (F) (en la cepa resistente). Esta mutación se denomina Y136F y se encontró en aislados de *Uncinula necator* resistentes a triadimenol (Delye et al., 1997). Esta mutación se encontró solamente en todos los aislados que presentaron un factor de resistencia (FR) superior a 5. No se encontró en los aislados sensibles o débilmente resistentes (FR<5). De los 91 aislados analizadas, solamente aquellos que presentaron un FR>5 fueron portadores de la mutación. Tres de los 19 aislados resistentes y todos los aislados sensibles y débilmente resistentes no poseían la mutación. Yan et al. (2009) llegaron a las mismas conclusiones al analizar 15 aislados de *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* de diferentes provincias de China. Sin embargo, estudios sobre *Venturia nashicola* (Cools et al., 2002) y *T. yallunda* (Wood et al., 2001) mostraron que la resistencia a DMIs en aislados de campo de estos hongos no estaba relacionado con cambios de aminoácidos en las proteínas codificadas por el gen *cyp51*. Por lo tanto, otros mecanismos alternativos, diferentes de las mutaciones en el gen objeto de control de los fungicidas DMI, podrían ser responsables de la resistencia. Por ejemplo, cambios en el nivel de expresión del gen *cyp51* podrían contribuir al desarrollo gradual de la resistencia a DMI. Hay varios mecanismos diferentes conocidos para aumentar la expresión del gen *cyp51* en hongos.

Por lo tanto, a lo largo de décadas de investigación, los estudios sobre los mecanismos bioquímicos implicados en la resistencia a fungicidas DMIs han documentado al menos tres modelos que explicarían los mecanismos de resistencia adquirida: 1) mutaciones no sinónimas en el gen *cyp51* que pueden alterar la unión de la molécula DMI (Sagatova et al., 2016), 2) insertos en las regiones promotoras de *cyp51* que conducen a la sobreexpresión de *cyp51* (Cools et al., 2012), y 3) sobreexpresión de genes transportadores transmembrana que codifican para “bombas de flujo” (Bolton et al., 2012, 2016; Omrane et al., 2015) y 4) múltiples copias *cyp51*, que parecen reducir los costos asociados con los cambios en la estructura de la C14-desmetilasa o la sobreexpresión del gen *cyp51* y aumentar el espectro de resistencia a los fungicidas (Mellado et al., 2001; Cools et al., 2013; Yun et al., 2014; Brunner et al., 2015; Talas y McDonald, 2015). Los datos disponibles de una serie de estudios bioquímicos y moleculares sobre la resistencia a DMIs parecen apoyar la hipótesis de que una combinación de los mecanismos de resistencia anteriores podría contribuir a la disminución de la eficacia en el campo de los fungicidas DMI.

1.3.3. Resistencia a Inhibidores de la β -tubulina (MBCs)

La resistencia a los benzimidazoles es conferida, la mayoría de las veces, por mutaciones alélicas en el gen *tub* que codifica para la proteína β -tubulina, lo que determina una reducción de la unión de las moléculas bencimidazoles a dicha proteína (Davidse y Flach, 1977; Jung et al, 1992; Cooley y Caten,

1993; Reijo et al., 1994). Algunas mutaciones puntuales que confieren resistencia a fungicidas benzimidazoles son conocidas. Por ejemplo, una transversión no sinónima de A → C en el codón 198 del gen *tub* da lugar a la sustitución Glu₁₉₈ → Ala₁₉₈, es decir, GAG (glutamato) en cepa sensible substituida por GCG (alanina) en cepa altamente resistente provoca la mutación E198A en la proteína tubulina, lo que confiere un elevado nivel de resistencia a benzimidazoles en muchos hongos patógenos (Ma y Michailides, 2005), incluyendo especies del género *Cercospora* (Davidson et al., 2006; Imazaki et al., 2006c). El primer reporte de resistencia de *C. kikuchii* a Metil-Tiofanato (MBC), fue realizada por Sakai (1999) en Japón, luego de 6 aplicaciones seguidas de metil-tiofanato durante una estación de crecimiento de soja. Posteriormente, Imazaki et al. (2006b,c) reportaron nuevamente resistencia a este i.a., en un estudio aún más extenso en Japón.

1.3.4. Resistencia a Inhibidores de la Succinato Deshidrogenasa (SDHs)

Varias mutaciones fueron detectadas en diferentes posiciones en tres subunidades (B, C, y D) de la SDH de aislados de campo de algunos patógenos de plantas tales como: *Botrytis cinerea* (Stammler et al. 2007; Veloukas et al. 2011; Fernández-Ortuño et al., 2019), *Corynespora cassiicola* (Miyamoto et al. 2009, 2010a), *Alternaria alternata* (Avenot and Michaelidis 2007), *Alternaria solani* (Miles et al. 2013), *Didymella bryoniae* (Avenot et al. 2012; Fernandez-Ortuno et al. 2012), *Podosphaera xanthii* (Miyamoto et al. 2010b), y *Sclerotinia sclerotiorum* (Glaetli et al. 2009); y en mutantes de laboratorio de *Z. tritici* (= *Mycosphaerella graminicola*) (Skinner et al. 1998; Stammler et al. 2010; Fraaije et al. 2012; Scalliet et al. 2012; Gutiérrez-Alonso et al., 2017; Steinhauer et al., 2019). Diferentes mutaciones se encontraron en un solo lugar (por ejemplo, B-P225L/F/T o B-H272Y/R/L/V en *B. cinerea*); y en diferentes lugares en diferentes subunidades (por ejemplo, B-H277Y, C-N75S, C-G79R, C-H134R, C-S135R, D-D124N/E, D-H143R, D-D145G en *Pyrenophora teres*) (Stammler et al. 2014). Recientemente en Brasil, se ha detectado la mutación SDHC-I86F en *P. pachyrhizi*. La frecuencia máxima de la mutación SDHC-I86F en la población del patógeno fue del 50%, dando como resultado poblaciones de ASR con baja sensibilidad a benzovindiflupyr y fluxapyroxad (de Mello et al., 2021b).

En la Tabla 29 se resumen los principales mecanismos de resistencia para los diferentes modos de acción de los principales fungicidas usados en la actualidad en Argentina.

Tabla 29. Resumen de los principales i.a. fungicidas disponibles en el mercado argentino y de los principales mecanismos de resistencia conocidos.

| Modo o Mecanismo Bioquímico de Acción (MoA) | | | Gupo químico (GQ) | Principios Activos Representativos | Mecanismo de resistencia | Genes involucrados | Mutaciones documentadas |
|---|-------------------------------|------------------------------------|-------------------|--|--|--------------------|---|
| Código FRAC | Nombre genérico y abreviación | Ruta metabólica | | | | | |
| B1 | MBCs (GQ) | Methyl Benzimidazole Carbamates | Benzimidazoles | benomil, carbendazim, fuberidazole, thiabendazole | Mutaciones en el gen de la β -tubulina | <i>tub</i> | Y50C, F167Y, E198A, E198G, E198K, E198L, E198Q, E198V, F200Y |
| C2 | SDHIs | Succinate dehydrogenase inhibitors | Carboxamidas | fluopyram, thifluzamide, boscalid, benzovindiflupyr, bixafen, fluxapyroxad, furametpyr, isopyrazam, penflufen, penthiopyrad, sedaxane | Mutaciones en el gen de la SDH o Complejo II | <i>sdh</i> | B-P225L/F/T, B-H272Y/R/L/V, B-H277Y, C-N75S, C-G79R, C-I86F, C-H134R, C-S135R, D-D124N/E, D-H143R, D-D145G |
| C3 | QoIs | Quinone outside Inhibitors | Estrobilurinas | azoxystrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin | Mutaciones en el citocromo b o Complejo III, heteroplasmia, activación de la respiración alternativa (AOX) | <i>cytb</i> | G143A, F129L, G137R |
| G1 | DMIs | DeMethylation Inhibitors | Triazoles | cyproconazole, difenoconazole, epoxiconazole, flutriafol, hexaconazole, myclobutanil, propiconazole, tebuconazole, triadimefon, triadimenol, triticonazole | Mutaciones en el gen de la 14 α -desmetilasa; Sobreexpresión <i>cyp51</i> ; Sobreexpresión de transportadores de membrana | <i>cyp51</i> | Y134 -, Y136-, Y137-, L50S, D107V, D134G, V136A, V136C/G, Y137F, M145L, N178S, S188N, S208T, N284H, H303Y, A311G, G312A, A379G, I381V, A410T, G412A, Y459C, Y459D/N/S/P, G460D, Y461D/H/S, Δ Y459, Δ G460, V490L, G510C, N513K, S524T, Y131F, Y131H, K142R, F120L, I145F, I475T |
| | | | Triazolinthionas | prothioconazole | | | |

1.4. Detección y monitoreo de resistencia a fungicidas

El reconocimiento del surgimiento de resistencia en el campo puede ser realizado por la comparación de datos entre poblaciones de hongos resistentes y sensibles a través del tiempo (Georgopoulos, 1982). La determinación de la sensibilidad de una población de un determinado patógeno a un fungicida particular es el primer paso en el manejo de la resistencia a los fungicidas. Tanto la sensibilidad de un hongo, así como la fungitoxicidad de una sustancia química contra ese hongo, se miden a través de la “concentración efectiva” (EC_{50}), o “dosis efectiva” (DE_{50}), o “inhibición del crecimiento” (IC_{50}), o “concentración inhibitoria” (CI_{50}), todos sinónimos del mismo parámetro: aquella concentración del i.a. fungicida capaz de inhibir el 50% de la germinación de esporas o del crecimiento micelial. El término concentración efectiva (EC_{50}) es el que está más difundido en la literatura internacional, y por lo tanto el que se adopta en la presente tesis. La concentración se refiere al i.a. del fungicida, no a su formulación comercial. Si buscando el control de un determinado patógeno con el uso repetido de un fungicida en una misma región, la EC_{50} se alterase en el tiempo hacia valores mayores, esto podría indicar que está ocurriendo la selección de ese hongo objeto de control en la dirección hacia la pérdida de sensibilidad o resistencia a dicho i.a. De esta manera, un hongo sensible a una molécula puede volverse insensible, razón por la cual se dice que desarrolló resistencia o que ese hongo se tornó resistente a ese fungicida. La reducción de la sensibilidad de un linaje de un hongo puede ser medida por el factor de reducción de sensibilidad (FRS), que refleja el grado de alteración. Este parámetro es una magnitud de la diferencia entre la EC_{50} del linaje sospechado de tener la sensibilidad alterada y la EC_{50} de linajes sensibles (concentración de referencia, en inglés: baseline): $FRS = EC_{50} \text{ del linaje sospechado} / EC_{50} \text{ del linaje sensible}$ (Russel, 2003a, 2003b; Reis et al., 2010). Si el FRS fuera igual a 1, la sensibilidad no ha sufrido alteración. Si fuera >1 indica que está habiendo reducción de la sensibilidad. Cabe aclarar que en idioma inglés muchos investigadores denominan a este parámetro como “factor de resistencia” (FR) (Russel, 2003a, 2003b). Por lo tanto, 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 adoptar las medidas de manejo adecuadas para poder mantener la eficiencia del control químico la mayor cantidad de tiempo posible. La sensibilidad de un hongo a un fungicida debería determinarse antes de su uso comercial. Sin embargo, en general esto no fue realizado ni se tiene certeza que se realizará en el futuro (Hollomon, 2012, 2015). La vida comercial útil o efectiva de un fungicida se define como el tiempo que va desde el inicio de uso en un cultivo en una región determinada, cuando se lanza al mercado, hasta que aquel pierde el control efectivo de la enfermedad que se pretende controlar (Hobbelen et al., 2013). Por lo tanto, el establecimiento de las concentraciones de referencia para cada ingrediente activo en cada patosistema y su posterior monitoreo debería ser una prioridad fundamental (Stamler et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Con el fin de predecir el desarrollo de resistencia a los fungicidas, distintos métodos se han desarrollado para la detección temprana de la resistencia. Los métodos de detección tradicionales han sido la determinación de la inhibición del crecimiento micelial y de germinación de esporas en APG, conteniendo diferentes concentraciones de cada ingrediente activo. Por otro lado, el análisis molecular de las mutaciones en los genes clave que codifican para las proteínas que son los sitios de unión de las moléculas fungicida (como por ejemplo QoIs, SDHIs, DMIs y benzimidazoles), se puede utilizar para confirmar genéticamente los fenotipos resistentes observados, fallas de control a campo y para identificar rápidamente cepas resistentes (Luck y Gillings, 1995; Hollomon e Ishii, 2015). La rápida identificación de cepas resistentes o tolerantes puede ayudar en la determinación de qué fungicidas utilizar en un área agrícola determinada, y también puede ser utilizado para monitorear el efecto de las políticas de gestión de resistencia a los fungicidas. La secuenciación de ADN es el método estándar para la identificación y para la confirmación de mutaciones en los fenotipos observados como resistentes.

1.5. Estudios de resistencia a fungicidas en aislados de TH y MPS

Son muy escasos los estudios específicos que se han realizado a nivel mundial para detectar resistencia a fungicidas en las especies de *Cercospora* spp. causantes de TM y MPS. Upchurch et al. (1991b) reportaron que el benomil produjo resistencia en *C. kikuchii*. La resistencia es conferida por la mutación en el gen que codifica para la proteína citoplasmática beta-tubulina. La resistencia a benzimidazoles es cualitativa, por lo que una simple mutación resultó en resistencia completa. Este trabajo describe el primer protocolo de transformación para una especie de *Cercospora*. Los mutantes fueron inducidos con luz ultravioleta. Hasegawa (2003) reportó que benzimidazoles generaron resistencia a *C. kikuchii*. El estudio se llevó a cabo durante 10 años. Azoxistrobina resultó efectiva contra las razas de *C. kikuchii* resistentes al benomil. Imazaki et al. (2006a) analizaron 247 aislados de *C. kikuchii* provenientes de 15 distritos de Japón, confirmando que 93 aislados fueron sensibles al tiofanato metil, del grupo de los benzimidazoles, mientras que 154 aislados (62%) fueron altamente resistentes. Mediante la técnica AFLP lograron separar 4 linajes, confirmando que 225 aislados pertenecían al linaje I, el cual incluyó a todos los aislados resistentes. Recientemente, Price et al. (2015a) determinaron por primera vez la sensibilidad de acuerdo con la concentración de referencia (baseline), determinando la EC_{50} para estrobilurinas (azoxistrobina, pyraclostrobina y trifloxistrobina) y el MBC tiofanato metil (TM) con una muestra de 166 aislados de *Cercospora* spp. recolectados en el estado de Louisiana (EE.UU.) durante el año 2000. Luego compararon esos valores con la EC_{50} de 136 aislados, recolectados entre los años 2011 y 2013. Estos investigadores encontraron que, en promedio, el 89% de todos los nuevos aislados fueron resistentes a los fungicidas QoI. Asimismo, determinaron resistencia en los aislados recolectados en los años 2000, 2011, 2012 y 2013, en un 23, 38, 29 y

36%, respectivamente. También detectaron aislados con resistencia múltiple a QoIs y MBCs en los aislados del 2011, 2012 y 2013 en un 34, 26 y 31%, respectivamente. Asimismo, Sautua et al. (2019) detectaron resistencia a campo para fungicidas QoI y reportaron la mutación G143A como causante de la resistencia.

En Argentina son escasos los estudios realizados específicamente para determinar la presencia de aislados de *C. kikuchii* resistentes a fungicidas. Recientemente, Soares et al. (2015) confirmaron la presencia de especies de *Cercospora* spp. con la mutación G143A en el gen *cytb*. Estos autores proponen múltiples e independientes orígenes de la mutación G143A en el genoma mitocondrial de las especies de *Cercospora* spp. aisladas de síntomas de TM y MPS, con posterior selección para la resistencia a fungicidas QoI, lo que probablemente ocurrió en los campos de soja donde se recolectaron dichos aislados. Sin embargo, el mencionado estudio no muestra datos claros sobre dónde fueron muestreados los aislados, ni desarrolla la metodología utilizada para la detección de resistencia. Por otro lado, mediante experimentos *in vitro*, Carmona et al. (2017b) determinaron la existencia de cepas de *Cercospora kikuchii* resistentes a carbendazim.

1.6. Objetivos específicos

- 1) Establecer el perfil de sensibilidad *in vitro* de cada aislamiento de *Cercospora* spp. causantes de TH y MPS, a cada uno de los i.a. fungicidas (QoIs, SDHIs, DMIs, MBCs) que normalmente se utilizan en el cultivo de soja en la Argentina, para determinar la EC_{50} con el objetivo de establecer concentraciones de referencia (en inglés: baseline).
- 2) Comparar el comportamiento y sensibilidad de los aislados de *Cercospora* spp. causantes de TM y MPS, de las diferentes localidades, a los fungicidas evaluados.
- 3) Realizar una clasificación de la potencia de los fungicidas más frecuentemente usados en el cultivo de soja para los diferentes aislados testeados.
- 4) Analizar el comportamiento en plantas de soja (*in vivo*) de las cepas más y menos sensible aplicando el fungicida que haya resultado más potente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de aislados para pruebas de sensibilidad a fungicidas

Del total de aislados realizados, 65 fueron seleccionados al azar para ser utilizados en las pruebas de sensibilidad a fungicidas (Tabla 30).

Tabla 30. Información de recopilación de aislados utilizados en este estudio.

| Nº | Identificación aislado | Año de aislamiento | Especie hospedante | Variedad de soja | Órgano muestreado | País | Provincia | Localidad | Coordenadas GPS punto muestreo |
|----|------------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|-----------|--------------|---------------|--------------------------------|
| 1 | ARG_2014_001 | 2014 | <i>Glycine max</i> | DM 4670 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Pergamino | -33.9501, -60.5688 |
| 2 | ARG_2016_004 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4619 iPRO | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.4201, -61.1849 |
| 3 | ARG_2016_005 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4619 iPRO | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.4199, -61.1845 |
| 4 | ARG_2016_007 | 2016 | <i>Glycine max</i> | FN 4.5 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.4200, -61.1851 |
| 5 | ARG_2016_008 | 2016 | <i>Glycine max</i> | LT 4914 iPRO | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.4222, -61.1836 |
| 6 | ARG_2016_015 | 2016 | <i>Glycine max</i> | LDC 3.7 | hoja | Argentina | Buenos Aires | Herrera Vegas | -36.1357, -61.5169 |
| 7 | ARG_2016_055 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4612 | hoja | Argentina | Buenos Aires | Pergamino | -33.7756, -60.7035 |
| 8 | ARG_2016_080 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 3810 | hoja | Argentina | Buenos Aires | América | -35.6324, -62.8193 |
| 9 | ARG_2016_102 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 6909 iPRO | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas | -24.7823, -63.7352 |
| 10 | ARG_2016_120 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 6248 RG | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas | -24.7823, -63.7351 |
| 11 | ARG_2016_133 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 5909 RG | semilla | Argentina | Salta | Olleros | -24.9999, -64.2622 |
| 12 | ARG_2016_155 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 8277 iPRO STS | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas | -24.7733, -64.1637 |
| 13 | ARG_2016_169 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 6161 iPRO STS | semilla | Argentina | Salta | Las Lajitas | -24.7758, -64.1641 |
| 14 | ARG_2016_199 | 2016 | <i>Glycine max</i> | Yanasu | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Palomar | -26.8524, -64.6991 |
| 15 | ARG_2016_227 | 2016 | <i>Glycine max</i> | CZ 6505 B | semilla | Argentina | Tucumán | San Agustín | -26.8356, -64.8588 |
| 16 | ARG_2016_239 | 2016 | <i>Glycine max</i> | Tarpusqa | semilla | Argentina | Tucumán | San Agustín | -26.8361, -64.8592 |
| 17 | ARG_2016_277 | 2016 | <i>Glycine max</i> | RA 5715 iPRO | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Garmendia | -26.5116, -64.4988 |
| 18 | ARG_2016_278 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 6262 iPRO RSF | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Garmendia | -26.5116, -64.4993 |
| 19 | ARG_2016_283 | 2016 | <i>Glycine max</i> | MS 6.9 iPRO | semilla | Argentina | Sgo. Estero | Garmendia | -26.5117, -64.5002 |
| 20 | ARG_2016_314 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4612 | semilla | Argentina | Córdoba | Marcos Juárez | -32.7024, -62.0706 |
| 21 | ARG_2016_324 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4214 STS | semilla | Argentina | Buenos Aires | Tandil | -37.1893, -59.4009 |
| 22 | ARG_2016_340 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 3070 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Energía | -38.6177, -59.0292 |

| | | | | | | | | | |
|----|--------------|------|----------------------------|------------------|---------|-----------|--------------|-----------------|--------------------|
| 23 | ARG_2016_349 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4210 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Pieres | -38.3698, -58.6278 |
| 24 | ARG_2016_355 | 2016 | <i>Glycine max</i> | LDC 3.7 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Tandil | -37.5003, -59.0477 |
| 25 | ARG_2016_385 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4214 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Azul | -37.0691, -59.5771 |
| 26 | ARG_2016_394 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 4712 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Otamendi | -38.0329, -57.8798 |
| 27 | ARG_2016_395 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 3302 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Miramar | -38.1905, -57.9268 |
| 28 | ARG_2016_396 | 2016 | <i>Glycine max</i> | DM 3810 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Gral. Madariaga | -37.0059, -57.0181 |
| 29 | ARG_2016_401 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NA 4413 | semilla | Argentina | Buenos Aires | Balcarce | -38.0049, -58.0626 |
| 30 | ARG_2016_402 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 4619 iPRO STS | semilla | Argentina | Buenos Aires | Chapadmalal | -38.1332, -57.6651 |
| 31 | ARG_2016_417 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 5419 iPRO | semilla | Argentina | Buenos Aires | Arrecifes | -34.5881, -60.9381 |
| 32 | ARG_2016_421 | 2016 | <i>Glycine max</i> | NS 7709 iPRO STS | semilla | Argentina | Entre Ríos | La Paz | -30.7611, -59.4828 |
| 33 | BOL_2017_026 | 2017 | <i>Glycine max</i> | Milagrosa | hoja | Bolivia | Santa Cruz | Santa Cruz | -16.8495, -63.4394 |
| 34 | BOL_2017_034 | 2017 | <i>Glycine max</i> | NA 8009 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | Santa Cruz | -16.4696, -63.4443 |
| 35 | BOL_2017_035 | 2017 | <i>Glycine max</i> | SEM WEST 4863 | hoja | Bolivia | Santa Cruz | Santa Cruz | -16.4771, 63.4246 |
| 36 | ARG_2018_001 | 2018 | <i>Glycine max</i> | DM 62R63 STS RSF | semilla | Argentina | Buenos Aires | San Pedro | -33.6573, -59.8267 |
| 37 | ARG_2019_003 | 2019 | <i>Amaranthus hybridus</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 38 | ARG_2019_006 | 2019 | <i>Amaranthus hybridus</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 39 | ARG_2019_011 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 40 | ARG_2019_012 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 41 | ARG_2019_013 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 42 | ARG_2019_014 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 43 | ARG_2019_015 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 44 | ARG_2019_016 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 45 | ARG_2019_017 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 40R16 STS | hoja | Argentina | Buenos Aires | Bragado | -35.0883, -60.3896 |
| 46 | ARG_2019_018 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 47 | ARG_2019_019 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 48 | ARG_2019_020 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |

| | | | | | | | | | |
|----|--------------|------|-------------------------|---------------|------|-----------|--------------|---------------------|--------------------|
| 49 | ARG_2019_029 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 50 | ARG_2019_030 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 51 | ARG_2019_031 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 52 | ARG_2019_032 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 53 | ARG_2019_033 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 54 | ARG_2019_034 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 55 | ARG_2019_035 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 56 | ARG_2019_036 | 2019 | <i>Glycine max</i> | Bioceres 4.91 | hoja | Argentina | Córdoba | Alejo Ledesma | -33.6967, -62.7050 |
| 57 | ARG_2019_037 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 58 | ARG_2019_038 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 59 | ARG_2019_039 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 60 | ARG_2019_040 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 61 | ARG_2019_041 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 62 | ARG_2019_042 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 63 | ARG_2019_043 | 2019 | <i>Glycine max</i> | DM 4014 | hoja | Argentina | Santa Fe | Bigand | -33.2452, -61.1116 |
| 64 | ARG_2019_052 | 2019 | <i>Araujia hortorum</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | San Andrés de Giles | -34.4617, -59.4429 |
| 65 | ARG_2019_057 | 2019 | <i>Araujia hortorum</i> | - | hoja | Argentina | Buenos Aires | San Andrés de Giles | -34.4617, -59.4429 |

2.2. Fungicidas

Se evaluaron los siguientes fungicidas con grado técnico (> 97% ingrediente activo puro) para las pruebas de sensibilidad:

- DMI (5): cyproconazole, difenoconazole, epoxiconazole, prothioconazole y tebuconazole;
- QoI (3): azoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin;
- SDHI (1): boscalid;
- MBC (1): carbendazim.

Estos fungicidas fueron proporcionados por Agrofina S.A. y Nova S.A. Adicionalmente, se incluyeron 3 fungicidas formulados comercialmente:

- SDHI (2): pydiflumetofen (MIRAVIS®, 20 g ia / 100 L SC, Syngenta Agro S.A., Argentina), fluxapyroxad (Sistiva®, 33.3 g a.i./100 mL, BASF Argentina S.A.);
- Multisitio (1): mancozeb (Manzate Pro Stick®, 75 g ia / kg WDG, UPL Argentina S.A., Argentina).

2.3. Pruebas de sensibilidad a fungicidas *in vitro*

2.3.1. Determinación de la EC_{50}

Debido a la escasa esporulación que presenta *Cercospora* spp. bajo crecimiento *in vitro* en medio de cultivo tradicional, y siguiendo la metodología de Oh y Kang (2002), Price (2013) y Price et al. (2015a), se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento radial micelial en lugar de inhibición de germinación de esporas para determinar la sensibilidad a los fungicidas. Para calcular la concentración efectiva de fungicida capaz de inhibir el 50% del crecimiento radial micelial (EC_{50}), para cada combinación aislado-fungicida, se probaron todos los fungicidas en los aislados N° 1 a 35 (Tabla 30). Este conjunto de aislados incluyó 32 aislados de Argentina y 3 aislados de Bolivia. Los aislados bolivianos se incluyeron con fines comparativos, ya que estas cepas se aislaron de campos de soja que recibieron un número significativamente mayor de aplicaciones de fungicidas en relación a campos argentinos y son resistentes a fungicidas QoI (Sautua et al., 2019a). El experimento consistió en preparar APD con diluciones en serie de cada fungicida grado técnico o comercial para lograr una concentración final de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Con este fin, se prepararon soluciones madre de cada fungicida diluyéndolo en acetona para lograr una concentración de 10,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir de la solución madre o stock se realizaron las correspondientes diluciones para modificar el APD y alcanzar cada concentración final. A partir de estas últimas, se midieron exactamente 20 mL de APD modificado

utilizando un tubo Falcon estéril, y se dispensaron en cada unidad experimental (caja de Petri de 9 x 1,5 cm). Se realizaron cuatro réplicas (placas de Petri) por concentración de fungicida para cada aislado evaluado. Como inóculo inicial de cada aislado, se cortaron discos de micelio de 6 mm de diámetro, creciendo activamente en los márgenes de cultivos en APD de 7 días de antigüedad, usando un sacabocados #3. Luego los discos se invirtieron y se transfirieron a las placas con APD modificado, las cuales se incubaron durante 7 días a 24 +/- 1°C, bajo un ciclo de 16 h de luz fluorescente negra / 8 h de oscuridad. El APD no modificado con fungicida sirvió como control. Después de la incubación, el diámetro de la colonia se midió dos veces en forma perpendicular usando un calibre digital. Cada experimento se realizó utilizando un diseño de bloques completos al azar usando los estantes de incubación como bloques.

2.3.2. Ensayo de dosis discriminatorias para detección de resistencia

Por otro lado, para detectar resistencia a fungicidas, se utilizaron dos dosis discriminatorias de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada fungicida en los aislados N°36 a 65 (Tabla 30). Estos experimentos se realizaron como se ha descrito anteriormente en el punto 1. Ambos tipos de experimentos (EC_{50} y dosis discriminatoria para detectar resistencia) se repitieron una vez para cyproconazole, difenoconazole, epoxiconazole, prothioconazole, tebuconazole, carbendazim y mancozeb (2 veces en total), y dos veces para azoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin, boscalid, pydiflumetofen y fluxapyroxad (3 veces en total). Mancozeb se incluyó solo en las pruebas de dosis discriminatorias.

2.3.3. Determinación de respiración alternativa en aislados de *Cercospora* spp. causantes de TH/MPS

Para evaluar si la AOX está presente en los aislados de *Cercospora* elegidos en el presente estudio, se llevó a cabo un estudio preliminar para examinar el efecto del ácido salicilhidroxámico (SHAM, 99% de ingrediente activo, Alfa Aesar, Johnson Matthey Company) en seis aislados. Los aislados N ° 1, 8, 9, 10, 31, 32 (Tabla 30) fueron seleccionados al azar para este propósito. Las diluciones en serie de SHAM se hicieron en metanol (99%). El APD se modificó con SHAM para lograr concentraciones finales de 0, 30, 60, 100 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El experimento se realizó de acuerdo con la metodología detallada en el apartado 2.3.1. A diferencia de los resultados obtenidos por Price et al. (2015), se observó que el crecimiento radial de *Cercospora* spp. se redujo significativamente (80% en promedio) a partir de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de SHAM pero no a 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (<20% en promedio). Por lo tanto, para comparar el efecto de la azoxistrobina sobre el crecimiento micelial con y sin la adición de SHAM al APD, se repitió el ensayo incluyendo los

aislados N°1 a 35, agregando SHAM con una concentración final de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ o se omitió para cada concentración. El experimento se repitió una vez.

2.4. Análisis *in vivo* de la eficiencia en el control de los fungicidas más y menos potentes para las cepas más y menos susceptibles

De acuerdo con los resultados de los experimentos descritos en el apartado 2.3 del capítulo 3, los fungicidas más y menos potentes fueron difenoconazole y boscalid, respectivamente. Todos los aislados evaluados fueron susceptibles o insensibles por igual a difenoconazole y boscalid, respectivamente. Por lo tanto, para los experimentos *in vivo* se eligieron dos aislados al azar: ARG_16_080 y ARG_16_120.

2.4.1. Ensayo de inhibición en hoja destacada

Se realizaron experimentos *in vivo* en hojas de soja destacadas, siguiendo la metodología descrita por Huang et al. (2019), Munir et al. (2020) y Zhu et al. (2020). Las hojas utilizadas en el experimento tuvieron una forma y un tamaño similares y se recogieron de la misma posición en las plantas de soja, variedad DM4670. Las hojas desprendidas se enjuagaron con agua destilada estéril, se secaron dentro del flujo laminar y se transfirieron a placas de Petri (9 cm de diámetro) que contenían papel de filtro esterilizado y empapado en agua estéril hasta su máxima capacidad de retención, pero sin exceso de agua. Las soluciones madres en acetona (2.3.1) respectivas del fungicida más fungitóxico (difenoconazole) y el menos fungitóxico (boscalid) se diluyeron en agua destilada esterilizada para lograr concentraciones finales de 10 y $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada ingrediente activo. Luego se adicionó Tween 80 al 0,1%. Como testigo control se usaron hojas de soja rociadas con agua destilada esterilizada que contenía acetona y Tween 80. Todos los tratamientos se pulverizaron sobre las hojas con un pulverizador manual hasta el punto de goteo. La actividad protectora de cada fungicida se evaluó inoculando la superficie adaxial de las hojas con discos de micelio invertidos (6 mm de diámetro) cortados de los bordes de crecimiento activo de colonias de 7 días, 24 h después del tratamiento con fungicida; mientras que la actividad curativa de los fungicidas se evaluó rociando las hojas con los fungicidas 24 h después de la inoculación. Todas las hojas tratadas se incubaron a 25°C en una cámara de crecimiento con 80% de humedad relativa y un fotoperíodo de 16 h de luz : 8 h de oscuridad. Después de 14 días de incubación, se midieron los diámetros de las lesiones de manera perpendicular utilizando el mismo calibre anteriormente descrito (2.3.1) y se calculó el porcentaje de control de la enfermedad. Se utilizaron diez hojas (repeticiones) por tratamiento y el experimento se repitió una vez.

2.4.2. Ensayo a campo en microparcels

Se realizó un ensayo en el campo experimental de la FAUBA. Se sembró la variedad de soja DM3900 en microparcels de 0.9 m² (2 m por 0.45 m). Cuando el cultivo alcanzó el estadio fenológico R5, todas las parcelas se inocularon con una suspensión de conidios y micelio en agua destilada estéril con el agregado de Tween 80 al 0,1%. Los conidios y micelio fueron obtenidos a partir del crecimiento activo de los aislados N°1 a 35 (Tabla 30) en medio SLDA. La concentración de conidios fue de aproximadamente 10⁴. La inoculación se realizó por la tarde, luego de que el sol ya no incidiera en forma directa en el cultivo, y se colocaron bolsas plásticas recubriendo las plantas como se indicó en el apartado 2.3, capítulo 2. Se aplicaron los fungicidas difenoconazole (Gardner® EC, 25 g i.a./100 mL, Agrofina S.A.) y boscalid (Cantus®, 50 g i.a./100 g, Agrofina S.A.), cada uno en forma de tratamientos preventivos (10/03/2020) o curativos (14/03/2020), 48 hs antes y después de la inoculación (12/03/2020), respectivamente. Los fungicidas se aplicaron con pulverizador manual, con una dosis indicada por el fabricante de 75 y 100 g i.a. por hectárea, para difenoconazole y boscalid, respectivamente. Las condiciones ambientales durante las aplicaciones fueron: temperatura 25°C/25.4°C, HR 58%/47%, viento 10/13 km/h. La parcela testigo no recibió aplicaciones de fungicida (5 tratamientos en total). Se utilizó un diseño en bloques al azar asignado los 5 tratamientos a las parcelas en forma aleatoria. Luego de 20 días post inoculación (dpi) se procedió a estimar la intensidad del TH mediante el método fotográfico descrito en el apartado 2.9 del capítulo 2.

2.5. Análisis de secuencias de genes *cytb*, *tub*, *cyp51* y *sdh*

Con el fin de evaluar la variación de la secuencia de ADN entre aislados resistentes y sensibles a los fungicidas evaluados, se amplificaron y secuenciaron fragmentos del gen mitocondrial citocromo b (*cytb*) y del gen nuclear de β -tubulina (*tub2*), usando PCR para 64 de los 65 individuos elegidos al azar, y, adicionalmente, se secuenció el genoma completo del aislado de referencia *C. kikuchii* ARG_18_001 (Sautua et al., 2019b). Además, se amplificaron y secuenciaron fragmentos del gen codificante para la esterol 14 α -desmetilasa citocromo P450 (*cyp51*) para 35 aislados (aislados N ° 1 a 35, Tabla 30). Por otra parte, para algunos aislados elegidos al azar, se amplificó y secuenció la secuencia completa de los genes *cytb*, *tub2* y *cyp51*. Por último, se amplificó y secuenció la secuencia completa de 3 genes que codifican las subunidades B, C y D (genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD*) de la enzima succinato deshidrogenasa (objeto de control de los fungicidas SDHI), donde las mutaciones asociadas con la resistencia a SDHI se han reportado previamente en diferentes hongos (Sierotzki y Scalliet, 2013). Los primers y las condiciones de PCR utilizadas en el presente estudio se describen en la Tabla 31. El resumen de

los *loci* secuenciados para cada aislado, que fueron utilizados en el análisis de mutaciones se muestran en las Tablas 32 y 33. La secuenciación se realizó en Macrogen Inc, Seoul, Corea. Posteriormente, para cada locus se realizó una alineación de secuencia múltiple usando MUSCLE (Edgar, 2004a,b), incluyendo la secuencia completa del genoma del aislado ARG_18_001 como referencia.

Tabla 31. Primers (cebadores) utilizados para amplificar y secuenciar los loci relacionados con la resistencia a fungicidas.

| Locus | Longitud total de aminoácidos | Longitud total de nucleótidos | Región génica cubierta por secuenciación | | Nº intrones | Primer | Secuencia de nucleótidos de cada primerr (5'- 3') | O ^a | Tamaño del producto (pb) | Annealing T (°C) | Referencia | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|--|------|--------------------|---------------|---|----------------|--------------------------|------------------|------------------------|-----|--------------|----------------------|
| | | | Inicio | Fin | | | | | | | | | | |
| Nuclear | | | | | | | | | | | | | | |
| Esterol 14 α -desmetilasa citocromo P450 (<i>cyp51</i>) | 543 | 1632 | 433 | 1569 | 0 | CYP51FS | GTGTTCCGGCAAGGACGTCG | F | 1353 | 54 | Nikou et al., 2009 | | | |
| | | | | | | CYP51RS | CTCTCCCACTTCACAACAGC | R | | | | | | |
| | | | | | | cyp51_432bp_F | TGTTGAAACCGTACGATGGA | F | | | | 795 | 60 | Este estudio |
| | | | | | | cyp51_432bp_R | AGGTCGAATCGAATTTGCTG | R | | | | | | |
| | | | | | | cyp51_63bp_F | AAGCTGTCGACAGAGGAGAAG | F | | | | 704 | 60 | Este estudio |
| | | | | | | cyp51_63bp_R | GGCGAAGAATAACCGATTCA | R | | | | | | |
| Beta-tubulina (<i>tub2</i>) | 447 | 1611 | 1 | 1611 | 4 | tub_1F | ACTCGTTGCTGATTGGCTCT | F | 1938 | 53 | Este estudio | | | |
| | | | | | | tub_1R | TTTGGGTCAACAGGGAAAAG | R | | | | | | |
| | | | | | | Tub-F1 | GGTCATTACACTGAGGGTGC | F | | | | 850 | 56 | Imazaki et al. 2006b |
| | | | | | | Tub-R1 | GACAAGATCGTTCATGTTGGACTC | R | | | | | | |
| | | | | | | tub_inter-1F | CAAGGTCTCCATGAAGGA | F | | | | 53 | Este estudio | |
| | | | | | | tub_inter-1R | ATACCGGCACCAGTACCAC | R | | | | | | |
| Succinate deshidrogenasa subunidad B (<i>sdhB</i>) | 300 | 1015 | 1 | 1015 | 2 | sdhB_1F | GCCGAGCATCTGGTGTATTT | F | 1255 | 55 | Este estudio | | | |
| | | | | | | sdhB_1R | TCGCATTTCTAACGCAGTTG | R | | | | | | |
| | | | | | | sdhB_seq1F | ACATTCCGAAGAAGTTGC | F | | | | 670 | 55 | Este estudio |
| | | | | | | sdhB_seq1R | TGCTTGTAAGACTGGGTC | R | | | | | | |
| Succinate deshidrogenasa subunidad C (<i>sdhC</i>) | 183 | 881 | 1 | 881 | 2 | sdhC_1F | GCGGACAAAGAAAACCTCAGC | F | 1166 | 50 | Este estudio | | | |
| | | | | | | sdhC_1R | GCATGGGCTCTACGAGAAAAG | R | | | | | | |
| Succinate deshidrogenasa subunidad D (<i>sdhD</i>) | 204 | 775 | 1 | 775 | 2 | sdhD_1F | CGATCCAACAAGCACTGGTA | F | 1413 | 53 | Este estudio | | | |
| | | | | | | sdhD_1R | AGTGTGCACGTCCAAATTGA | R | | | | | | |
| Mitocondrial | | | | | | | | | | | | | | |
| Citocromo b (<i>cytb</i>) | 386 | 1161 | 334 | 1020 | 0 | Cytb-F2 | GGAAGAGGTCTATACTATGG | F | 700 | 49 | Imazaki et al., 20006c | | | |
| | | | | | | Cytb-R1 | CGTGATTAGCACCTAATTGC | R | | | | | | |
| | | | | | | 660_Cbcytb | GACACAGGGTTATCACATCA | F | | | | 668 | 58 | Birla et al., 2012 |
| | | | | | | 661_Cbcytb | AAGAAGAAAAATGCTGAAGCTG | R | | | | | | |
| | | | | | | 714_Cbcytb | AGAACATATTATGAGAGAC | F | | | | 734 | 58 | Birla et al., 2012 |
| | | | | | | 715_Cbcytb | CTGTGAAAAGGCATAGTTAGT | R | | | | | | |
| 658_Cbcytb | AATTACGTTGTGGCCAATCC | F | 519 | 58 | Birla et al., 2012 | | | | | | | | | |
| 659_Cbcytb | CAACCGGTATTATTTGAGGATT | R | | | | | | | | | | | | |

^a O= orientación, F= forward, R= reverse. ^b Las posiciones inicial y final del fragmento secuenciado con respecto a las secuencias genéticas completas del aislado de referencia de *C. kikuchii* ARG_18_001 recuperado del ensamblaje del genoma (Sautua et al., 2019b)

Tabla 32. Números de acceso de GenBank para aislados de *Cercospora* spp. utilizados en el estudio de las mutaciones asociadas a resistencia de fungicidas. *Loci* secuenciados: esteroil 14 α -desmetilasa citocromo P450 (*cyp51*), citocromo b (*cytb*), β -tubulina (*tub2*), subunidades del complejo succinato deshidrogenasa B, C y D (*sdhB*, *sdhC* y *sdhD*, respectivamente).

| Nº | Identificación de aislado | Especie | <i>cyp51</i> | <i>cytb</i> | <i>tub2</i> | <i>sdhB</i> | <i>sdhC</i> | <i>sdhD</i> |
|----|---------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | ARG_2014_001 | <i>C. kikuchii</i> | MT013715 | MT013751 [§] | MT013851 | MT013916 [§] | MT013927 [§] | MT013938 [§] |
| 2 | ARG_2016_004 | <i>C. kikuchii</i> | MT013716 | MT013752 | MT013852 [§] | - | - | - |
| 3 | ARG_2016_005 | <i>C. sp. M</i> | MT013717 | MT013753 | MT013853 | - | - | - |
| 4 | ARG_2016_007 | <i>C. kikuchii</i> | MT013718 | MT013754 | MT013854 | - | - | - |
| 5 | ARG_2016_008 | <i>C. kikuchii</i> | MT013719 | MT013755 | MT013855 | - | - | - |
| 6 | ARG_2016_015 | <i>C. kikuchii</i> | MT013720 | MT013756 | MT013856 | - | - | - |
| 7 | ARG_2016_055 | <i>C. kikuchii</i> | MT013721 | MT013757 | MT013857 | - | - | - |
| 8 | ARG_2016_080 | CRC ^a | MT013722 [§] | MT013758 | MT013858 [§] | MT013917 [§] | MT013928 [§] | MT013939 [§] |
| 9 | ARG_2016_102 | <i>C. kikuchii</i> | MT013723 | MT013759 | MT013859 | - | - | - |
| 10 | ARG_2016_120 | CRC | MT013724 | MT013760 | MT013860 | - | - | - |
| 11 | ARG_2016_133 | <i>C. kikuchii</i> | MT013725 | MT013761 [§] | MT013861 | - | - | - |
| 12 | ARG_2016_155 | <i>C. kikuchii</i> | MT013726 | MT013762 | MT013862 | - | - | - |
| 13 | ARG_2016_169 | <i>C. kikuchii</i> | MT013727 | MT013763 | MT013863 | - | - | - |
| 14 | ARG_2016_199 | <i>C. kikuchii</i> | MT013728 | MT013764 | MT013864 | - | - | - |
| 15 | ARG_2016_227 | CRC | MT013729 | MT013765 | MT013865 | - | - | - |
| 16 | ARG_2016_239 | <i>C. kikuchii</i> | MT013730 | MT013766 | MT013866 | - | - | - |
| 17 | ARG_2016_277 | <i>C. nicotianae</i> | MT013731 | MT013767 [§] | MT013867 | - | - | - |
| 18 | ARG_2016_278 | <i>C. kikuchii</i> | MT013732 | MT013768 | MT013868 | - | - | - |
| 19 | ARG_2016_283 | <i>C. kikuchii</i> | MT013733 | MT013769 | MT013869 | - | - | - |
| 20 | ARG_2016_314 | <i>C. kikuchii</i> | MT013734 | MT013770 | MT013870 | - | - | - |
| 21 | ARG_2016_324 | <i>C. kikuchii</i> | MT013735 | MT013771 | MT013871 | - | - | - |
| 22 | ARG_2016_340 | <i>C. kikuchii</i> | MT013736 | MT013772 [§] | MT013872 | - | - | - |
| 23 | ARG_2016_349 | <i>C. kikuchii</i> | MT013737 | MT013773 | MT013873 | - | - | - |

| | | | | | | | | |
|----|---------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 24 | ARG_2016_355 | <i>C. kikuchii</i> | MT013738 | MT013774 [§] | MT013874 | - | - | - |
| 25 | ARG_2016_385 | <i>C. kikuchii</i> | MT013739 | MT013775 [§] | MT013875 | - | - | - |
| 26 | ARG_2016_394 | <i>C. kikuchii</i> | MT013740 | MT013776 [§] | MT013876 | - | - | - |
| 27 | ARG_2016_395 | <i>C. kikuchii</i> | MT013741 | MT013777 [§] | MT013877 | - | - | - |
| 28 | ARG_2016_396 | <i>C. kikuchii</i> | MT013742 | MT013778 [§] | MT013878 | - | - | - |
| 29 | ARG_2016_401 | <i>C. kikuchii</i> | MT013743 | MT013779 [§] | MT013879 | MT013918 [§] | MT013929 [§] | MT013940 [§] |
| 30 | ARG_2016_402 | <i>C. kikuchii</i> | MT013744 | MT013780 [§] | MT013880 | - | - | - |
| 31 | ARG_2016_417 | <i>C. kikuchii</i> | MT013745 | MT013781 | MT013881 [§] | - | - | - |
| 32 | ARG_2016_421 | <i>C. sp. G</i> | MT013746 | MT013782 [§] | MT013882 | MT013919 [§] | MT013930 [§] | - |
| 33 | BOL_2017_026 | CRC | MT013747 | MT013783 | MT013883 [§] | MT013920 [§] | MT013931 [§] | MT013941 [§] |
| 34 | BOL_2017_034 | <i>C. nicotianae</i> | MT013748 [§] | MT013784 | MT013884 [§] | MT013921 [§] | MT013932 [§] | - |
| 35 | BOL_2017_035 | <i>C. kikuchii</i> | MT013749 [§] | MT013785 | MT013885 | MT013922 [§] | MT013933 [§] | MT013942 [§] |
| 36 | ARG_2018_001 | <i>C. kikuchii</i> | MT013750 [§] | MT013786 [§] | MT013886 [§] | MT013923 [§] | MT013934 [§] | MT013943 [§] |
| 37 | ARG_2019_003 [†] | <i>C. sp. H</i> | - | MT013787 | MT013887 | - | - | - |
| 38 | ARG_2019_006 [†] | <i>C. sp. H</i> | - | MT013788 | MT013888 | - | - | - |
| 39 | ARG_2019_011 | <i>C. kikuchii</i> | - | MT013789 | MT013889 | - | - | - |
| 40 | ARG_2019_012 | ND ^b | - | MT013790 | MT013890 | - | - | - |
| 41 | ARG_2019_013 | ND | - | MT013791 | MT013891 | - | - | - |
| 42 | ARG_2019_014 | ND | - | MT013792 | MT013892 | - | - | - |
| 43 | ARG_2019_015 | species indet. | - | MT013793 | MT013893 [§] | MT013924 [§] | MT013935 [§] | MT013944 [§] |
| 44 | ARG_2019_016 | ND | - | MT013794 | MT013894 [§] | MT013925 [§] | MT013936 [§] | - |
| 45 | ARG_2019_017 | ND | - | MT013795 | MT013895 | - | - | - |
| 46 | ARG_2019_018 | ND | - | MT013796 | MT013896 | - | - | - |
| 47 | ARG_2019_019 | ND | - | MT013797 | MT013897 | - | - | - |
| 48 | ARG_2019_020 | ND | - | MT013798 | MT013898 | - | - | - |
| 49 | ARG_2019_029 | ND | - | MT013799 | MT013899 | - | - | - |
| 50 | ARG_2019_030 | ND | - | MT013800 | MT013900 | - | - | - |
| 51 | ARG_2019_031 | ND | - | MT013801 | MT013901 | - | - | - |
| 52 | ARG_2019_032 | ND | - | MT013802 | MT013902 | - | - | - |

| | | | | | | | | |
|----|---------------------------|--------------------|---|----------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 53 | ARG_2019_033 | ND | - | MT013803 | MT013903 | - | - | - |
| 54 | ARG_2019_034 | ND | - | MT013804 | MT013904 | - | - | - |
| 55 | ARG_2019_035 | ND | - | MT013805 | MT013905 | - | - | - |
| 56 | ARG_2019_036 | ND | - | MT013806 | MT013906 | - | - | - |
| 57 | ARG_2019_037 | ND | - | MT013807 | MT013907 | - | - | - |
| 58 | ARG_2019_038 | ND | - | MT013808 | MT013908 | - | - | - |
| 59 | ARG_2019_039 | ND | - | MT013809 | MT013909 | - | - | - |
| 60 | ARG_2019_040 | ND | - | MT013810 | MT013910 | - | - | - |
| 61 | ARG_2019_041 | ND | - | MT013811 | MT013911 | - | - | - |
| 62 | ARG_2019_042 | ND | - | MT013812 | MT013912 | MT013926 [§] | MT013937 [§] | MT013945 [§] |
| 63 | ARG_2019_043 | ND | - | MT013813 | MT013913 | - | - | - |
| 64 | ARG_2019_052 [‡] | <i>C. kikuchii</i> | - | MT013814 | MT013914 | - | - | - |
| 65 | ARG_2019_057 [‡] | <i>C. sp. O</i> | - | MT013815 | MT013915 | - | - | - |

[†] Aislados recuperados desde *Amaranthus hibrius*

[‡] Aislados recuperados desde *Araujia hortorum*

[§] Secuenciación completa del gen

^a = *C. richardiicola* complex

^b = No determinado en el presente estudio

Tabla 33. Números de acceso de GenBank para aislados de *Cercospora* spp. de Bolivia utilizados en el análisis de mutaciones. *Loci* secuenciados: citocromo b (*cytb*).

| Nº | Identificación de aislado | Especie | <i>cytb</i> |
|----|---------------------------|---|-------------|
| 1 | BOL_2017_001 | <i>Cercospora kikuchii</i> | MT013816 |
| 2 | BOL_2017_002 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013817 |
| 3 | BOL_2017_003 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013818 |
| 4 | BOL_2017_004 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013819 |
| 5 | BOL_2017_005 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013820 |
| 6 | BOL_2017_006 | - | MT013821 |
| 7 | BOL_2017_007 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013822 |
| 8 | BOL_2017_008 | <i>Cercospora kikuchii</i> | MT013823 |
| 9 | BOL_2017_009 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013824 |
| 10 | BOL_2017_010 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013825 |
| 11 | BOL_2017_011 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013826 |
| 12 | BOL_2017_012 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013827 |
| 13 | BOL_2017_013 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013828 |
| 14 | BOL_2017_014 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013829 |
| 15 | BOL_2017_015 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013830 |
| 16 | BOL_2017_016 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013831 |
| 17 | BOL_2017_017 | <i>Cercospora kikuchii</i> | MT013832 |
| 18 | BOL_2017_018 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013833 |
| 19 | BOL_2017_019 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013834 |
| 20 | BOL_2017_020 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013835 |

| | | | |
|----|--------------|---|----------|
| 21 | BOL_2017_021 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013836 |
| 22 | BOL_2017_022 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013837 |
| 23 | BOL_2017_023 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013838 |
| 24 | BOL_2017_024 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013839 |
| 25 | BOL_2017_025 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013840 |
| 26 | BOL_2017_026 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013783 |
| 27 | BOL_2017_027 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013841 |
| 28 | BOL_2017_028 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013842 |
| 29 | BOL_2017_029 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013843 |
| 30 | BOL_2017_030 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013844 |
| 31 | BOL_2017_031 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013845 |
| 32 | BOL_2017_032 | <i>Cercospora kikuchii</i> | MT013846 |
| 33 | BOL_2017_033 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013847 |
| 34 | BOL_2017_034 | <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | MT013784 |
| 35 | BOL_2017_035 | <i>Cercospora kikuchii</i> | MT013785 |
| 36 | BOL_2017_036 | <i>Cercospora kikuchii</i> | MT013848 |
| 37 | BOL_2017_037 | <i>Cercospora</i> sp. "P" | MT013849 |
| 38 | BOL_2017_038 | <i>Cercospora kikuchii</i> | MT013850 |

2.6. Modelado 3D de la proteína esterol 14 α -desmetilasa

Para visualizar la ubicación de sustituciones de aminoácidos (por mutaciones) probablemente relacionadas con la resistencia a DMI, se modeló la estructura 3D de la proteína 14 α -desmetilasa citocromo P450 (CYP51) de *C. kikuchii* mediante métodos comparativos de modelado de proteínas, utilizando el servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) (Arnold et al., 2006; Guex et al., 2009, Bienert et al., 2017). La estructura de modelado de *C. kikuchii* CYP51 se obtuvo con la plantilla 5eah.1 (*Saccharomyces cerevisiae* CYP51 complejada con difenoconazole) mediante el software modelo suizo online.

2.7. Análisis estadístico de los datos

Para estimar valores de EC₅₀ para cada combinación aislado-fungicida (aislados N°1 a 35, Tabla N°30), se generaron curvas de dosis-respuesta y se realizó un análisis de regresión no lineal utilizando la función *drm()* del paquete *drc* v2.5-12 (Ritz y Streibig, 2005; Ritz et al., 2015) en el entorno R (R Core Team 2019). Se ajustó un modelo log-logístico, específicamente un modelo Weibull tipo I de cuatro parámetros, y la estimación de los parámetros se basó en el principio de máxima verosimilitud como se describe en Carmona et al. (2017c). Los valores medios de EC₅₀ y sus intervalos de confianza del 95% se estimaron combinando datos de los dos (o tres) experimentos (repeticiones), utilizando la función *ED()* del paquete *drc*. La prueba de normalidad para los valores de EC₅₀ se realizó utilizando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk con el paquete de estadísticas de R (R Core Team 2019). En todos los casos, los datos se distribuyeron de manera no normal. Por lo tanto, se realizó el análisis de varianza de Kruskal-Wallis de una vía con el paquete de estadísticas de R (R stats package, stats4) para evaluar las diferencias significativas entre las distribuciones de los valores de EC₅₀ para los diferentes fungicidas. La prueba post hoc de comparación múltiple de Dunn se usó para comparar distribuciones entre los i.a. de fungicidas (P = 0.05) mediante la función *dunnTest()* del paquete FSA de R (Ogle et al., 2019). Para el análisis de la respiración alternativa, se compararon los valores de inhibición del crecimiento con y sin el agregado de SHAM utilizando una prueba t de dos muestras con el paquete de estadísticas de R.

3. RESULTADOS

3.1. Actividad fungitóxica *in vitro* sobre el crecimiento micelial de *Cercospora* spp.

Los 65 aislados fueron sensibles a todos los DMI evaluados y su crecimiento micelial se inhibió en promedio entre 82% (cyproconazole) y 97.5% (difenoconazole) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por otro lado, la mitad de los aislados evaluados fueron sensibles (33) y la mitad resistentes (32) a carbendazim. Por el contrario, todos los aislados fueron completamente resistentes a azoxistrobina, trifloxistrobina, pyraclostrobina e insensibles a boscalid, fluxapyroxad y pydiflumetofen. Cualquiera de estos i.a. (QoI, SDHI) a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ no suprimió el crecimiento micelial en ninguno de los 65 aislados evaluados. Asimismo, todos los aislados evaluados no fueron sensibles al mancozeb, el que inhibió en promedio un 37% el crecimiento micelial a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados de las pruebas de inhibición del crecimiento micelial se presentan en las Tablas 34, 35 y 36 y en la Figura 105. A continuación, se detalla cada modo de acción por separado.

Tabla 34. Concentración efectiva promedio ($\mu\text{g mL}^{-1}$) requerida para inhibir el 50% del crecimiento micelial (EC_{50}) en aislados argentinos de *Cercospora* sensibles a DMI y carbendazim (MBC), y resistentes a QoI, SDHI y mancozeb.

| Ingrediente activo fungicida | modo de acción fungicida | N° aislados evaluados | EC_{50} * | |
|------------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------|----|
| difenoconazole | DMI | 32 | 0.027 | a |
| carbendazim | MBC | 19 | 0.048 | ab |
| prothioconazole | DMI | 32 | 0.157 | b |
| epoxiconazole | DMI | 32 | 0.154 | b |
| tebuconazole | DMI | 32 | 0.602 | c |
| cyproconazole | DMI | 32 | 0.889 | c |
| azoxistrobina | QoI | 62 | >100 | † |
| piractrocarbina | QoI | 62 | >100 | † |
| trifloxistrobina | QoI | 62 | >100 | † |
| boscalid | SDHI | 62 | >100 | † |
| fluxapyroxad | SDHI | 62 | >100 | † |
| pydiflumetofen | SDHI | 62 | >100 | † |
| mancozeb | Multisitio | 62 | >10 | † |

* Las medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente según el análisis de varianza de Kruskal-Wallis seguido por la prueba de comparación múltiple de Dunn.

† Los 62 aislados argentinos fueron completamente resistentes a los fungicidas QoI y SDHI y resistentes al mancozeb.

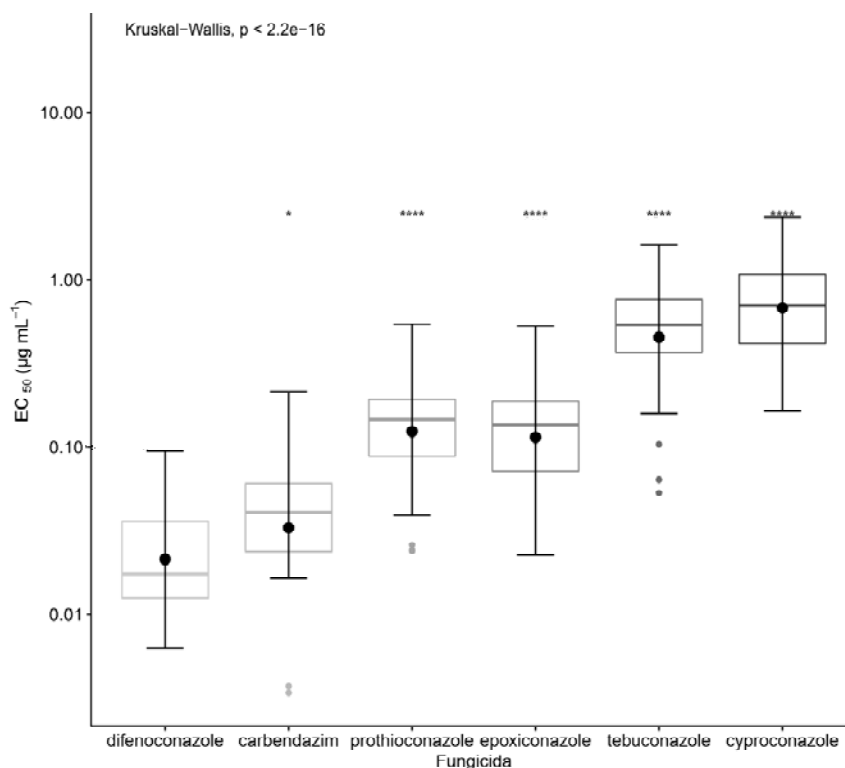


Figura 105. Distribución de sensibilidad (EC_{50}) de 32 y 19 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a cinco i.a. DMI y carbendazim (MBC), respectivamente. Las comparaciones por pares utilizan la prueba de suma de rango de Wilcoxon (prueba U de Mann-Whitney) y se muestran contra difenoconazole, el i.a. más fungitóxico contra todos los aislados de *Cercospora* evaluados en el presente estudio.

Tabla 35. Valores medios de EC₅₀ y estimaciones del intervalo de confianza del 95% ($\mu\text{g i.a. mL}^{-1}$) para cada combinación aislado de *Cercospora*-fungicida usando el modelo log-logístico de cuatro parámetros Weibull tipo I, para 35 aislados utilizados en este estudio.

| N° | Aislado | Species | difenoconazole | | | prothioconazole | | | epoxiconazole | | | tebuconazole | | | cyproconazole | | | carbendazim | | |
|----|------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|-------|---------------|-------|-------|--------------|-------|-------|---------------|-------|-------|----------------------|---------|---------|
| | | | Pr ^a | LI ^b | LS ^c | Pr | LI | LS | Pr | LI | LS | Pr | LI | LS | Pr | LI | LS | Pr | LI | LS |
| 1 | ARG_14_001 | | 0.010 | 0.007 | 0.013 | 0.045 | 0.036 | 0.054 | 0.030 | 0.011 | 0.049 | 0.107 | 0.043 | 0.170 | 0.407 | 0.319 | 0.495 | resist. ^d | resist. | resist. |
| 2 | ARG_16_004 | | 0.014 | 0.008 | 0.021 | 0.070 | 0.054 | 0.086 | 0.207 | 0.141 | 0.272 | 0.647 | 0.515 | 0.779 | 1.324 | 1.120 | 1.529 | resist. | resist. | resist. |
| 3 | ARG_16_005 | | 0.014 | 0.002 | 0.025 | 0.134 | 0.092 | 0.176 | 0.151 | 0.102 | 0.200 | 0.792 | 0.705 | 0.878 | 0.339 | 0.275 | 0.403 | 0.055 | 0.037 | 0.073 |
| 4 | ARG_16_007 | | 0.026 | 0.014 | 0.039 | 0.331 | 0.276 | 0.385 | 0.175 | 0.080 | 0.269 | 0.942 | 0.715 | 1.169 | 1.763 | 1.386 | 2.139 | 0.066 | 0.051 | 0.080 |
| 5 | ARG_16_008 | | 0.035 | 0.001 | 0.069 | 0.149 | 0.124 | 0.174 | 0.118 | 0.087 | 0.149 | 0.821 | 0.710 | 0.933 | 0.974 | 0.677 | 1.272 | resist. | resist. | resist. |
| 6 | ARG_16_015 | | 0.094 | 0.064 | 0.125 | 0.545 | 0.470 | 0.620 | 0.352 | 0.310 | 0.394 | 0.955 | 0.927 | 0.983 | 0.983 | 0.873 | 1.093 | resist. | resist. | resist. |
| 7 | ARG_16_055 | | 0.012 | 0.008 | 0.017 | 0.233 | 0.189 | 0.277 | 0.083 | 0.041 | 0.125 | 0.480 | 0.435 | 0.525 | 0.164 | 0.109 | 0.219 | resist. | resist. | resist. |
| 8 | ARG_16_080 | | 0.030 | 0.014 | 0.046 | 0.208 | 0.171 | 0.246 | 0.192 | 0.148 | 0.236 | 0.719 | 0.662 | 0.775 | 0.890 | 0.791 | 0.989 | resist. | resist. | resist. |
| 9 | ARG_16_102 | | 0.070 | 0.050 | 0.091 | 0.120 | 0.095 | 0.146 | 0.171 | 0.133 | 0.210 | 0.582 | 0.525 | 0.639 | 2.371 | 1.900 | 2.842 | 0.027 | 0.024 | 0.030 |
| 10 | ARG_16_120 | | 0.035 | 0.019 | 0.050 | 0.161 | 0.134 | 0.188 | 0.235 | 0.164 | 0.306 | 0.747 | 0.692 | 0.802 | 1.858 | 1.254 | 2.463 | 0.017 | 0.017 | 0.018 |
| 11 | ARG_16_133 | | 0.013 | 0.008 | 0.017 | 0.150 | 0.120 | 0.181 | 0.035 | 0.022 | 0.049 | 0.576 | 0.370 | 0.782 | 0.248 | 0.186 | 0.310 | 0.063 | 0.049 | 0.077 |
| 12 | ARG_16_155 | | 0.016 | 0.007 | 0.025 | 0.220 | 0.188 | 0.252 | 0.202 | 0.133 | 0.271 | 0.884 | 0.641 | 1.126 | 0.420 | 0.338 | 0.503 | 0.059 | 0.039 | 0.079 |
| 13 | ARG_16_169 | | 0.008 | 0.007 | 0.009 | 0.145 | 0.132 | 0.159 | 0.045 | 0.031 | 0.059 | 0.192 | 0.117 | 0.268 | 0.189 | 0.165 | 0.213 | 0.016 | 0.015 | 0.018 |
| 14 | ARG_16_199 | | 0.010 | 0.005 | 0.015 | 0.103 | 0.081 | 0.125 | 0.119 | 0.075 | 0.163 | 0.372 | 0.338 | 0.406 | 0.574 | 0.429 | 0.720 | 0.044 | 0.042 | 0.047 |
| 15 | ARG_16_227 | | 0.017 | 0.008 | 0.026 | 0.039 | 0.016 | 0.063 | 0.055 | 0.019 | 0.091 | 0.431 | 0.392 | 0.470 | 0.496 | 0.394 | 0.599 | resist. | resist. | resist. |
| 16 | ARG_16_239 | | 0.012 | 0.003 | 0.021 | 0.056 | 0.046 | 0.067 | 0.022 | 0.014 | 0.029 | 0.055 | 0.038 | 0.072 | 1.074 | 0.710 | 1.438 | 0.056 | 0.033 | 0.078 |
| 17 | ARG_16_277 | | 0.019 | 0.014 | 0.024 | 0.308 | 0.274 | 0.343 | 0.046 | 0.028 | 0.063 | 0.290 | 0.183 | 0.396 | 1.000 | 0.750 | 1.250 | resist. | resist. | resist. |
| 18 | ARG_16_278 | | 0.012 | 0.007 | 0.018 | 0.144 | 0.125 | 0.163 | 0.119 | 0.071 | 0.168 | 0.810 | 0.694 | 0.927 | 0.206 | 0.166 | 0.245 | 0.029 | 0.019 | 0.039 |
| 19 | ARG_16_283 | | 0.006 | 0.004 | 0.009 | 0.095 | 0.085 | 0.105 | 0.068 | 0.039 | 0.097 | 0.393 | 0.306 | 0.480 | 0.450 | 0.370 | 0.529 | resist. | resist. | resist. |
| 20 | ARG_16_314 | | 0.074 | 0.037 | 0.110 | 0.048 | 0.014 | 0.081 | 0.577 | 0.395 | 0.758 | 1.762 | 1.455 | 2.068 | 2.222 | 1.712 | 2.731 | resist. | resist. | resist. |
| 21 | ARG_16_324 | | 0.014 | 0.008 | 0.019 | 0.177 | 0.145 | 0.208 | 0.089 | 0.038 | 0.139 | 0.543 | 0.482 | 0.603 | 0.713 | 0.585 | 0.842 | resist. | resist. | resist. |
| 22 | ARG_16_340 | | 0.040 | 0.023 | 0.057 | 0.044 | 0.024 | 0.063 | 0.079 | 0.046 | 0.112 | 0.291 | 0.124 | 0.457 | 0.217 | 0.164 | 0.270 | 0.028 | 0.020 | 0.037 |
| 23 | ARG_16_349 | | 0.028 | 0.011 | 0.044 | 0.206 | 0.175 | 0.236 | 0.119 | 0.073 | 0.165 | 0.907 | 0.849 | 0.966 | 0.329 | 0.283 | 0.376 | resist. | resist. | resist. |
| 24 | ARG_16_355 | | 0.017 | 0.009 | 0.025 | 0.187 | 0.137 | 0.238 | 0.143 | 0.090 | 0.197 | 0.506 | 0.264 | 0.749 | 0.565 | 0.459 | 0.671 | 0.021 | 0.017 | 0.025 |
| 25 | ARG_16_385 | | 0.015 | 0.006 | 0.024 | 0.185 | 0.163 | 0.206 | 0.060 | 0.023 | 0.096 | 0.391 | 0.288 | 0.493 | 0.812 | 0.620 | 1.003 | 0.069 | 0.044 | 0.093 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------------|--------------|-------|-------|--------------|-------|-------|--------------|-------|-------|--------------|-------|--------|--------------|-------|-------|--------------|---------|---------|
| 26 | ARG_16_394 | 0.041 | 0.026 | 0.057 | 0.132 | 0.096 | 0.168 | 0.311 | 0.292 | 0.330 | 0.172 | 0.157 | 0.188 | 1.096 | 0.949 | 1.244 | 0.215 | 0.167 | 0.263 |
| 27 | ARG_16_395 | 0.050 | 0.025 | 0.075 | 0.109 | 0.092 | 0.127 | 0.176 | 0.145 | 0.206 | 0.760 | 0.553 | 0.967 | 0.497 | 0.395 | 0.600 | 0.003 | 0.003 | 0.004 |
| 28 | ARG_16_396 | 0.046 | 0.033 | 0.058 | 0.239 | 0.198 | 0.280 | 0.167 | 0.129 | 0.205 | 0.784 | 0.667 | 0.900 | 0.514 | 0.432 | 0.595 | 0.004 | 0.003 | 0.004 |
| 29 | ARG_16_401 | 0.040 | 0.033 | 0.048 | 0.026 | 0.022 | 0.030 | 0.142 | 0.095 | 0.189 | 0.400 | 0.306 | 0.493 | 2.223 | 1.932 | 2.514 | 0.062 | 0.059 | 0.065 |
| 30 | ARG_16_402 | 0.011 | 0.004 | 0.019 | 0.024 | 0.017 | 0.031 | 0.277 | 0.234 | 0.321 | 1.299 | 0.446 | 2.153 | 2.002 | 1.002 | 3.001 | 0.041 | 0.028 | 0.053 |
| 31 | ARG_16_417 | 0.018 | 0.010 | 0.026 | 0.190 | 0.172 | 0.208 | 0.166 | 0.117 | 0.215 | 0.590 | 0.469 | 0.711 | 0.686 | 0.498 | 0.875 | resist. | resist. | resist. |
| 32 | ARG_16_421 | 0.026 | 0.022 | 0.029 | 0.188 | 0.160 | 0.216 | 0.211 | 0.141 | 0.281 | 0.067 | 0.056 | 0.079 | 0.850 | 0.605 | 1.096 | 0.033 | 0.022 | 0.045 |
| 33 | BOL_17_026 | 0.130 | 0.096 | 0.163 | 0.416 | 0.220 | 0.612 | 0.187 | 0.122 | 0.253 | 1.055 | 0.715 | 1.395 | 0.848 | 0.769 | 0.927 | resist. | resist. | resist. |
| 34 | BOL_17_034 | 0.147 | 0.083 | 0.211 | 1.545 | 0.752 | 2.337 | 0.234 | 0.183 | 0.284 | 2.570 | 2.356 | 2.785 | 0.427 | 0.360 | 0.493 | resist. | resist. | resist. |
| 35 | BOL_17_035 | 0.105 | 0.060 | 0.151 | 5.960 | 3.480 | 8.440 | 0.114 | 0.084 | 0.145 | 10.02 | 9.288 | 10.751 | 45.81 | 3.727 | 87.9 | resist. | resist. | resist. |
| ARG ^c | average | 0.027 | | | 0.157 | | | 0.154 | | | 0.602 | | | 0.889 | | | 0.048 | | |
| | median | 0.017 | | | 0.147 | | | 0.143 | | | 0.579 | | | 0.700 | | | 0.041 | | |
| | max | 0.094 | | | 0.545 | | | 0.577 | | | 1.762 | | | 2.371 | | | 0.215 | | |
| | min | 0.006 | | | 0.024 | | | 0.022 | | | 0.055 | | | 0.164 | | | 0.003 | | |
| | max/min | 15.0 | | | 22.7 | | | 26.6 | | | 32 | | | 14.5 | | | 63.3 | | |
| BOL ^f | average | 0.127 | | | 2.640 | | | 0.178 | | | 4.548 | | | 15.7 | | | resist. | | |
| | median | 0.130 | | | 1.545 | | | 0.187 | | | 2.570 | | | 0.848 | | | resist. | | |
| | max | 0.147 | | | 5.960 | | | 0.234 | | | 10.019 | | | 45.81 4 | | | resist. | | |
| | min | 0.105 | | | 0.416 | | | 0.114 | | | 1.055 | | | 0.427 | | | resist. | | |
| | max/min | 1.4 | | | 14.3 | | | 2.0 | | | 9.5 | | | 107.4 | | | resist. | | |

^aPr = promedio, ^bLI = limite inferior, ^cLS = limite superior, ^dresist. = resistente, ^eARG = Argentina, ^fBOL = Bolivia.

3.1.1. DMI

Un total de 62 aislados argentinos fueron sensibles a todos los DMI evaluados. Los valores de EC_{50} de los DMI estimados en 32 aislados argentinos (aislados N°1 a 32 en la Tabla 30) variaron de 0.006 a 0.094 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para difenoconazole (Figura 106), de 0.024 a 0.545 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para prothioconazole (Figuras 107 y 108), de 0.022 a 0.577 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para epoxiconazole (Figura 109), de 0.055 a 1.762 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para tebuconazole (Figuras 110 y 111) y de 0.164 a 2.371 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cyproconazole (Figuras 112 y 113). Entre los cinco fungicidas DMI evaluados, el difenoconazole exhibió la fungitoxicidad más alta (Figuras 105, 114 a 120, Tabla 34). El prothioconazole y el epoxiconazole no se diferenciaron entre sí ($P = 1$), siendo menos fungitóxicos que el difenoconazole, pero más fungitóxicos que el tebuconazole y el cyproconazole, que tampoco se diferenciaron entre sí ($P = 1$). De los tres aislados bolivianos evaluados, dos (N°33 y 34) fueron sensibles a todos los fungicidas DMI y uno (N°35, *C. kikuchii*) fue la única cepa considerada resistente a cyproconazole ($EC_{50} = 45.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) y menos sensible al tebuconazole ($EC_{50} = 10 \mu\text{g mL}^{-1}$) y al prothioconazole ($EC_{50} = 6 \mu\text{g mL}^{-1}$). El cyproconazole fue el menos fungitóxico con un rango de valores de EC_{50} entre 14.5 y 107.4 veces para los aislados argentinos y bolivianos, respectivamente (valor máximo/mínimo en la Tabla 35).

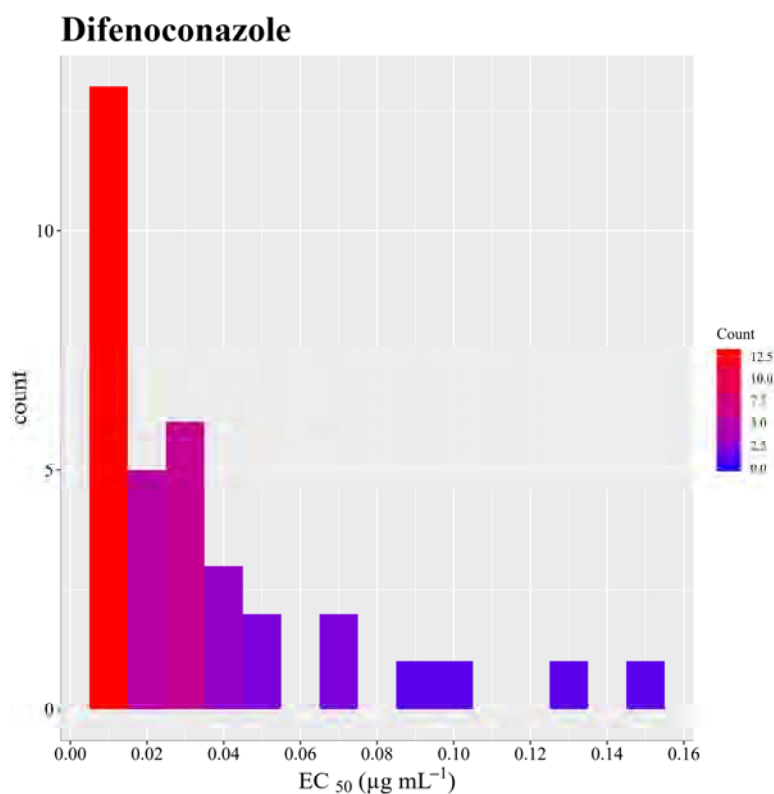


Figura 106. Distribución de sensibilidad (EC_{50}) de 35 aislados de *Cercospora* spp. (32 argentinos y 3 bolivianos) a difenoconazole.

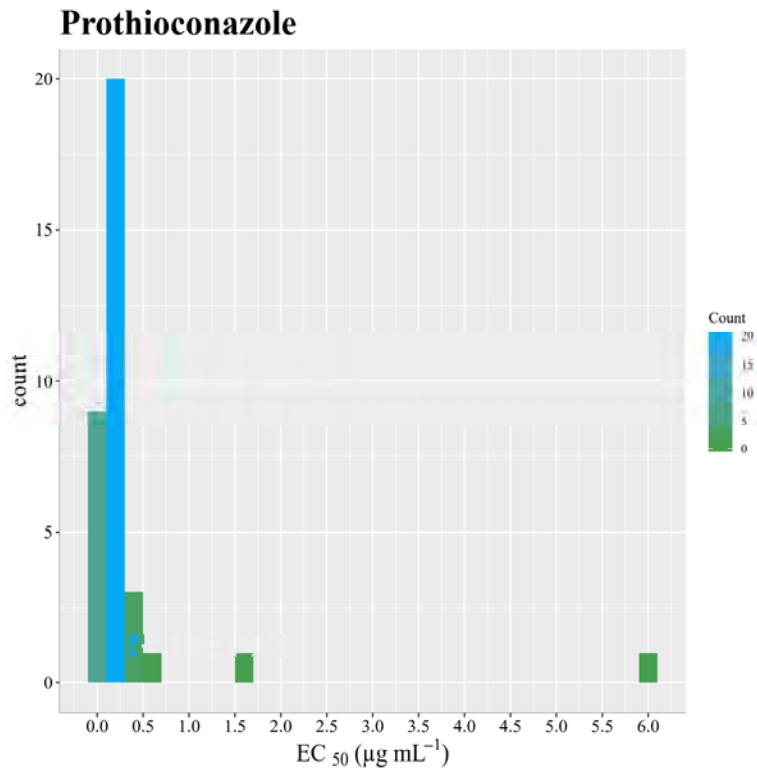


Figura 107. Distribución de sensibilidad (EC_{50}) de 35 aislados de *Cercospora* spp. (32 argentinos y 3 bolivianos) a prothioconazole.

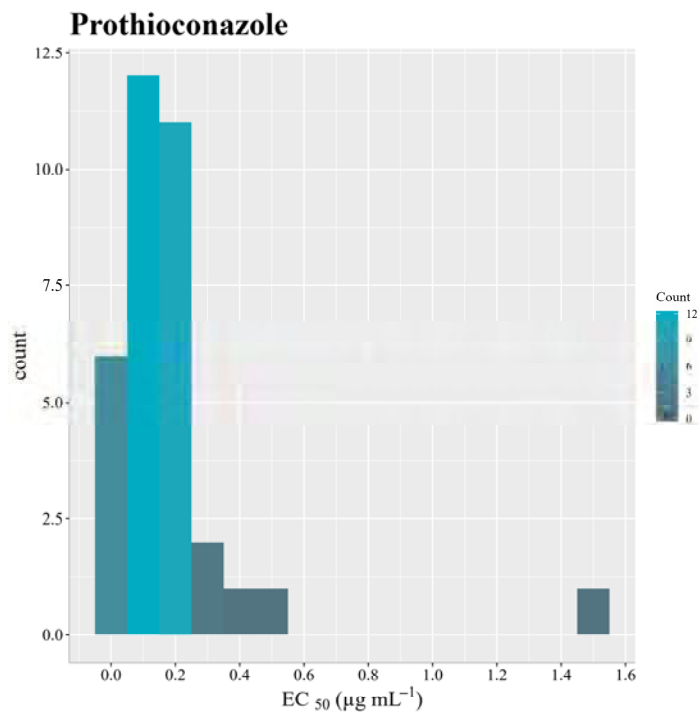


Figura 108. Distribución de sensibilidad (EC_{50}) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a prothioconazole.

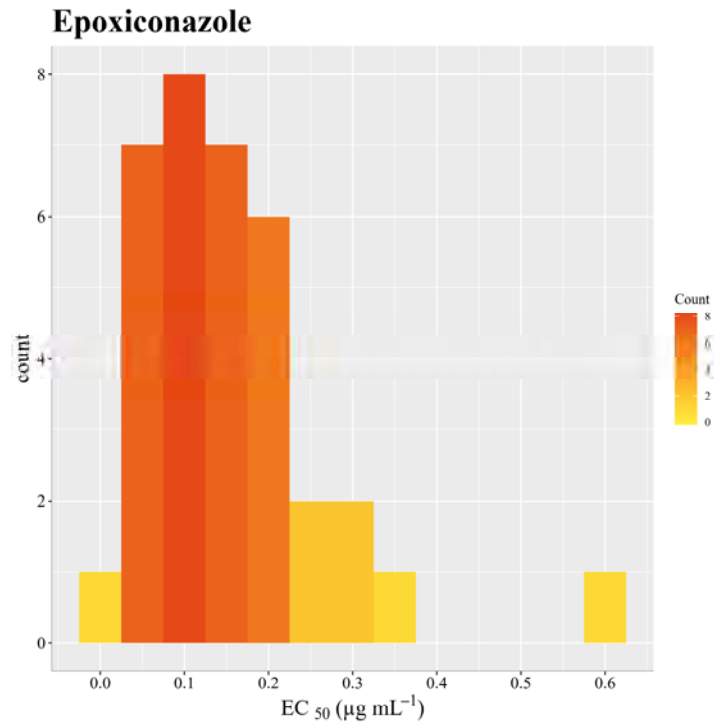


Figura 109. Distribución de sensibilidad (EC₅₀) de 35 aislados de *Cercospora* spp. (32 argentinos y 3 bolivianos) a epoxiconazole.

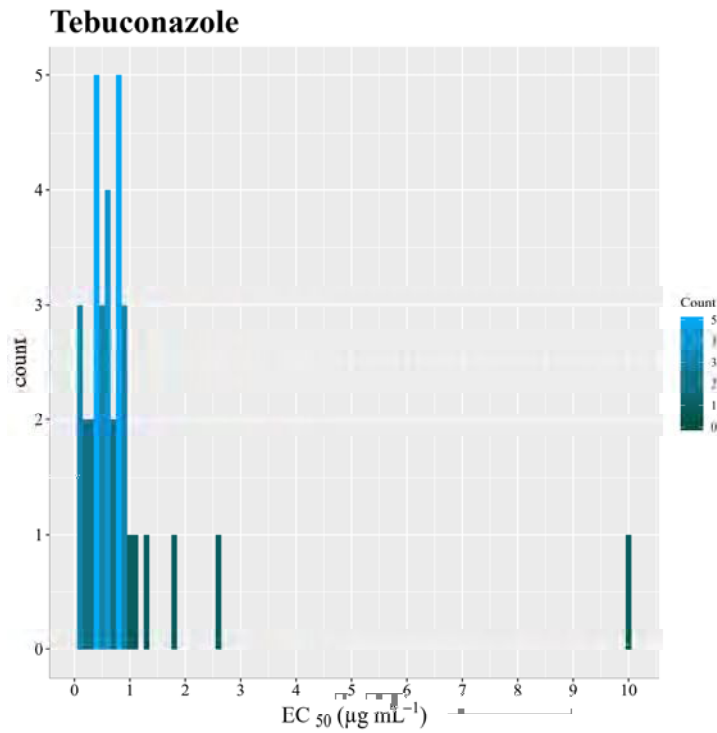


Figura 110. Distribución de sensibilidad (EC₅₀) de 35 aislados de *Cercospora* spp. (32 argentinos y 3 bolivianos) a tebuconazole.

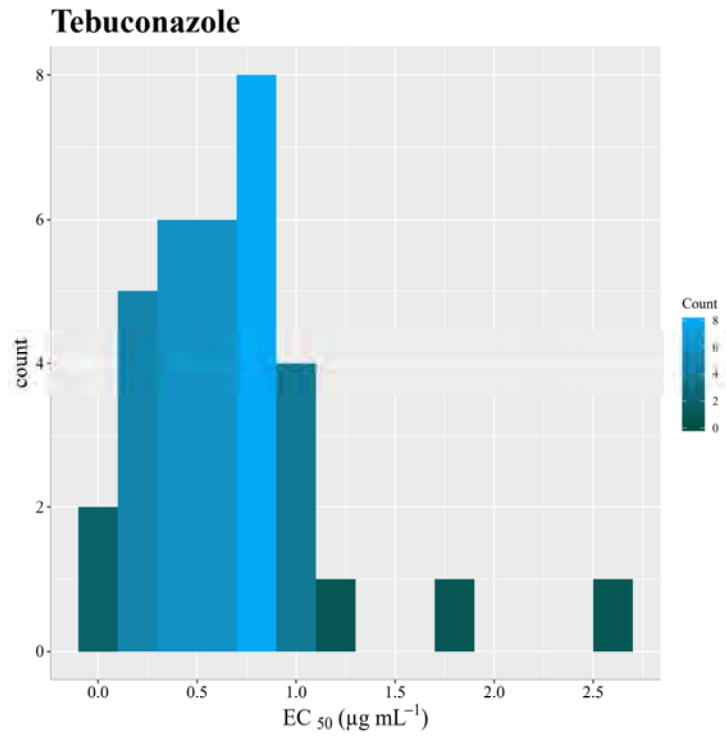


Figura 111. Distribución de sensibilidad (EC_{50}) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a tebuconazole.

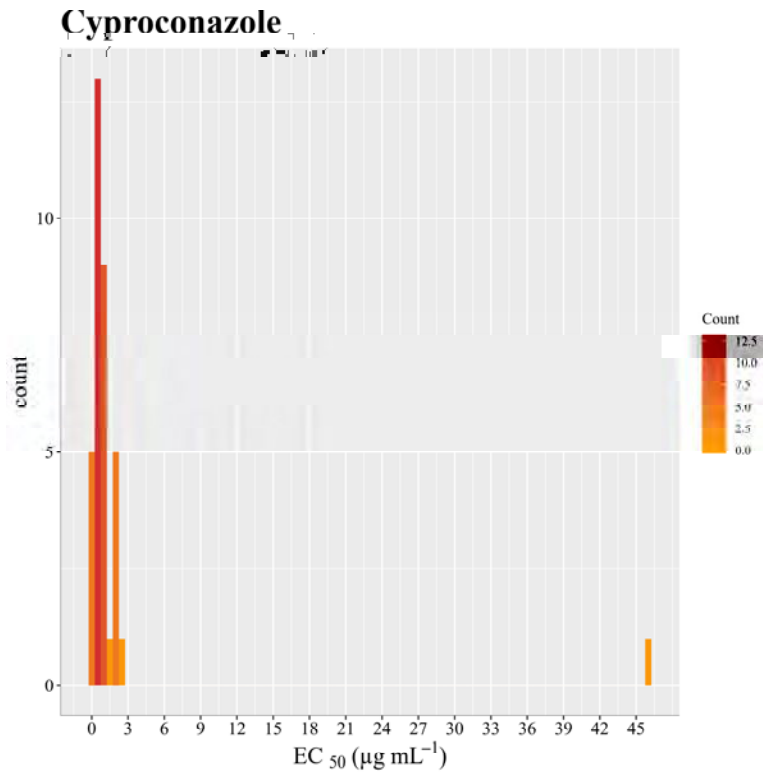


Figura 112. Distribución de sensibilidad (EC_{50}) de 35 aislados de *Cercospora* spp. (32 argentinos y 3 bolivianos) a cyproconazole.

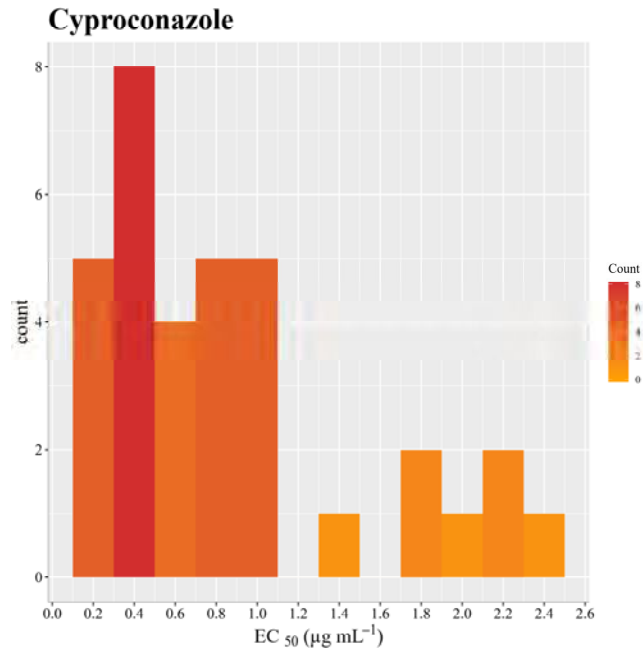


Figura 113. Distribución de sensibilidad (EC₅₀) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a cyproconazole.

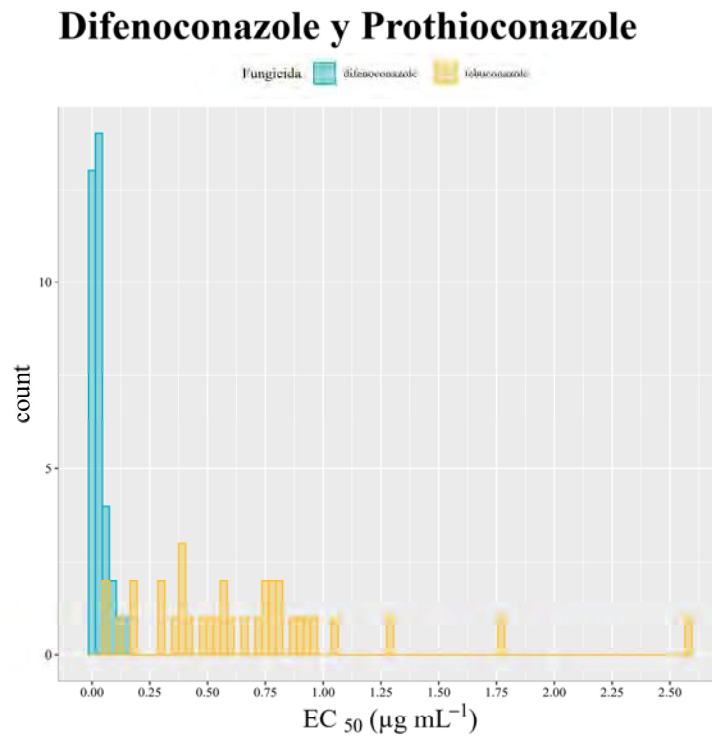


Figura 114. Distribución de sensibilidad (EC₅₀) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a difenoconazole y prothioconazole.

Difenoconazole y Epoxyconazole

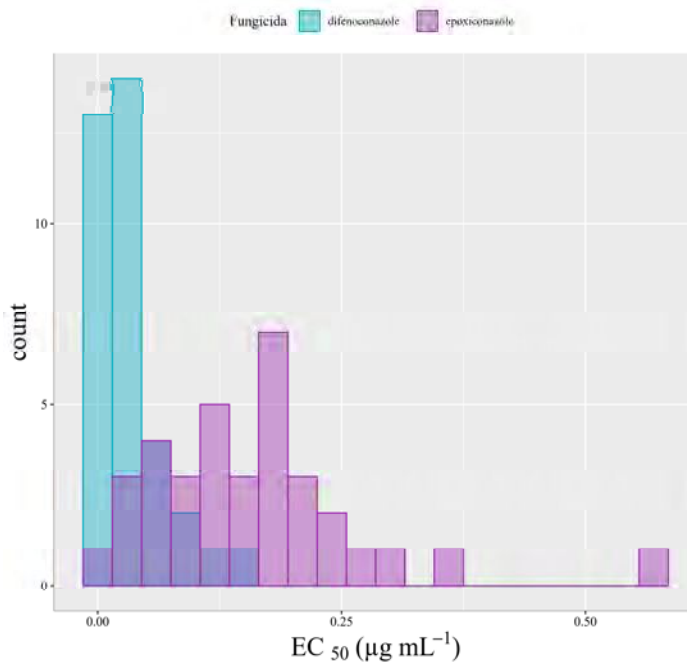


Figura 115. Distribución de sensibilidad (EC₅₀) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a difenoconazole y epoxyconazole.

Difenoconazole y Tebuconazole

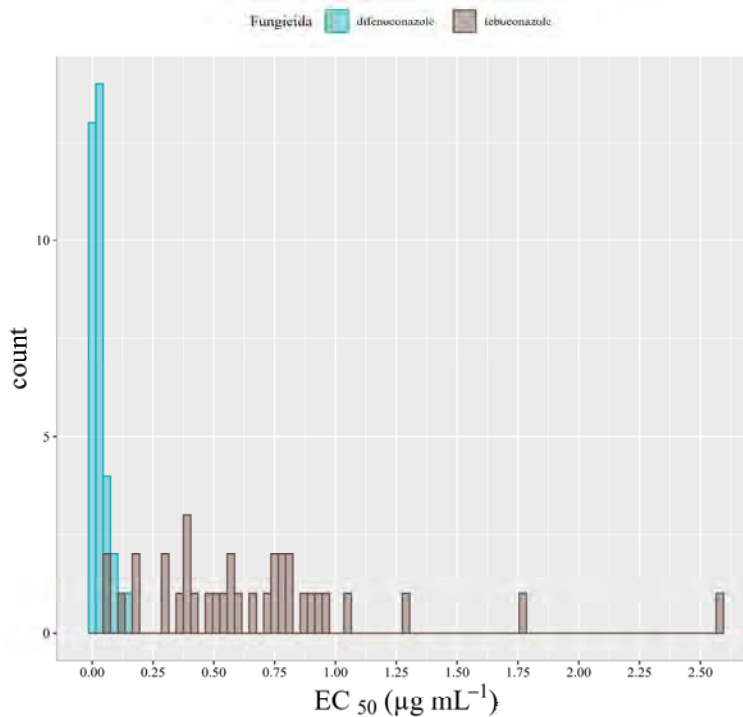


Figura 116. Distribución de sensibilidad (EC₅₀) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a difenoconazole y tebuconazole.

Difenoconazole y Cyproconazole

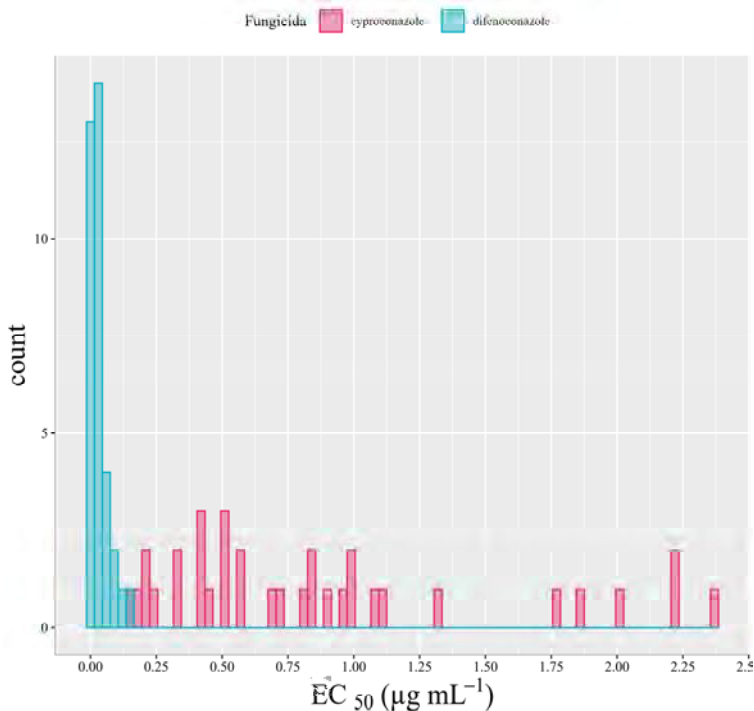


Figura 117. Distribución de sensibilidad (EC₅₀) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a difenoconazole y cyproconazole.

Difenoconazole, Prothioconazole y Cyproconazole

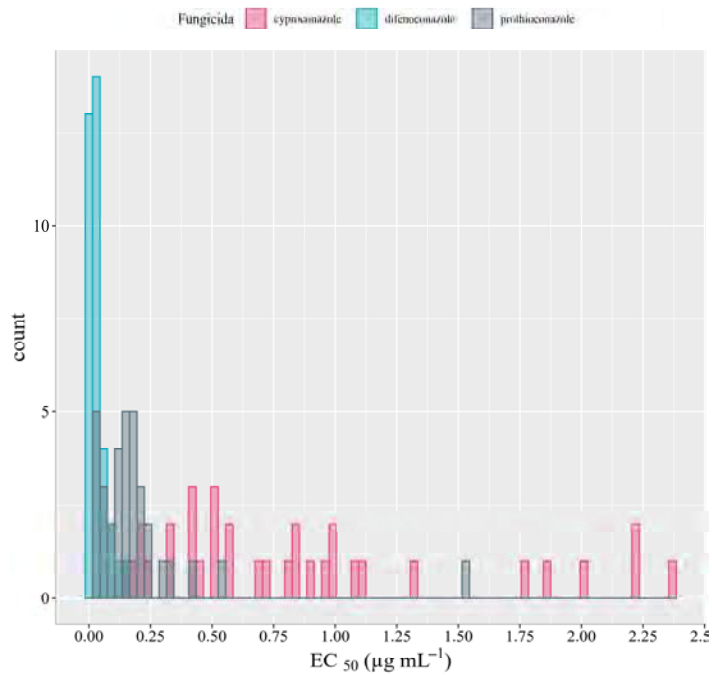


Figura 118. Distribución de sensibilidad (EC₅₀) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a difenoconazole, prothioconazole y cyproconazole.

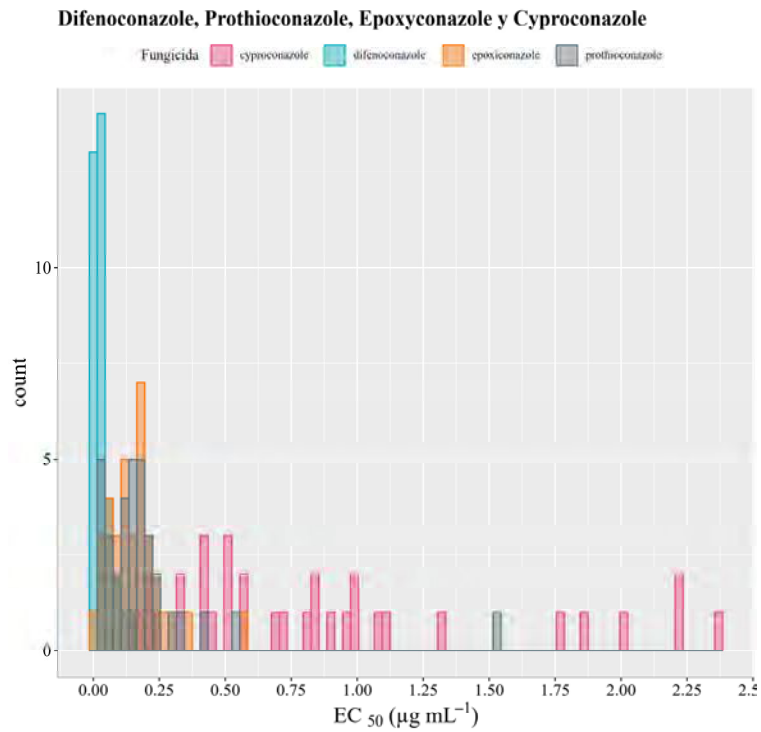


Figura 119. Distribución de sensibilidad (EC₅₀) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a difenoconazole, prothioconazole, epoxyconazole y cyproconazole.

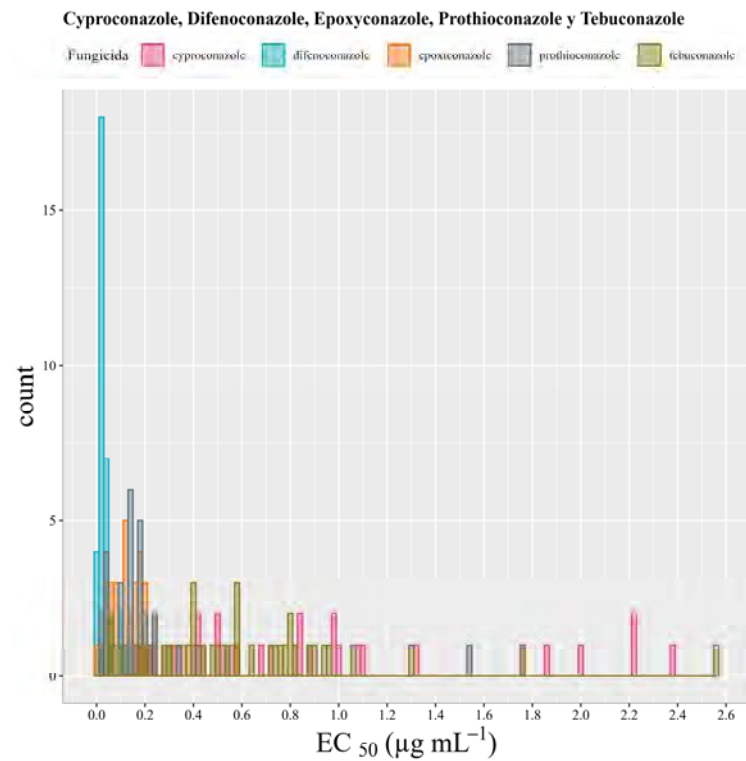


Figura 120. Distribución de sensibilidad (EC₅₀) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a difenoconazole, prothioconazole, epoxyconazole, tebuconazole y cyproconazole.

Con base en estos resultados, se eligieron dos dosis discriminatorias para evaluar nuevos aislados en una nueva ronda de experimentos: $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ permitió la detección de disminución de sensibilidad y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ permitió la detección y confirmación de aislados extremadamente resistentes. Los otros 30 aislados argentinos (N°36 a 65, Tabla 30) expuestos a dosis discriminatorias de cada fungicida DMI fueron sensibles a todos los fungicidas DMI evaluados, confirmando la falta de variación en la sensibilidad con respecto a los aislados más antiguos (Tabla 36).

En las figuras 121 a 130 se ejemplifican los experimentos *in vitro* de sensibilidad a los i.a. DMI evaluados en el presente trabajo, para algunos aislados seleccionados como ejemplo.

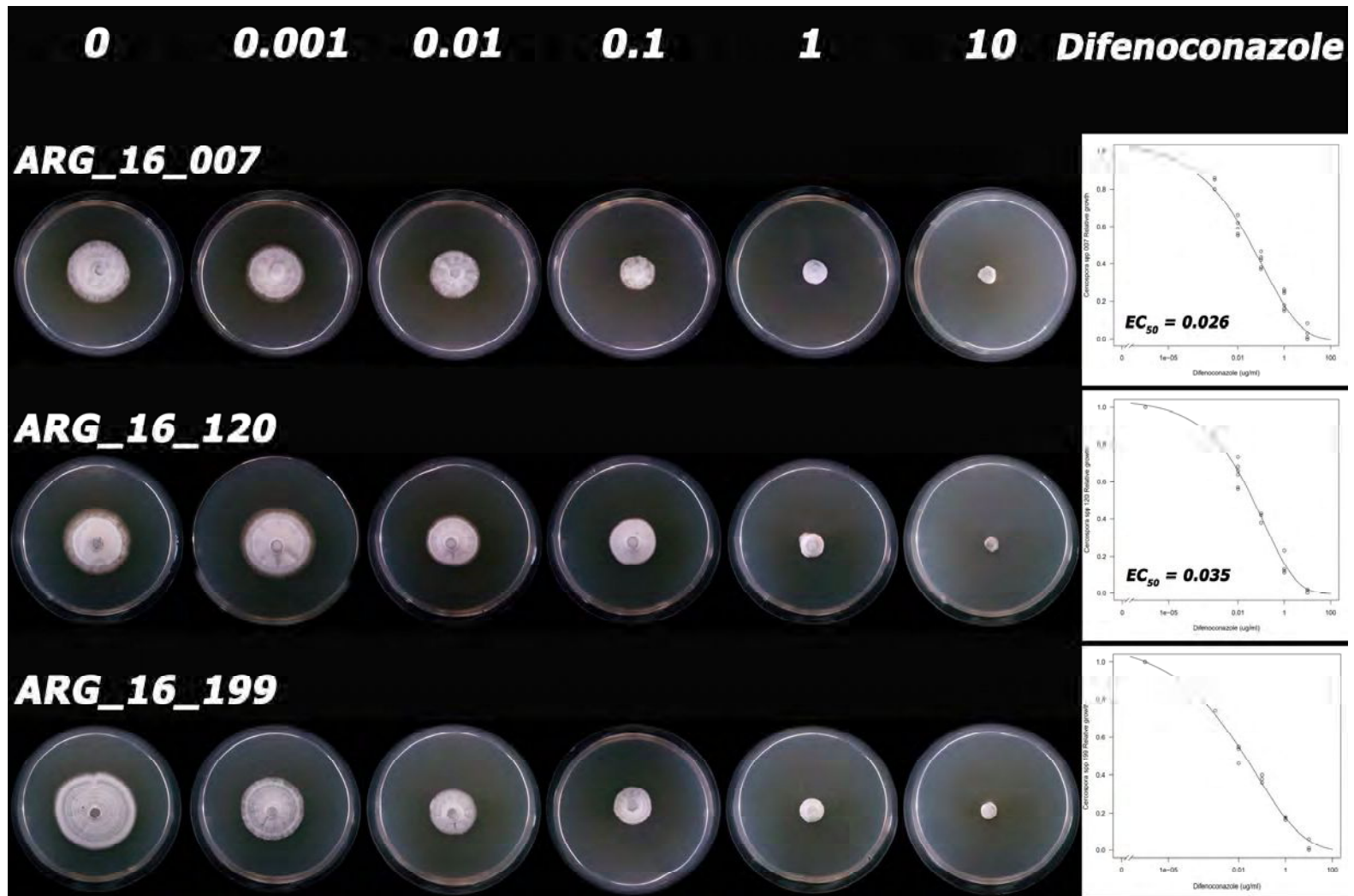


Figura 121. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 µg mL⁻¹) de difenoconazole.

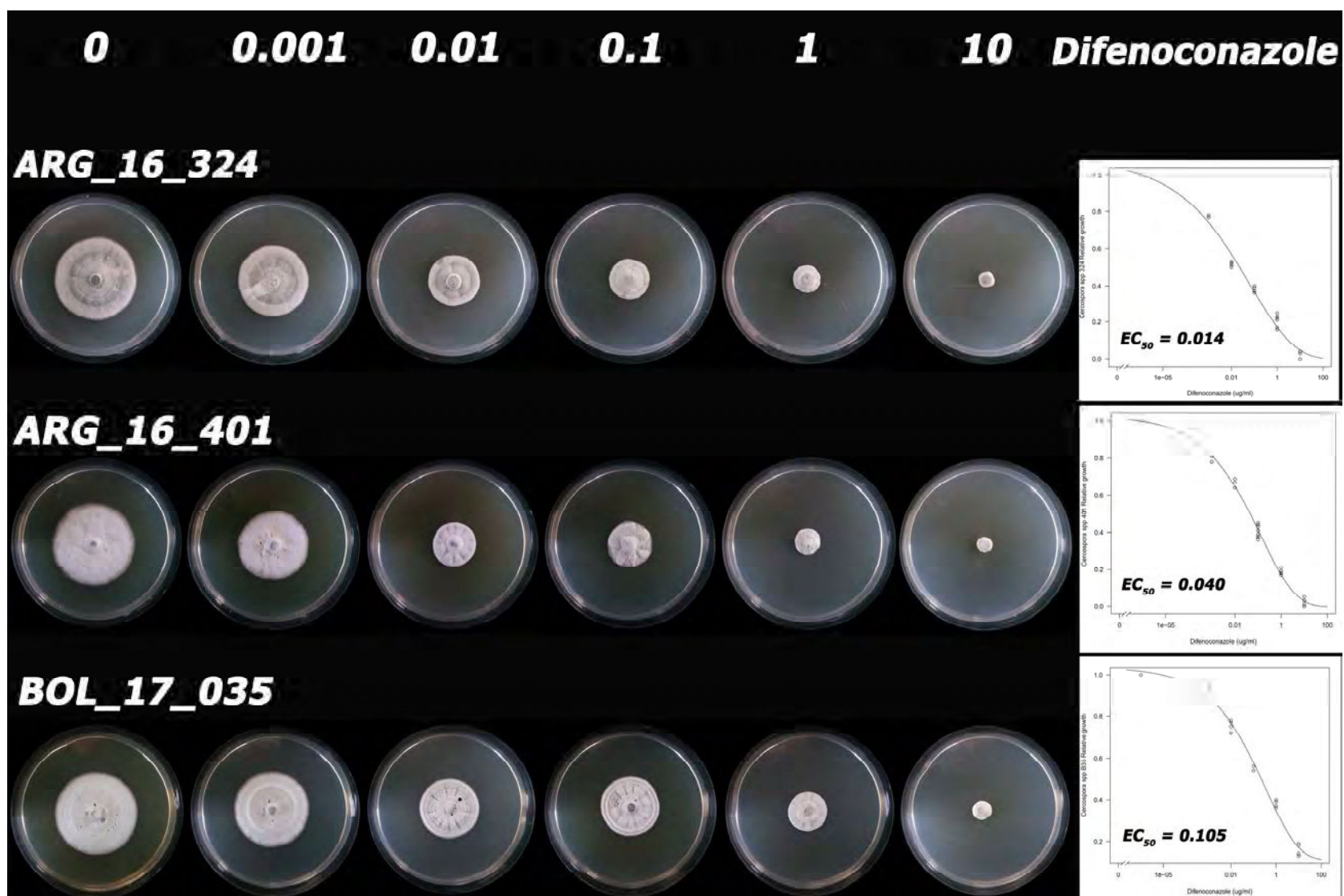


Figura 122. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de difenoconazole.

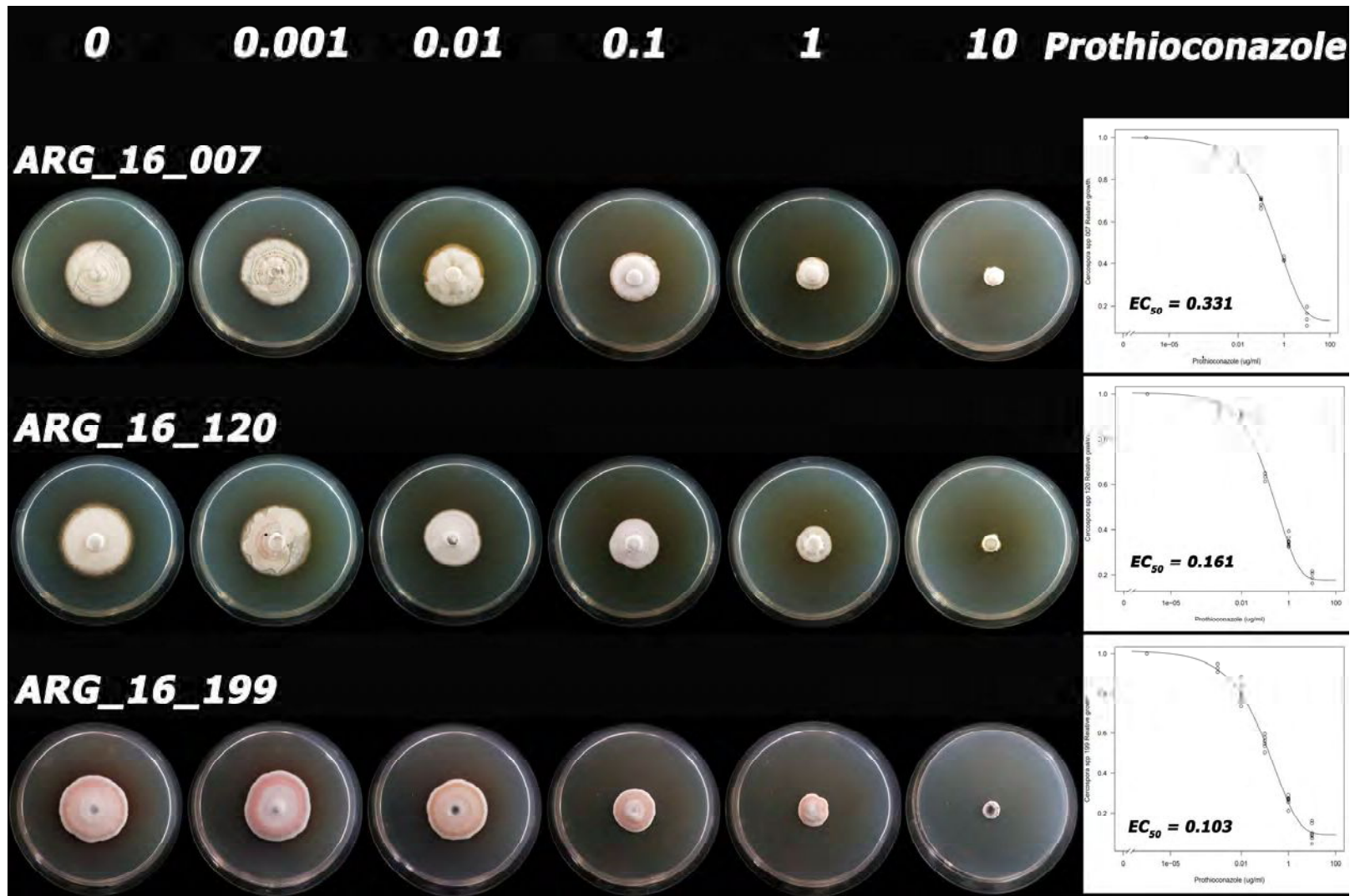


Figura 123. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 µg mL⁻¹) de prothioconazole.

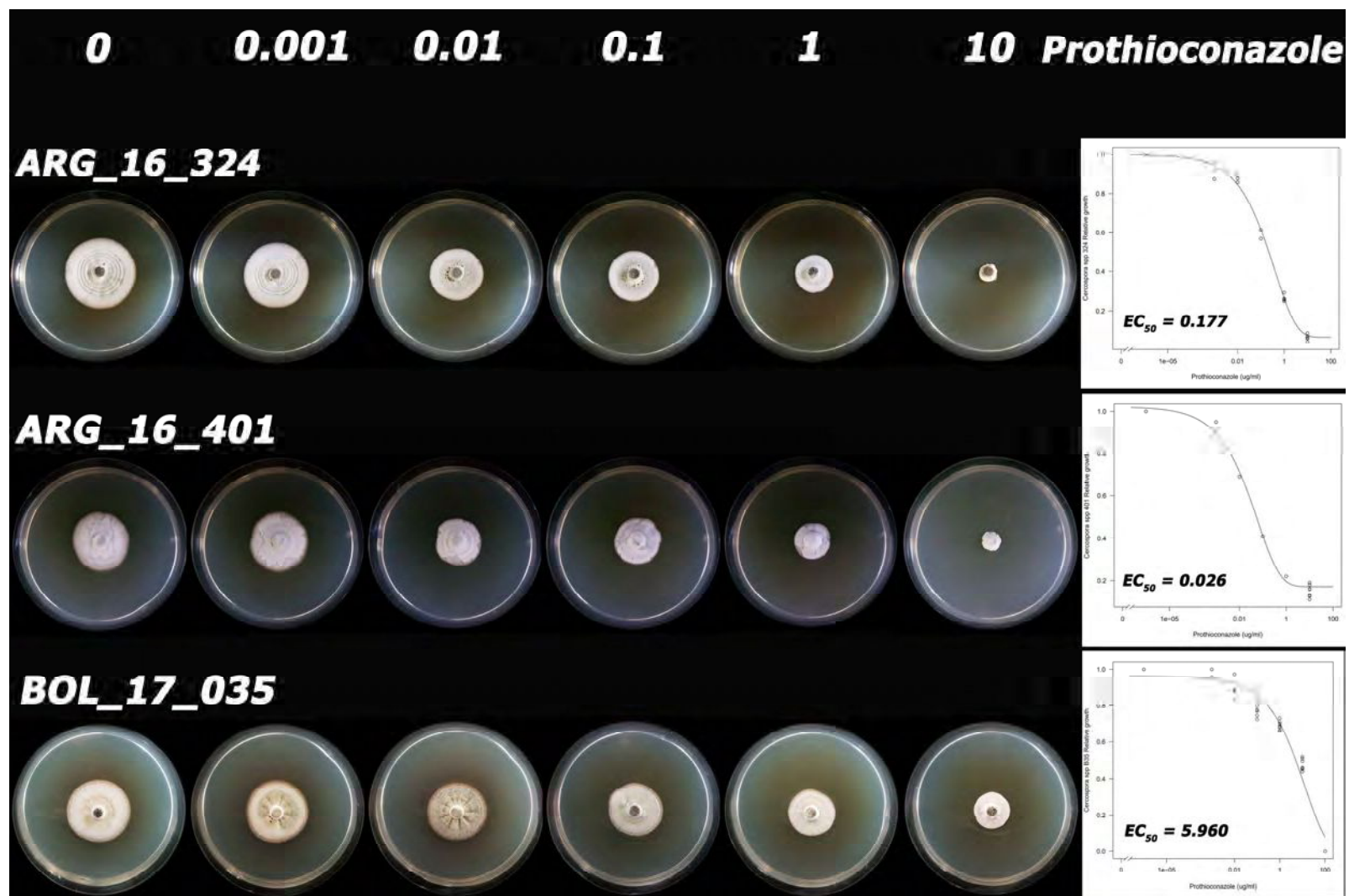


Figura 124. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de prothioconazole.

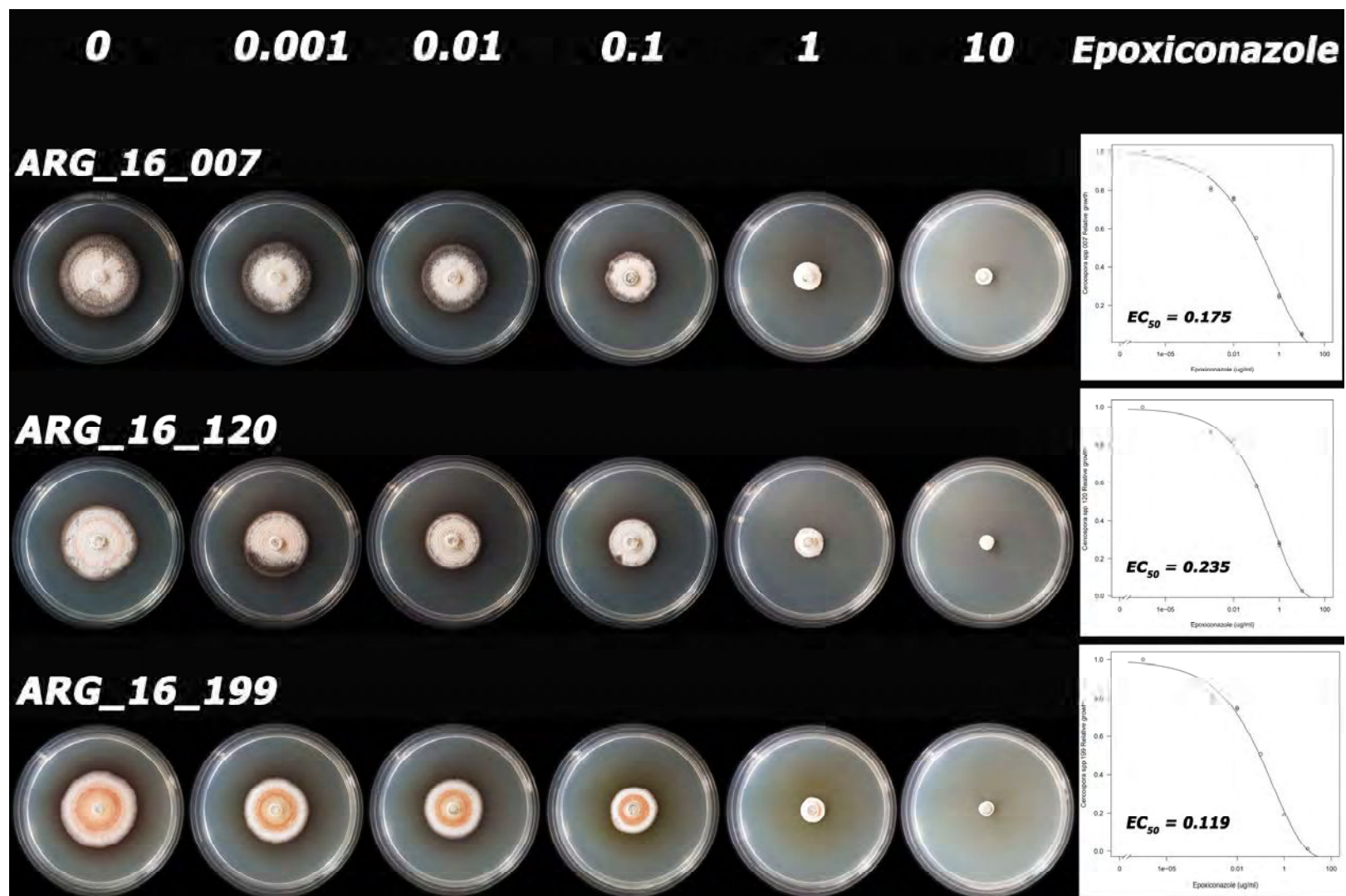


Figura 125. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de epoxiconazole.

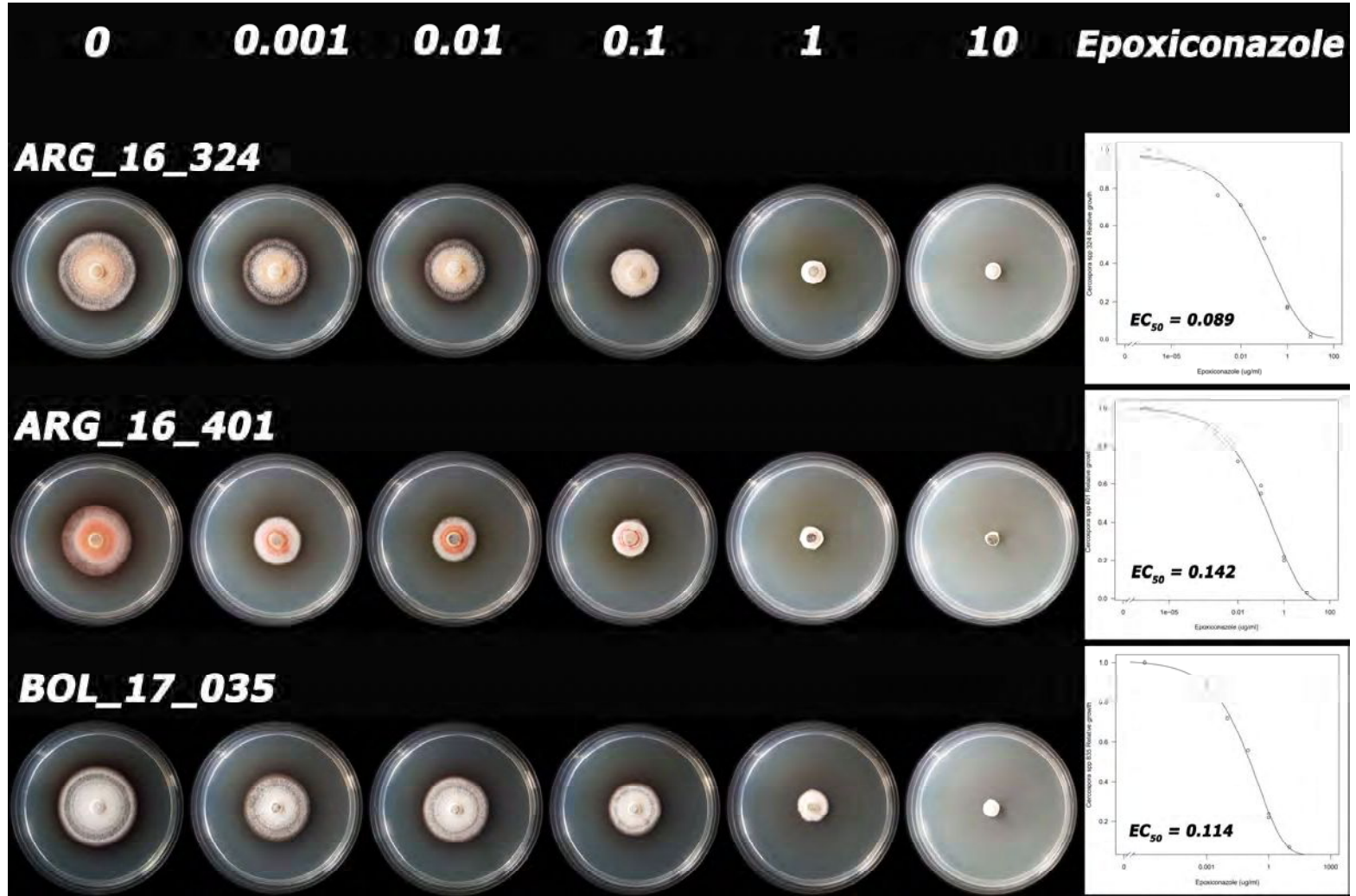


Figura 126. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de epoxiconazole.

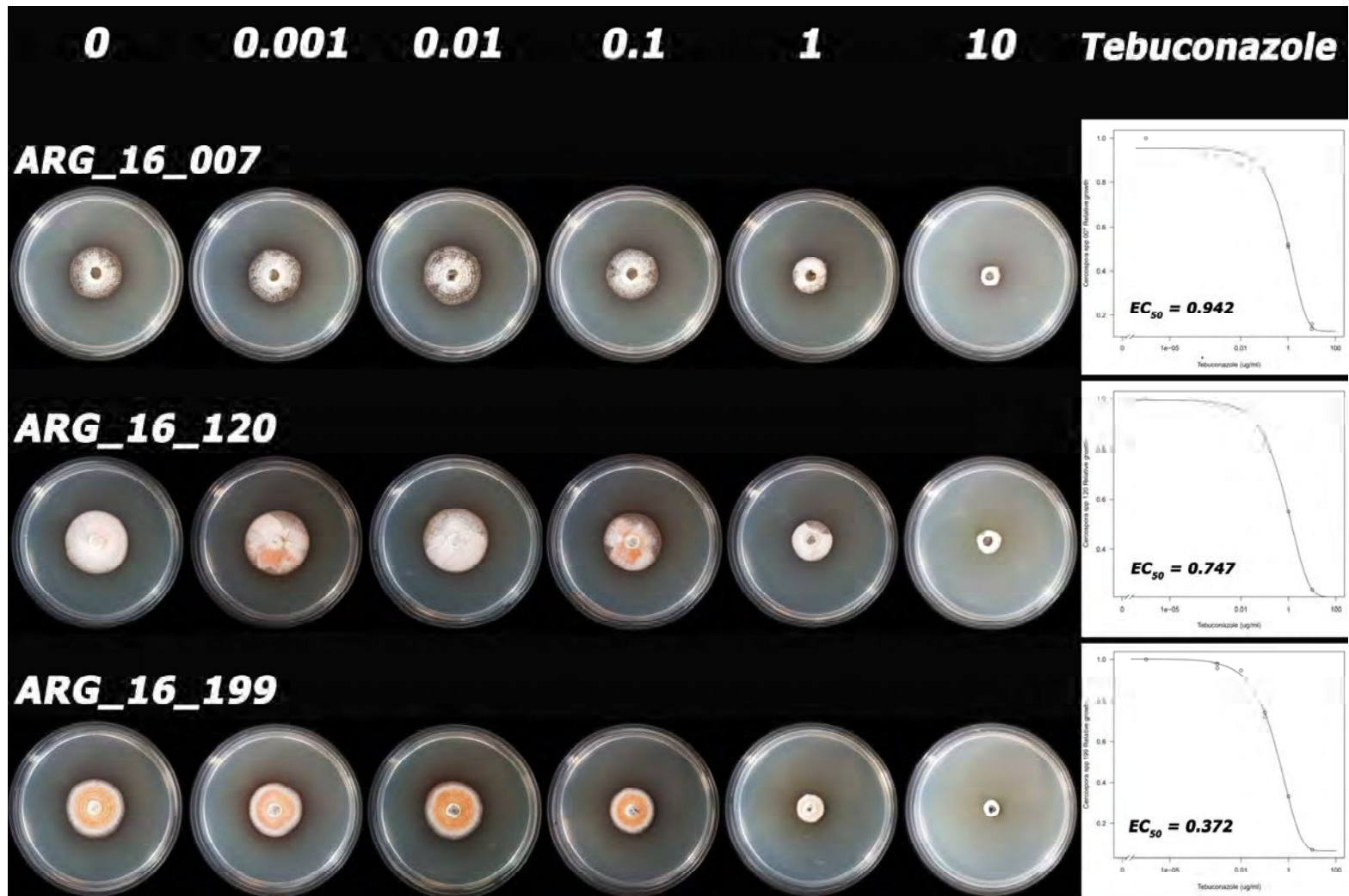


Figura 127. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 µg mL⁻¹) de tebuconazole.

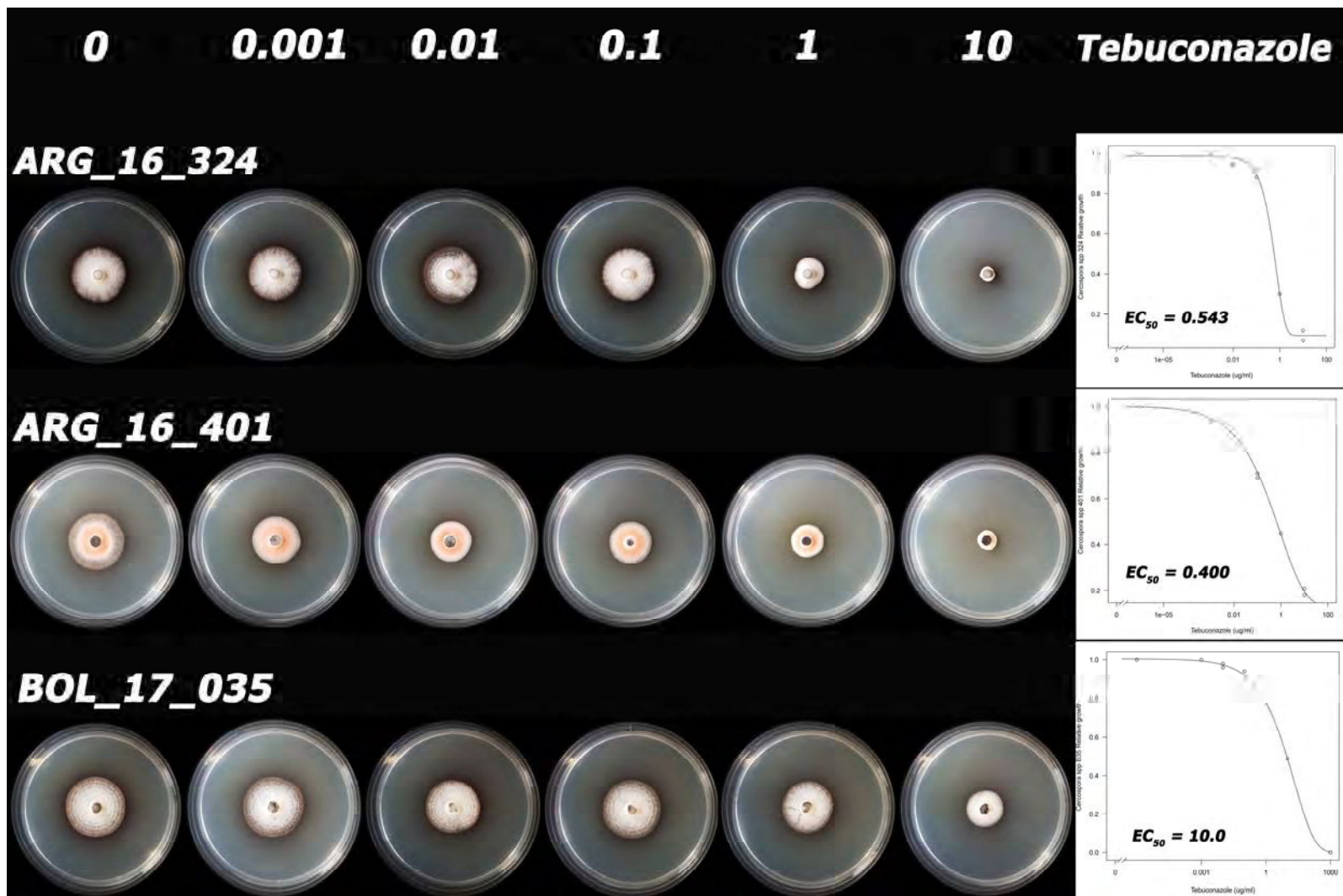


Figura 128. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de tebuconazole.

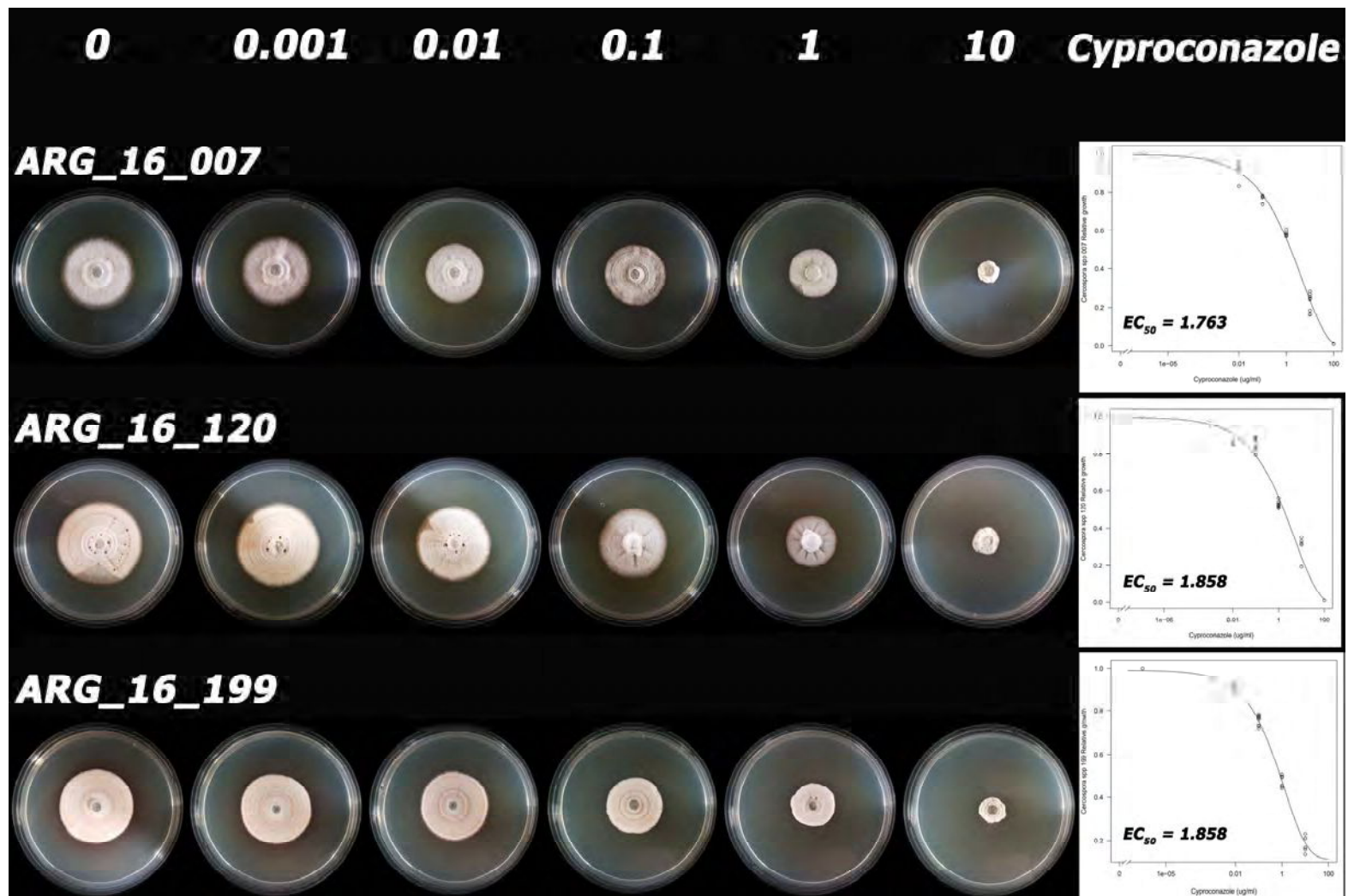


Figura 129. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de cyproconazole.

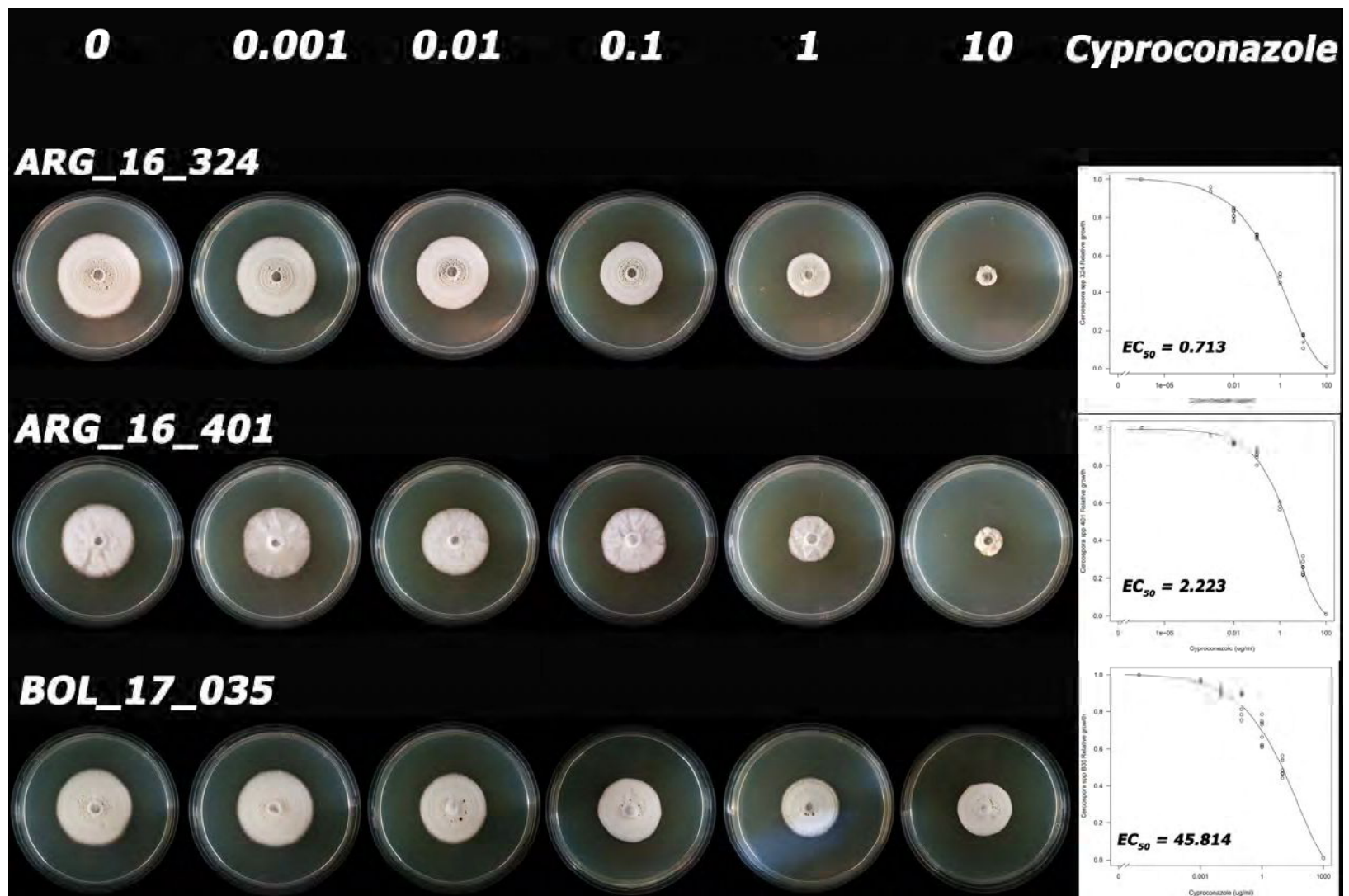


Figura 130. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 µg mL⁻¹) de cyproconazole.

3.1.2. Carbendazim (MBC)

En total, 33 aislados fueron sensibles y 32 resistentes a carbendazim, el único fungicida de MBC evaluado. Carbendazim tuvo una alta fungitoxicidad en 19 cepas sensibles de Argentina, con valores de EC_{50} que oscilaron entre 0.003 y 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 131, Tabla 35). Estos valores de EC_{50} no difirieron significativamente del difenoconazole ($P = 1$), epoxiconazole ($P = 0,1$) o prothioconazole ($P = 0.06$) (Tabla 34, Figura 105). La fungitoxicidad intrínseca del carbendazim fue similar a la del difenoconazole para los aislados sensibles de Argentina (Figura 132). En los 33 aislados sensibles (19 de los aislados del grupo N°1 a 35 y 14 de los aislados del grupo N°36 a 65), el crecimiento micelial se inhibió al 100% cuando fue expuesto a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sin embargo, en los otros 32 aislados resistentes evaluados (16 de los aislados del grupo N°1 a 35 y 16 de los aislados del grupo N°36 a 65), el carbendazim a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no inhibió ningún aislado (0% de inhibición del crecimiento micelial) y a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inhibió entre 0% y 19%, pero el 78% de estos aislados resistentes (25/32) tuvo un porcentaje de inhibición del 10% o menos (Tabla 36).

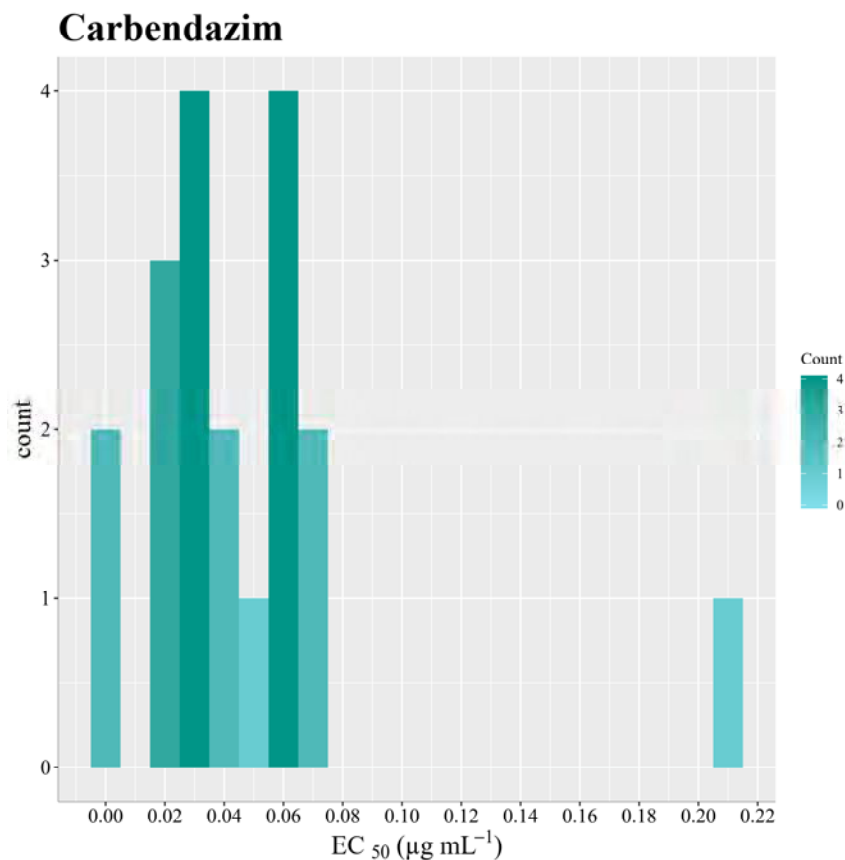


Figura 131. Distribución de sensibilidad (EC_{50}) de 19 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a carbendazim.

Difenoconazole y Carbendazim

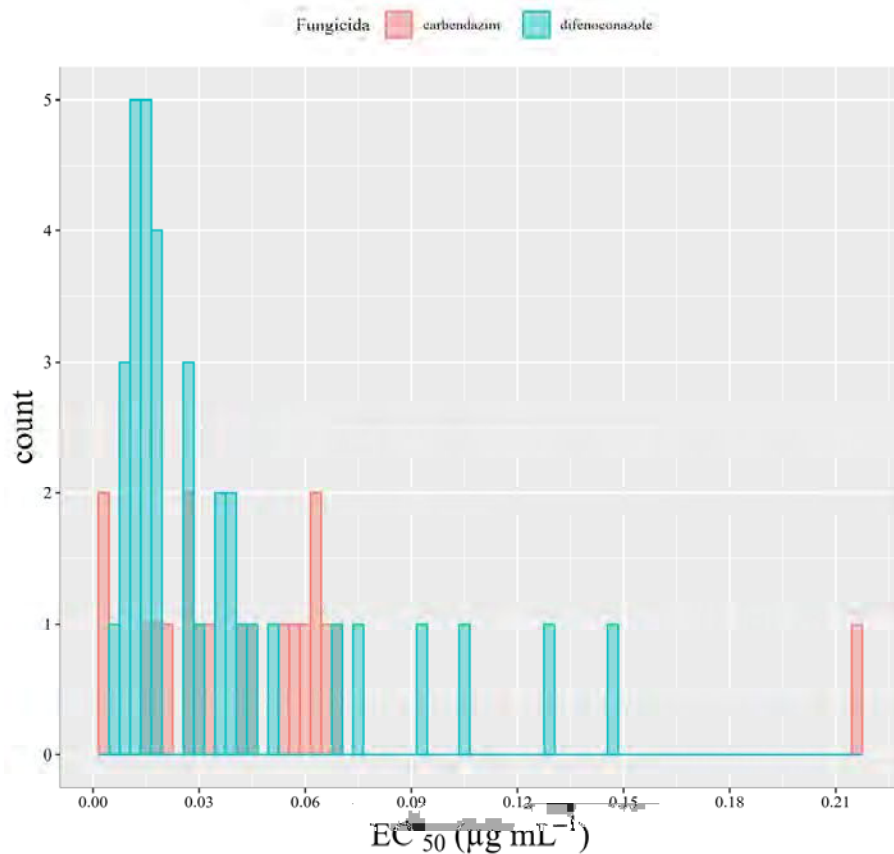


Figura 132. Distribución de sensibilidad (EC_{50}) de 32 aislados argentinos de *Cercospora* spp. a difenoconazole y de 19 aislados argentinos de *Cercospora* spp. sensibles a carbendazim.

En las Figuras 133 a 134 se ejemplifican los experimentos *in vitro* de sensibilidad al carbendazim (MBC), para algunos aislados seleccionados como ejemplo.

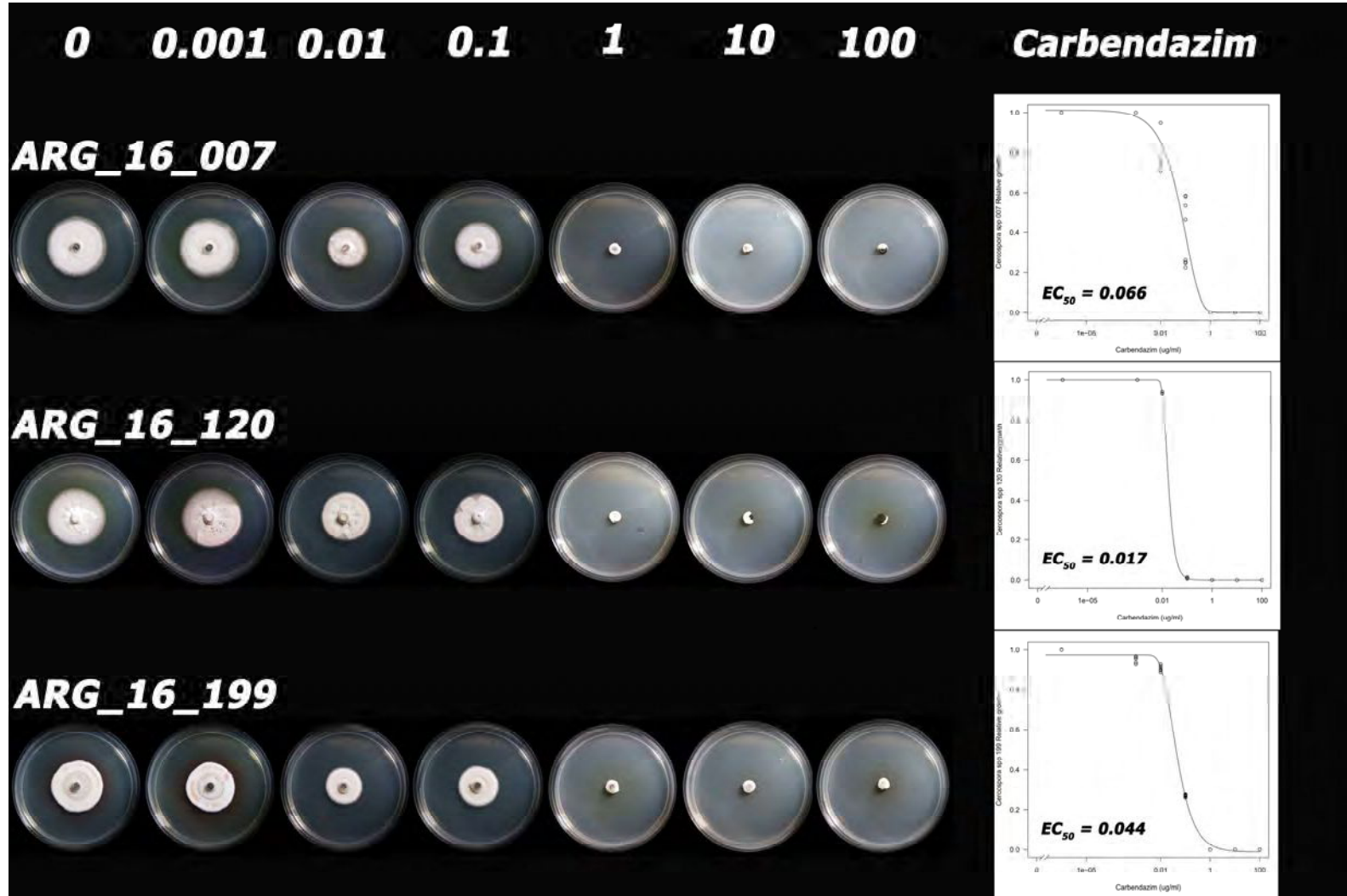


Figura 133. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de carbendazim. Se incluyen aislados sin la mutación E198A (genotipo E198).



Figura 134. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de carbendazim. Se incluyen aislados con la mutación E198A.

3.1.3. QoI

Todos los aislados fueron extremadamente resistentes a los fungicidas QoI evaluados. Por lo tanto, no se pudieron estimar los valores de EC_{50} . No hubo diferencias significativas al comparar entre valores de inhibición del crecimiento micelial con y sin la adición de SHAM a una determinada concentración de fungicida (valor $p = 0.36$ para $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esto se observó en 35 aislados de *Cercospora*. Estos resultados están de acuerdo con los de Price et al. (2015). Por lo tanto, se estima que no se produjo AOX en los aislados aquí evaluados y, por lo tanto, el SHAM no se usó en experimentos posteriores. No obstante, experimentos futuros que incluyan aislados sensibles deberían dilucidar si la vía AOX está presente en los aislados de *Cercospora* de Argentina o no.

Dado que no se observaron diferencias en la inhibición del crecimiento micelial en ningún aislado a lo largo del gradiente de concentración utilizado en las pruebas de sensibilidad *in vitro* para azoxistrobina, trifloxistrobina y piraclostrobina, no se pudieron estimar los valores de EC_{50} ($EC_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tablas 34 y 36). El crecimiento micelial de los 65 aislados fue altamente insensible a estos fungicidas ya que ninguno de ellos fue inhibido al 100% cuando fueron expuestos a la concentración más alta evaluada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Los 62 aislados argentinos tuvieron un rango de inhibición micelial de 0 a 49%, 18 a 39% y 29 a 53% para azoxistrobina, trifloxistrobina y piraclostrobina, respectivamente, a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; y un rango de 21 a 48%, 24 a 48% y 37 a 59%, respectivamente, a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabla 36). Dado que ninguno de los QoI evaluados suprimió el crecimiento micelial a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ninguno de los aislados evaluados, se considera que estos aislados son resistentes a las estrobilurinas.

En las Figuras 135 a 140 se ejemplifican los experimentos *in vitro* de sensibilidad a los i.a. QoI evaluados en el presente trabajo, para algunos aislados seleccionados como ejemplo.

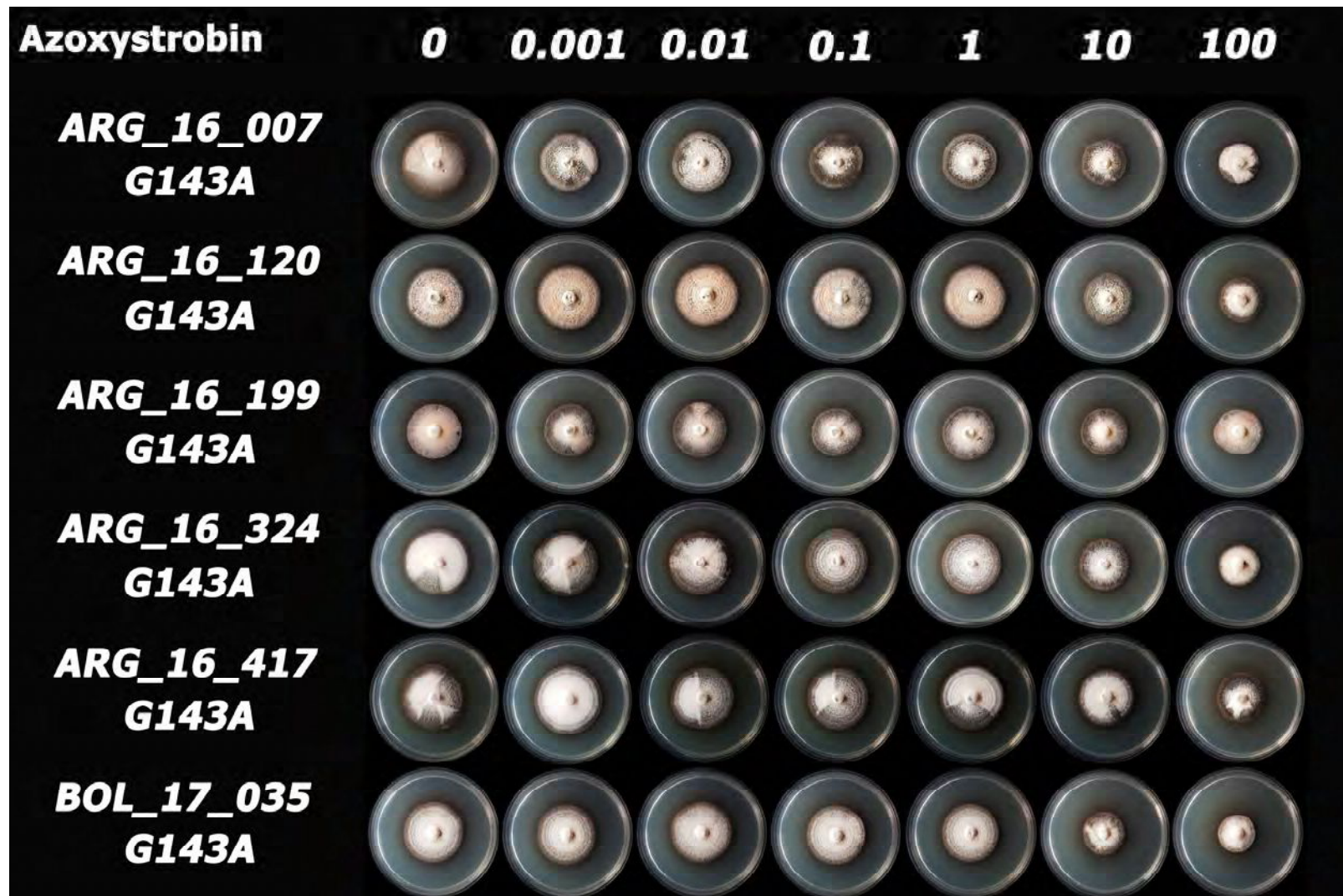


Figura 135. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de azoxystrobina. Se incluyen aislados con la mutación G143A (ARG_16_007, ARG_16_120, ARG_16_199, ARG_16_324, ARG_16_417, BOL_17_035).

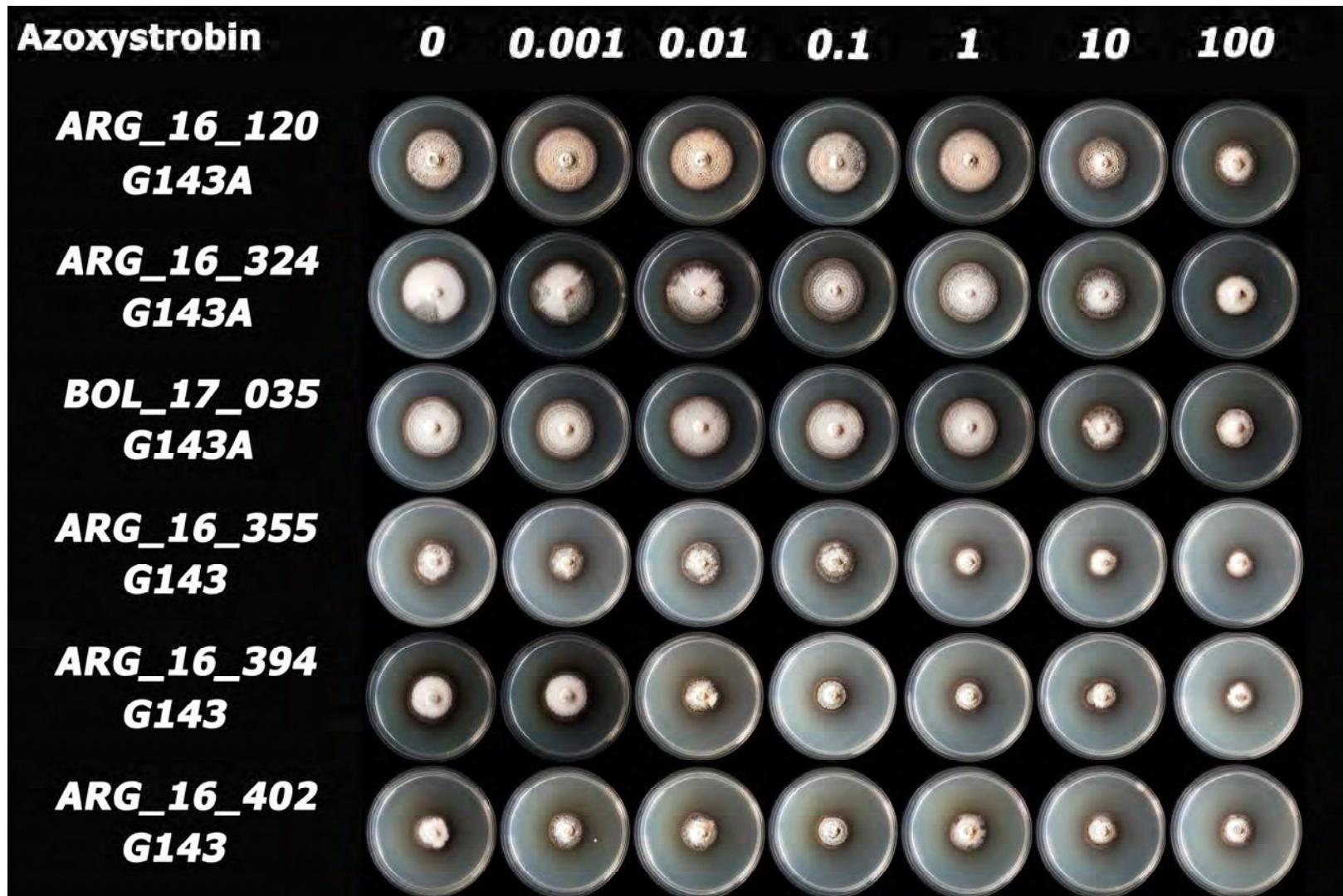


Figura 136. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de azoxystrobina. Se incluyen aislados con la mutación G143A (ARG_16_120, ARG_16_324, BOL_17_035) y sin la mutación G143A (ARG_16_355, ARG_16_394, ARG_16_402).

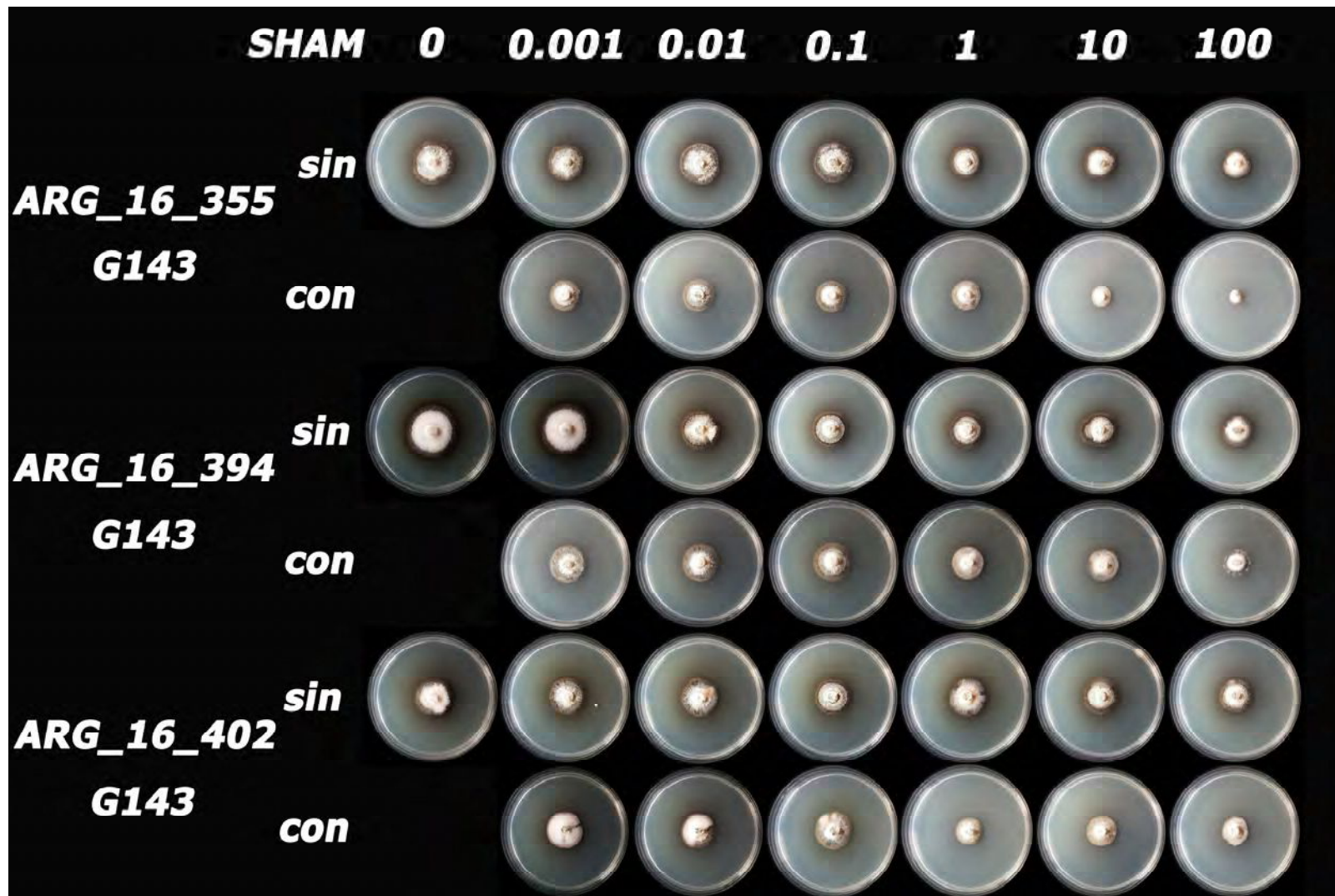


Figura 137. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de azoxystrobina, sin y con el agregado de SHAM. Se incluyen aislados sin la mutación G143A (genotipo G143) (ARG_16_355, ARG_16_394, ARG_16_402).

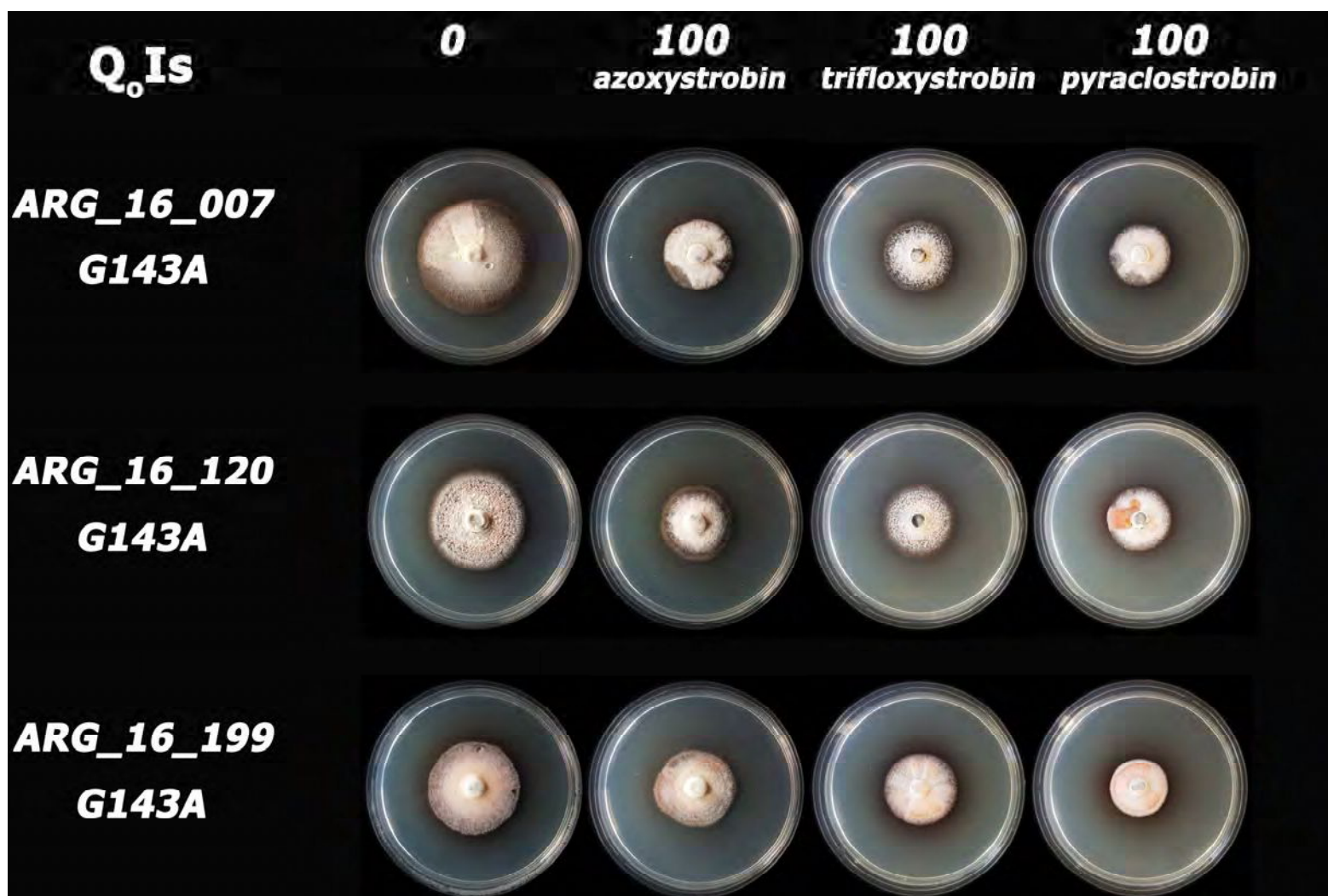


Figura 138. Inhibición del crecimiento micelial a 100 µg mL⁻¹ de azoxystrobina, trifloxystrobina y pyraclostrobina. Se incluyen aislados con la mutación G143A (ARG_16_007, ARG_16_120, ARG_16_199).

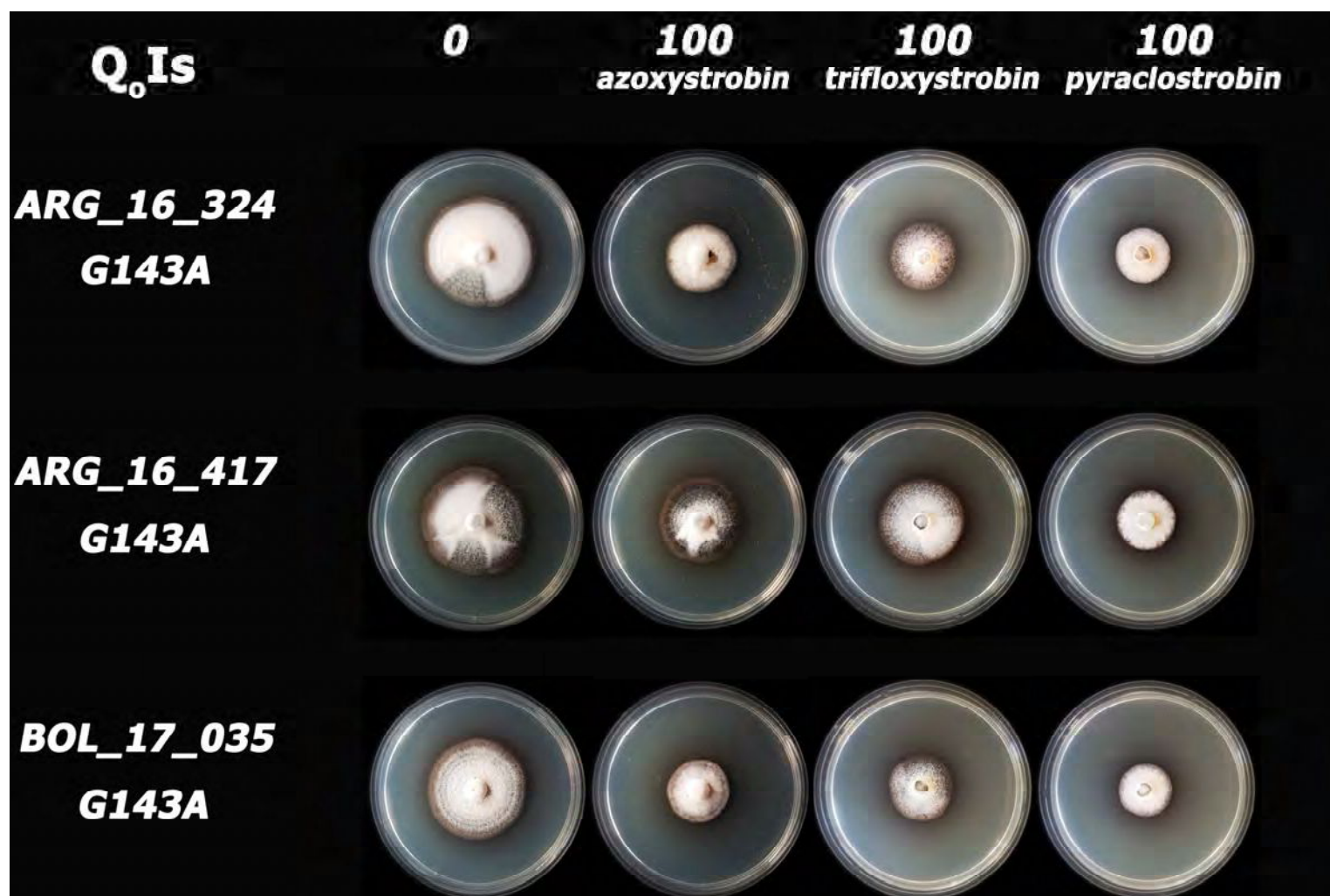


Figura 139. Inhibición del crecimiento micelial a 100 µg mL⁻¹ de azoxystrobina, trifloxystrobina y pyraclostrobina. Se incluyen aislados con la mutación G143A (ARG_16_324, ARG_16_417, BOL_17_035).

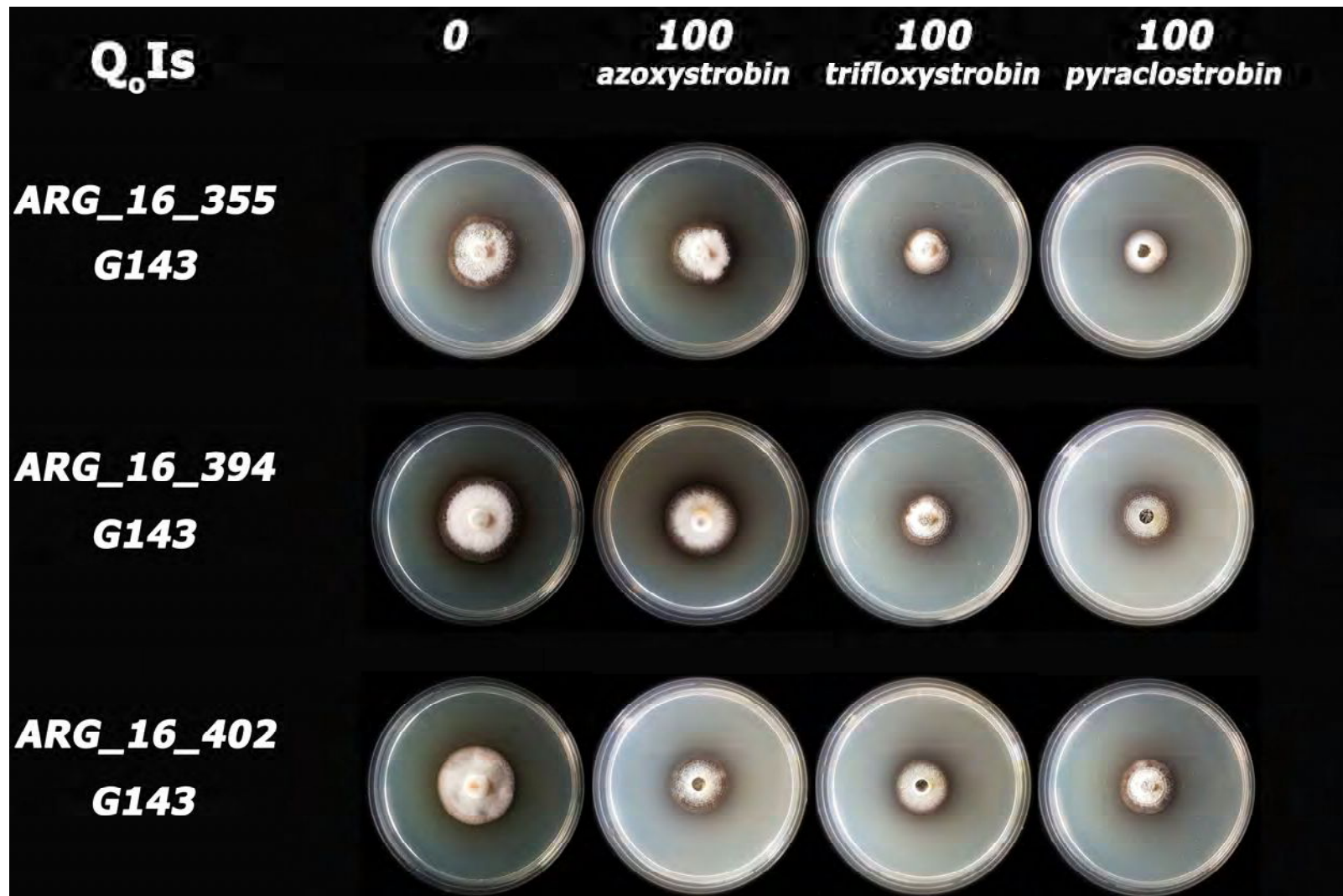


Figura 140. Inhibición del crecimiento micelial a 100 µg mL⁻¹ de azoxystrobina, trifloxystrobina y pyraclostrobina. Se incluyen aislados sin la mutación G143A (genotipo G143) (ARG_16_355, ARG_16_394, ARG_16_402).

3.1.4. SDHI

Todos los aislados evaluados fueron insensibles a boscalid, fluxapyroxad y pydiflumetofen. El crecimiento micelial de los 65 aislados fue altamente insensible a los fungicidas SDHI ya que ninguno de ellos se inhibió al 100% cuando se expuso a la concentración más alta evaluada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Los 62 aislados argentinos tuvieron un rango de inhibición micelial de 0 a 36%, 3 a 20% y 2 a 41% para boscalid, fluxapyroxad y pydiflumetofen, respectivamente, a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; y un rango de 0 a 40%, 3 a 52% y 3 a 58%, respectivamente, a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabla 36).

En las figuras 141 a 144 se ejemplifican los experimentos *in vitro* de sensibilidad a los i.a. SDHI evaluados en el presente trabajo, para algunos aislados seleccionados como ejemplo.

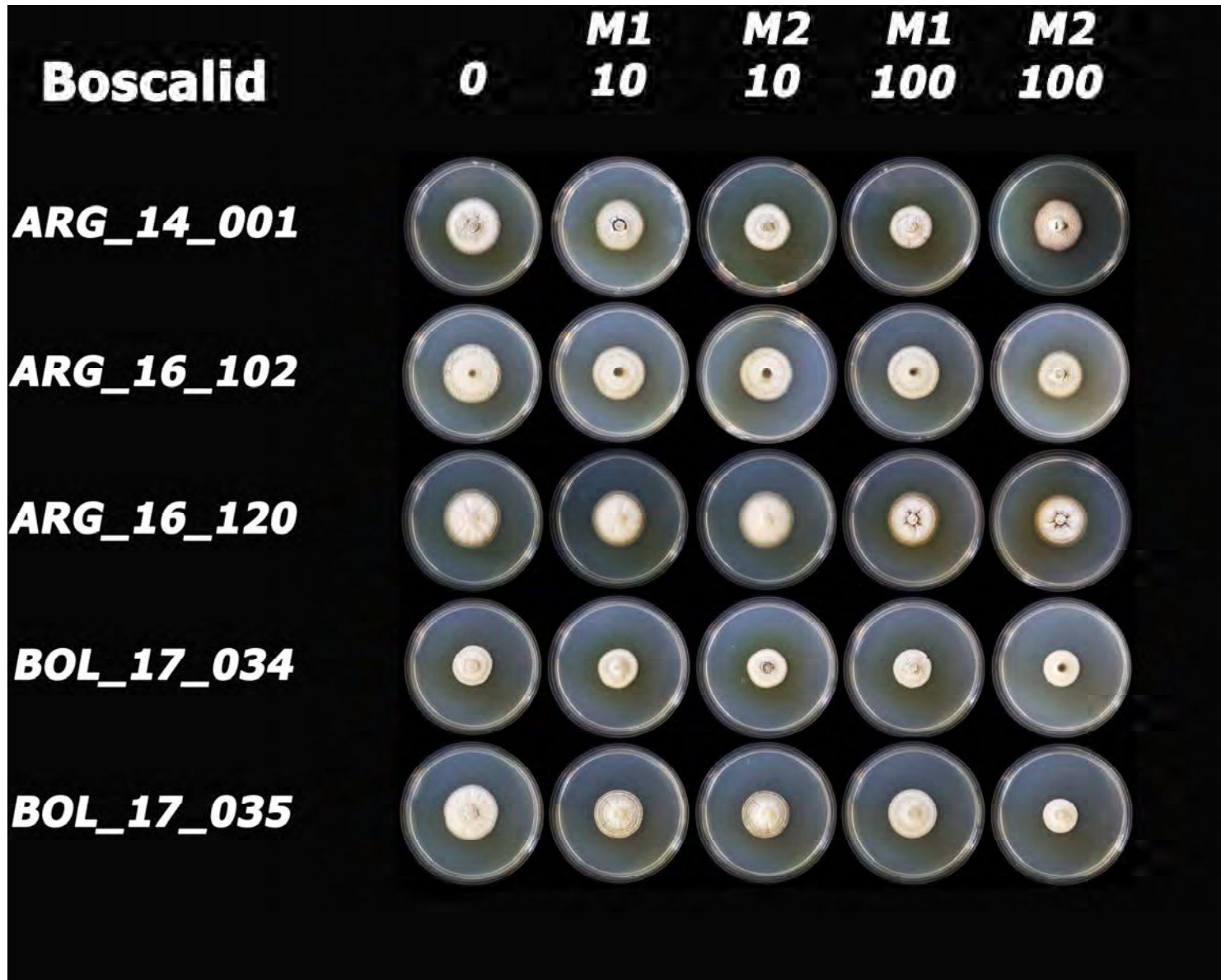


Figura 141. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de boscalid. M1 = fabricante 1, M2 = fabricante 2

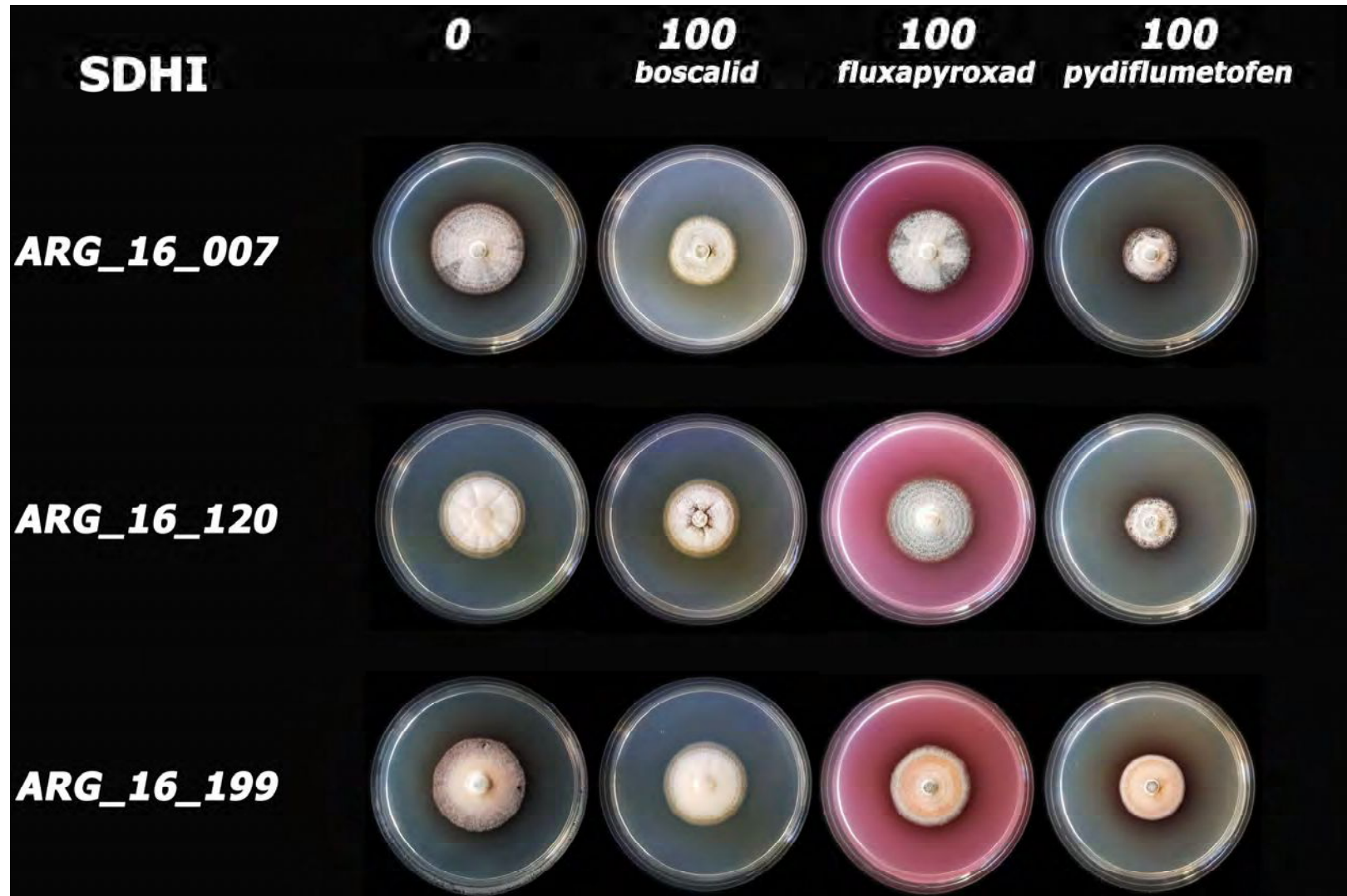


Figura 142. Inhibición del crecimiento micelial a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de boscalid, fluxapyroxad y pydiflumetofen. Se incluyen los aislados ARG_16_007, ARG_16_120 y ARG_16_199.

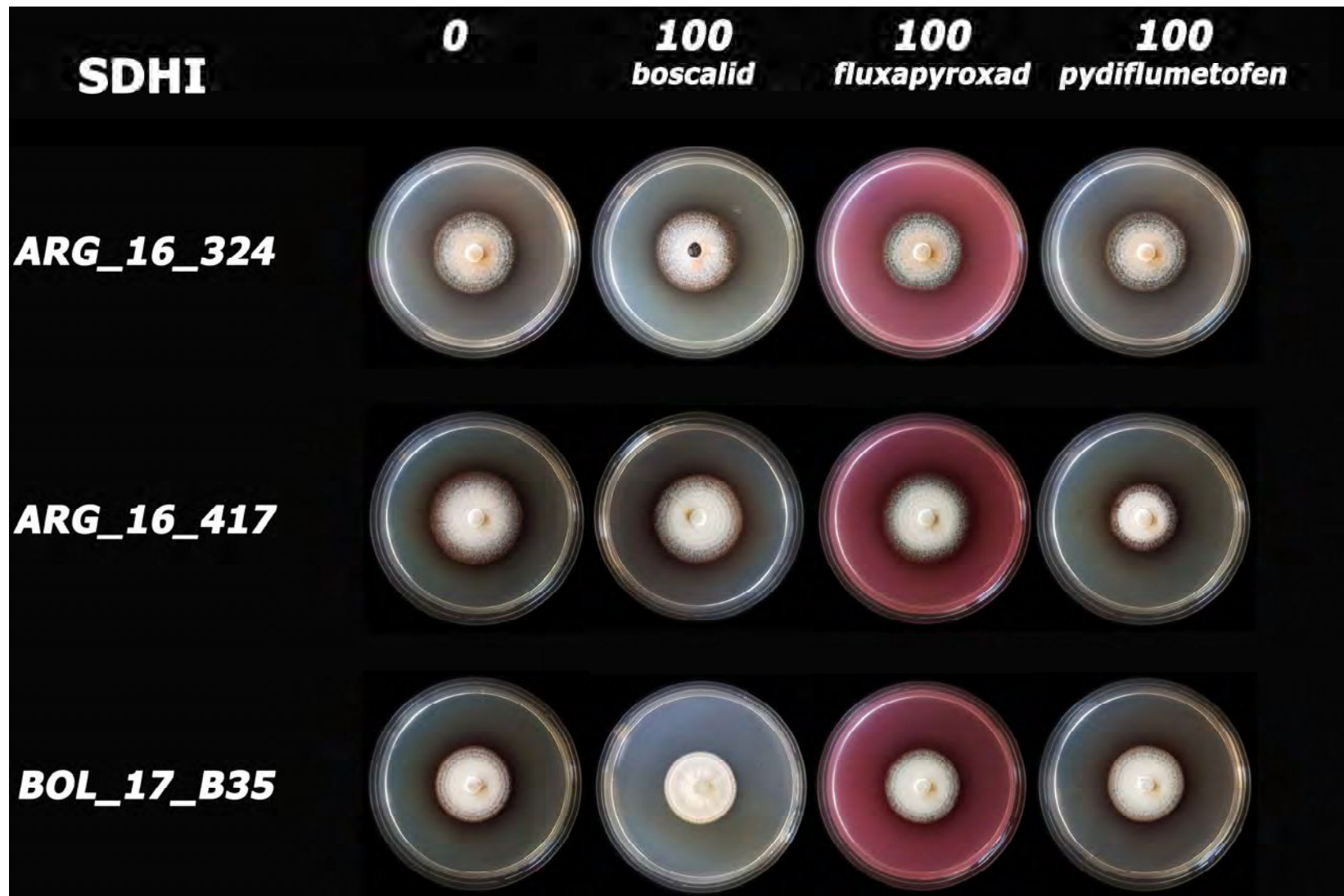


Figura 143. Inhibición del crecimiento micelial a 100 µg mL⁻¹ de boscalid, fluxapyroxad y pydiflumetofen. Se incluyen los aislados ARG_16_324, ARG_16_417 y BOL_17_B35.

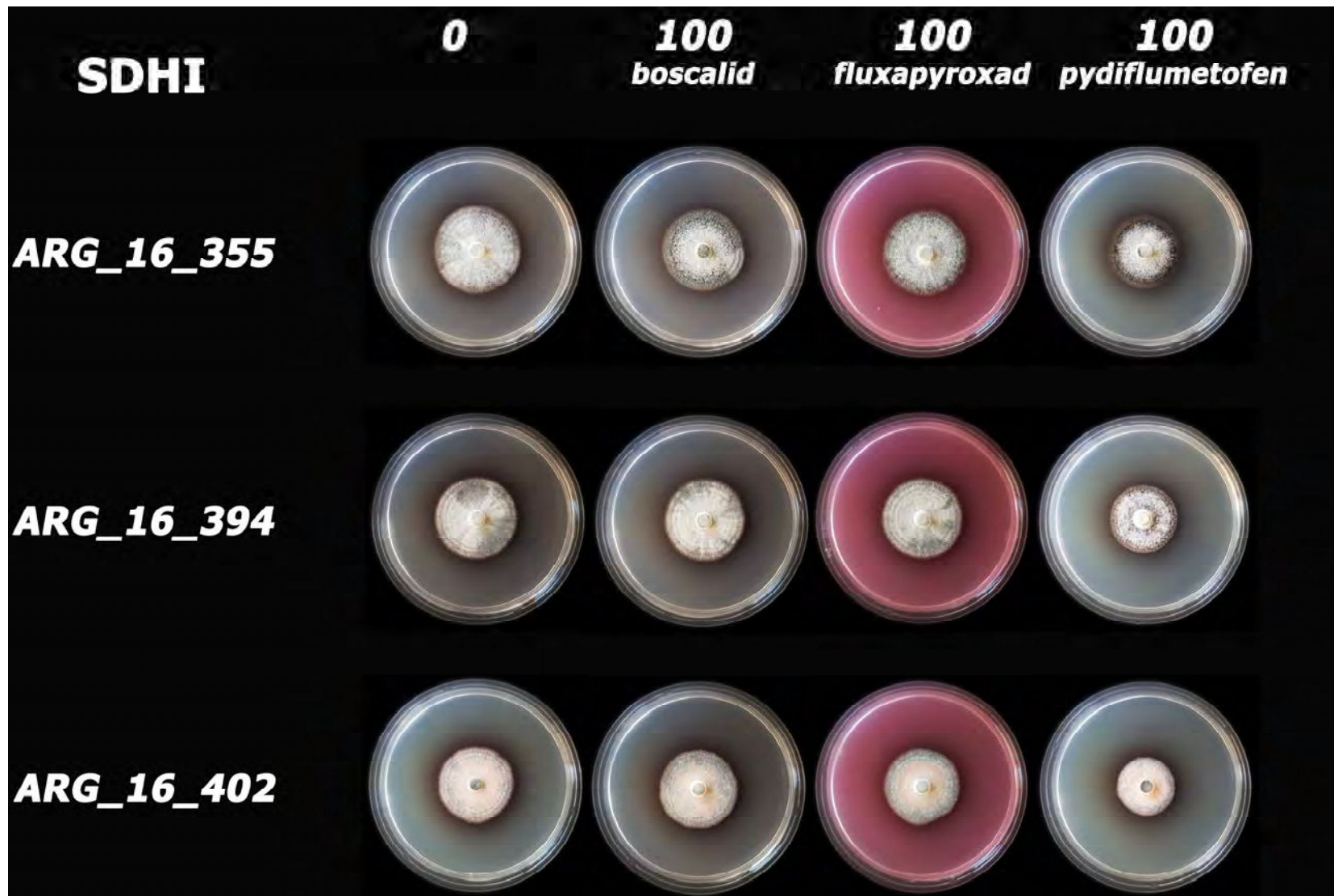


Figura 144. Inhibición del crecimiento micelial a 100 µg mL⁻¹ de boscalid, fluxapyroxad y pydiflumetofen. Se incluyen los aislados ARG_16_355, ARG_16_394 y ARG_16_402.

3.1.5. Mancozeb (Multisitio)

Todos los aislados evaluados tuvieron una baja sensibilidad mancozeb a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, con un rango de inhibición del crecimiento micelial de 19 a 40% para los aislados argentinos. Sin embargo, todos los aislados se inhibieron completamente (100%) a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabla 36). En las Figura 145 se ejemplifican los experimentos *in vitro* de sensibilidad al mancozeb (multisitio), para algunos aislados seleccionados como ejemplo.

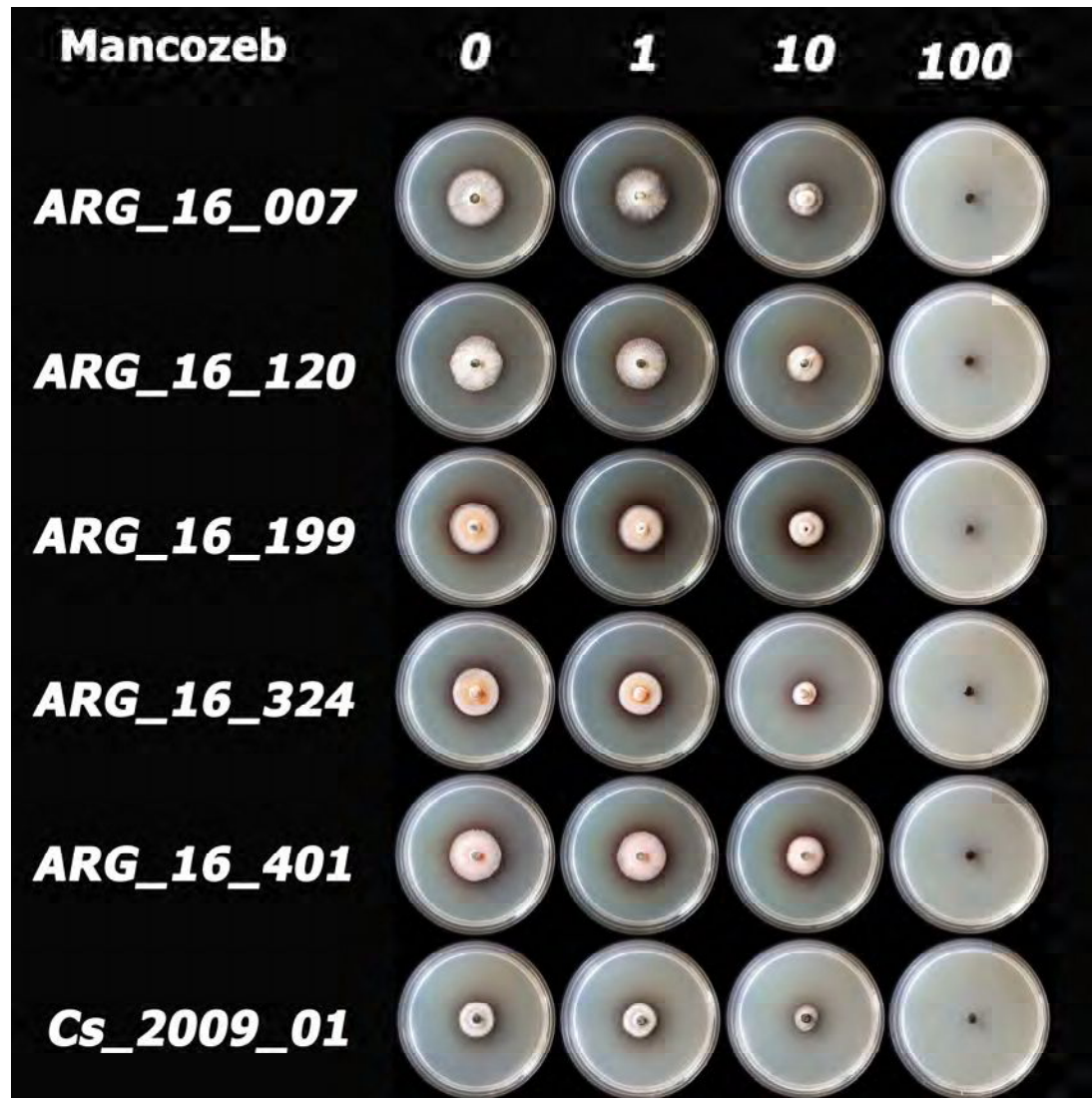


Figura 145. Inhibición del crecimiento micelial a lo largo del gradiente de concentración (0, 1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de mancozeb. El aislado Cs_2009_01 corresponde a *C. sojina* raza 11 (Scandiani et al., 2012).

Por último, los resultados fueron consistentes entre la primera y la segunda ronda de pruebas (la inicial, que estimó los valores de EC₅₀ y la segunda, que utilizó dosis discriminatorias para detectar la pérdida de sensibilidad o resistencia) para todos los modos de acción de los fungicidas e i.a. aquí evaluados. Por otro lado, no se encontró ninguna asociación entre la especie asignada y el origen geográfico y la sensibilidad a diferentes i.a.

Tabla 36. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de aislados de *Cercospora* spp. sensibles o resistentes expuestos a dosis discriminatorias de 1, 10 y 100 µg i.a. mL⁻¹ de diferentes i.a. fungicidas.

| País | Fungicida | Sensibles | | | | Resistentes | | | |
|-----------|-----------------|----------------|--------------|------|-----|----------------|--------------|------|------|
| | | N° aislados | % inhibición | | | N° aislados | % inhibición | | |
| | | | 1 | 10 | 100 | | 1 | 10 | 100 |
| Argentina | difenoconazole | 62 | 81 | 97.5 | 100 | 0 | - | - | - |
| | prothioconazole | 62 | 68.5 | 86.8 | 100 | 1 | - | - | - |
| | epoxiconazole | 62 | 75.6 | 95.6 | 100 | 0 | - | - | - |
| | tebuconazole | 62 | 58.4 | 87.7 | 100 | 1 | - | - | - |
| | cyproconazole | 62 | 53 | 81.9 | 100 | 1 | - | - | - |
| | carbendazim | 33 | 100 | 100 | 100 | 29 | 0 | 0 | 6 |
| | azoxystrobin | 0 | - | - | - | 62 | 9.5 | 25 | 33 |
| | trifloxystrobin | 0 | - | - | - | 62 | 7 | 31 | 38 |
| | pyraclostrobin | 0 | - | - | - | 62 | 10 | 33 | 48 |
| | boscalid | 0 | - | - | - | 62 | 7 | 8.8 | 18.9 |
| | fluxapyroxad | 0 | - | - | - | 62 | 9 | 11 | 12 |
| | pydiflumetofen | 0 | - | - | - | 62 | 10 | 20 | 23 |
| | mancozeb | 0 | - | - | - | 62 | 5.1 | 37.2 | 100 |
| Bolivia | difenoconazole | 3 | 67.7 | 94 | 100 | 0 | | | |
| | prothioconazole | 3 | 49.8 | 72 | 100 | 0 | | | |
| | epoxiconazole | 3 | 74.7 | 85 | 100 | 0 | | | |
| | tebuconazole | 2 | 25.9 | 66.2 | 100 | 1 | 21.5 | 51 | 85 |
| | cyproconazole | 2 | 36 | 64.1 | 100 | 1 | 32 | 38 | 76 |
| | carbendazim | 0 | - | - | - | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | azoxystrobin | 0 | - | - | - | 3 | 3.8 | 25 | 39 |
| | trifloxystrobin | 0 | - | - | - | 3 | 4.6 | 32 | 44 |
| | pyraclostrobin | 0 | - | - | - | 3 | 5.3 | 36 | 49 |
| | boscalid | 0 | - | - | - | 3 | 2 | 5 | 16 |
| | fluxapyroxad | 0 | - | - | - | 3 | 8.2 | 13 | 11 |
| | pydiflumetofen | 0 | - | - | - | 3 | 5 | 19 | 21 |
| | mancozeb | 0 | - | - | - | 3 | 5.3 | 31.5 | 100 |

3.2. Análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los genes *cyp51*, *tub2*, *cytb*, y *sdh*

3.2.1. DMI

Los 62 aislados argentinos fueron sensibles a 5 moléculas DMI probadas en este estudio. A pesar de haber encontrado 103 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, del inglés: *single nucleotide polymorphism*) a lo largo de la secuencia parcial del gen *cyp51* en 16 aislados sensibles a DMI, no se encontraron mutaciones aparentes asociadas con la resistencia a DMI en *Cercospora* u otros hongos, en los aislados sensibles secuenciados (32 argentinos y 2 bolivianos). La mayoría de los SNP encontrados (84%, 87/103), son sustituciones sinónimas y, por tanto, no alteran la secuencia de aminoácidos. No existe una correlación o asociación clara entre los SNP encontrados en este *locus* y las especies de *Cercospora*. El único patrón observado correspondió a 19 SNPs compartidos por 14 aislados de diferentes especies (*C. kikuchii*, *C. nicotianae*, CRC, *C. sp. M*, *C. sp. G*). Sin embargo, dos nuevas mutaciones de un solo nucleótido detectadas en el gen *cyp51* del aislado boliviano resistente a DMI (BOL_2017_035) dieron como resultado las sustituciones de aminoácidos I387M y D440N. La secuencia de aminoácidos completa para la enzima CYP51 y la estructura modelada de CYP51 para el aislado *C. kikuchii* BOL_17_035 se muestran en las Figuras 146 y 147, respectivamente. Según la estructura modelada de CYP51 para el aislado *C. kikuchii* BOL-17_035 resistente a DMI, la mutación I387M está presente en un residuo próximo al grupo hemo protésico (Figura 147b).

ARG_2014_001 -----
 ARG_2016_004 -----
 ARG_2016_005 -----
 ARG_2016_007 -----
 ARG_2016_008 -----
 ARG_2016_015 -----
 ARG_2016_055 -----
ARG_2016_080 MGLLQDLAVAFDTHFGQTATWKLVLASTTFFLLSVVAVNLRQLFRQPKNEPPLVHFVPIIGSTISYIGIDPYKFFFSCKREKYGVDFVTILLGKTKTTCVLTGKGNDFIL 110
 ARG_2016_102 -----
 ARG_2016_120 -----
 ARG_2016_133 -----
 ARG_2016_155 -----
 ARG_2016_169 -----
 ARG_2016_199 -----
 ARG_2016_227 -----
 ARG_2016_239 -----
 ARG_2016_277 -----
 ARG_2016_278 -----
 ARG_2016_283 -----
 ARG_2016_314 -----
 ARG_2016_324 -----
 ARG_2016_340 -----
 ARG_2016_349 -----
 ARG_2016_355 -----
 ARG_2016_385 -----
 ARG_2016_394 -----
 ARG_2016_395 -----
 ARG_2016_396 -----
 ARG_2016_401 -----
 ARG_2016_402 -----
 ARG_2016_417 -----
 ARG_2016_421 -----
 BOL_2017_026 -----
BOL_2017_034 MGLLQDLAVAFDTHFGQAAATWKLVLASTTFFLLSVVAVNLRQLFRQPKNEPPLVHFVPIIGSTISYIGIDPYKFFFSCKREKYGVDFVTILLGKTKTTCVLTGKGNDFIL
BOL_2017_035 MGLLQDLAVAFDTHFGQTATWKLVLASTTFFLLSVVAVNLRQLFRQPKNEPPLVHFVPIIGSTISYIGIDPYKFFFSCKREKYGVDFVTILLGKTKTTCVLTGKGNDFIL 110
ARG_2018_001 MGLLQDLAVAFDTHFGQTATWKLVLASTTFFLLSVVAVNLRQLFRQPKNEPPLVHFVPIIGSTISYIGIDPYKFFFSCKREKYGVDFVTILLGKTKTTCVLTGKGNDFIL 110
 C_beticola_Nikou -----
 C_beticola_2 -----
 C_beticola_3 -----
 Z_tritici -----
 consensus -----

CR1

O

ARG_2014_001 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_004 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_005 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_007 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_008 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_015 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_055 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
ARG_2016_080 NGKLRDVAEEIYSP~~LT~~TPVFGKDVVYDCFN:SKLMEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_102 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_120 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_133 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_155 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_169 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_199 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_227 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_239 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_277 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_278 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_283 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_314 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_324 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_340 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_349 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_355 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_385 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_394 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_395 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_396 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_401 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_402 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_417 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 ARG_2016_421 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 BOL_2017_026 -----MEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
BOL_2017_034 NGKLRDVAEEIYSP~~LT~~TPVFGKDVVYDCFN:SKLMEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
BOL_2017_035 NGKLRDVAEEIYSP~~LT~~TPVFGKDVVYDCFN:SKLMEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
ARG_2018_001 NGKLRDVAEEIYSP~~LT~~TPVFGKDVVYDCFN:SKLMEQKKFVKFGLTSAALQSVVTLTEETROFFSKDNPHKRFASSTGTLDPFAFAELTIYASRSLQGEVRSKFS 220
 C_beticola_Nikou -----
 C_beticola_2 -----
 C_beticola_3 -----
 Z_tritici -----
 consensus -----

CR2

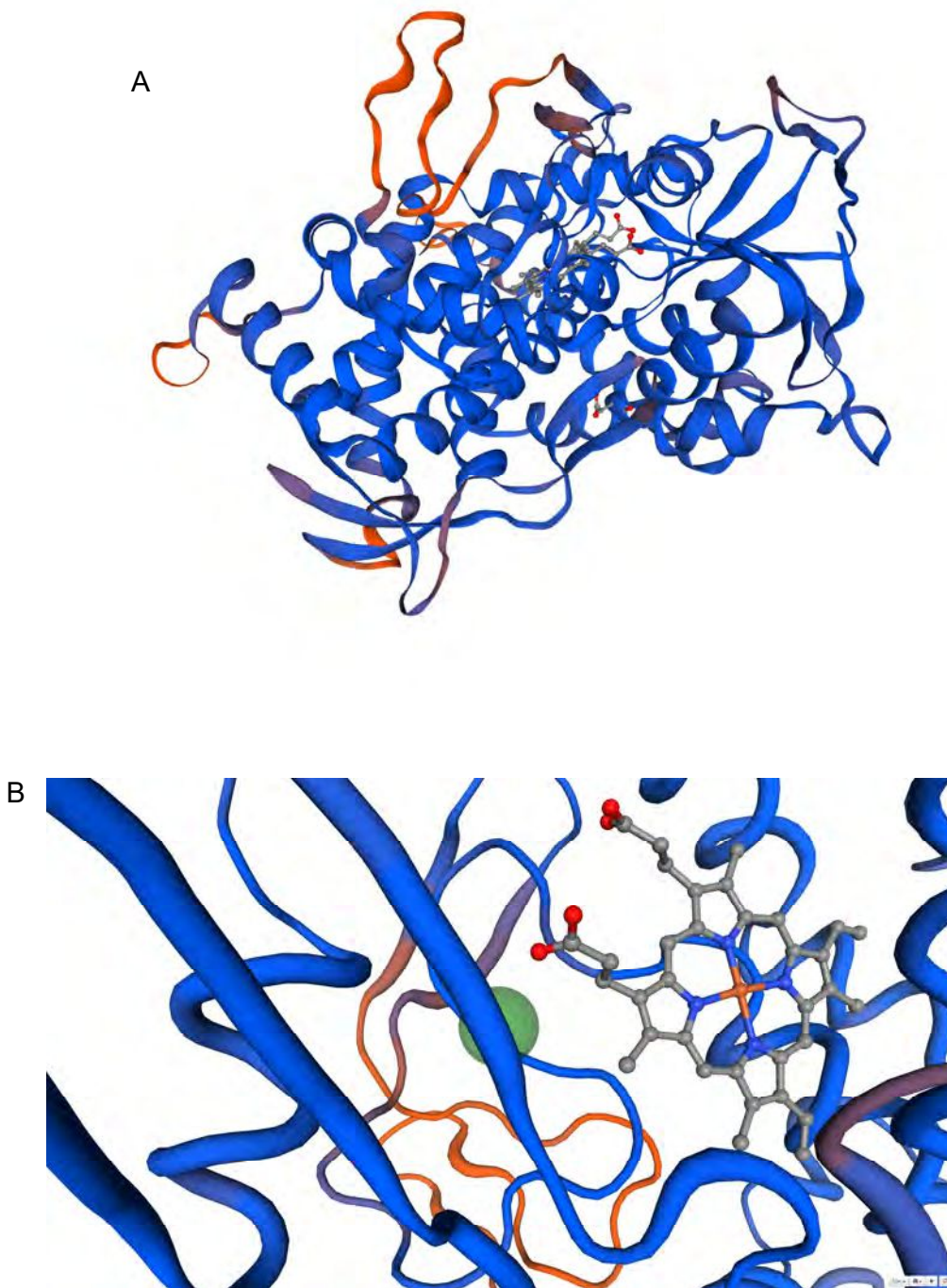
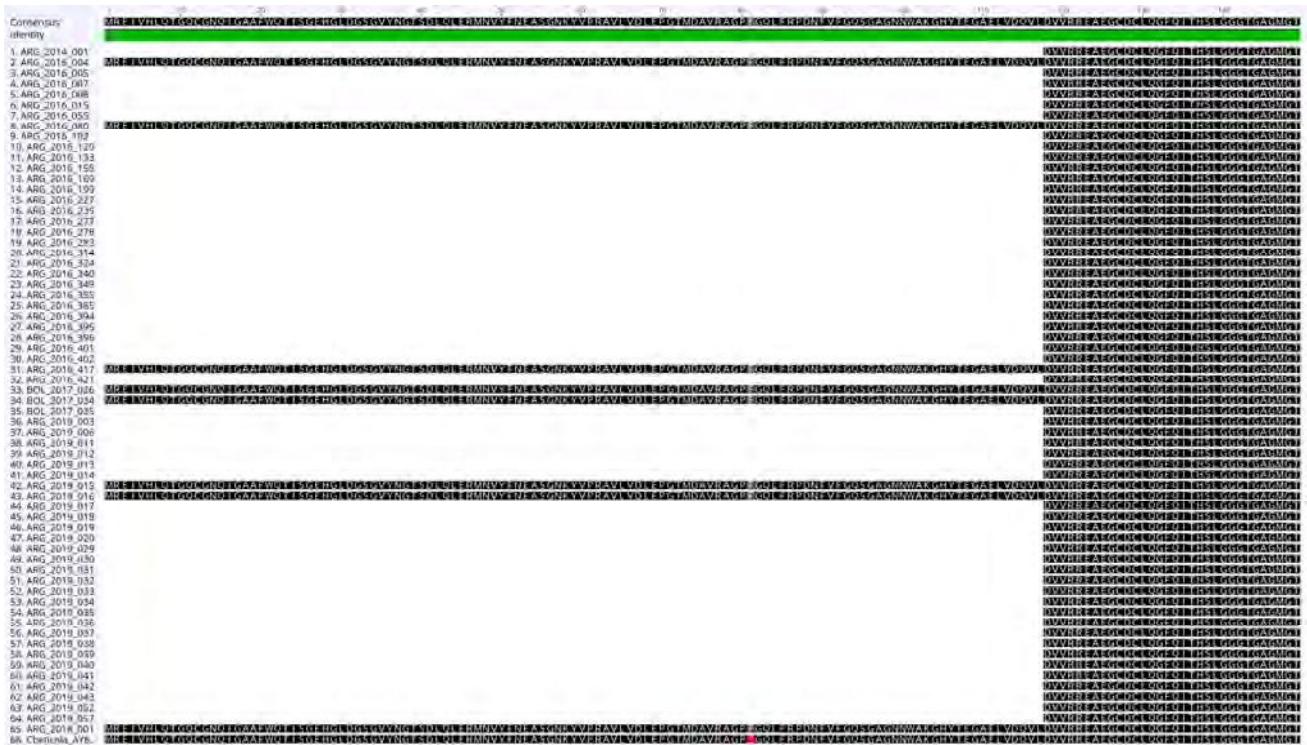


Figura 147. Modelo 3D de la enzima 14-alfa desmetilasa (CYP51) para el aislado BOL_17:035. A: modelo completo de la CYP51. B: acercamiento donde se observa la posición de la mutación I387M, indicada con un círculo verde, próxima al grupo hemo.

3.2.2. MBC

La mutación E198A fue la única mutación detectada en la secuencia parcial del gen *tub2* en 31 de 32 aislados resistentes a carbendazim (Tabla 37). Un aislado resistente (ARG_19_016) no tiene esta mutación ni ninguna otra mutación en todo el gen *tub2*. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial para este aislado fue 0% y 19% a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

La proteína TUB de *C. kikuchii* está codificada por un gen de 1,611 bp con cuatro intrones (Tabla 31). Este gen se encuentra altamente conservado; no se observaron diferencias en las secuencias parciales o completas de exones entre especies o entre ningún aislado. Aunque se encontraron algunos SNPs intrónicos en la secuencia completa de *tub2* para 8 aislados, incluidas las especies de *C. kikuchii*, *C. nicotianae* y CRC, (9, 9, 8 y 4 SNPs en los intrones uno, dos, tres y cuatro, respectivamente), no se observó una asociación clara entre las secuencias de intrones y las especies asignadas. La secuencia completa de aminoácidos de la proteína beta tubulina se muestra en la Figuras 148 y 149.



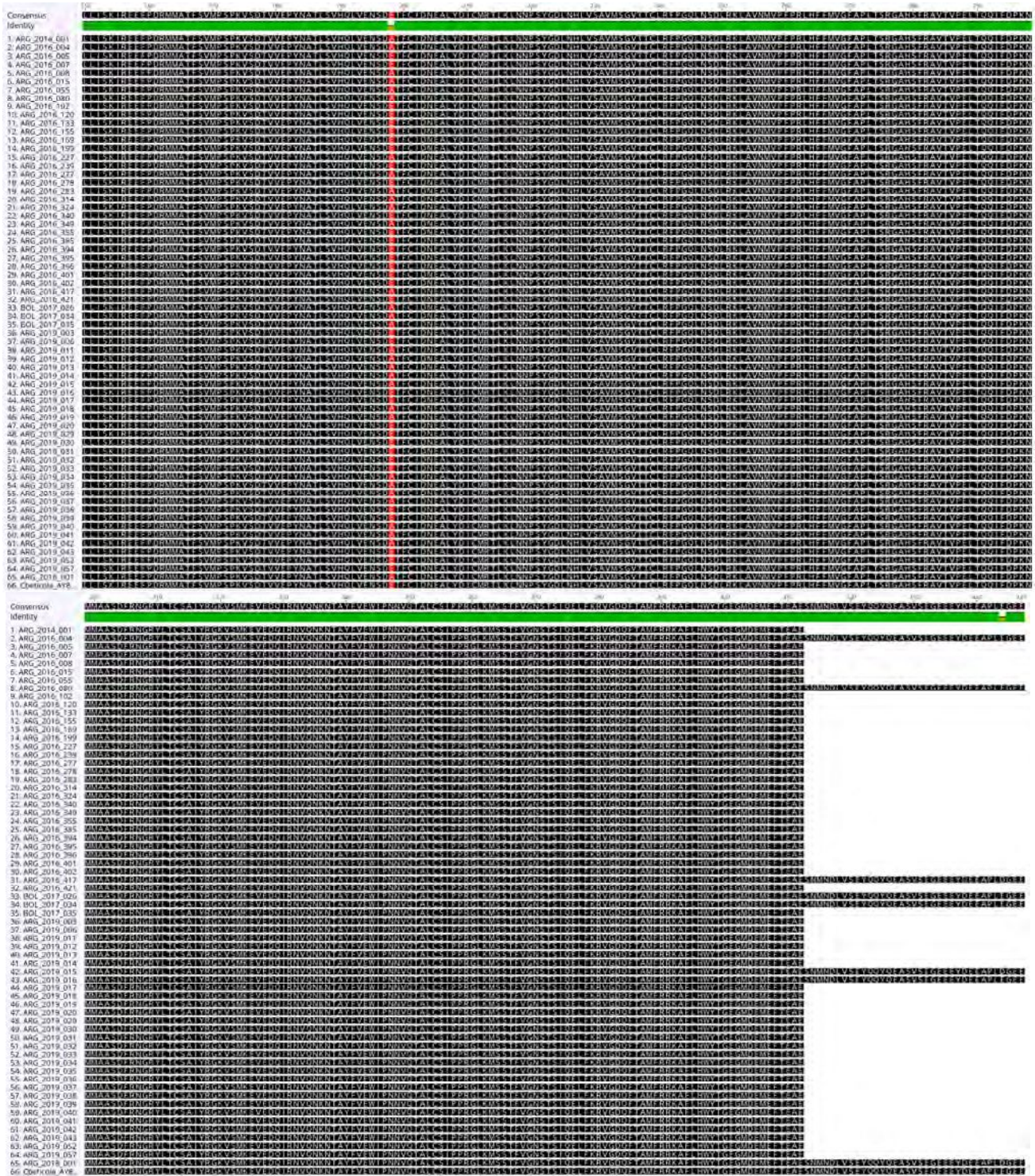


Figura 148. Alineación múltiple de 65 secuencias (57 parciales y 8 completas) de la proteína β -tubulina, codificada por el gen *tub2*. La alineación se realizó utilizando MUSCLE (Edgar, 2004a, b). El color verde de la barra de identidad indica la conservación completa del aminoácido (idéntico). La numeración de los residuos de aminoácidos sigue la traducción del gen *tub2* para el aislado de referencia aislado ARG_18_001 (Sautua et al., 2019b). En la posición 198 se observan los aislados que portan la mutación E198A. Números de acceso: *C. beticola* AY856373.



Figura 149. Detalle de la figura anterior, con alineación múltiple de 65 secuencias del gen *tub2* y de la proteína β -tubulina, donde se detalla la posición 593 de nucleótidos y la posición 198 de aminoácidos en la que se observan los aislados que portan la mutación E198A (GAG \rightarrow GCG), resultante del reemplazo del aminoácido ácido glutámico (Glu) por alanina (Ala) en la posición 198.

3.2.3. *QoI*

Aunque los 65 aislados evaluados en este estudio fueron resistentes a los fungicidas QoI, se detectó la mutación G143A en el gen *cytb* en solo 53 aislados (82%) (Tabla 37). Para descartar errores de secuenciación, los 12 aislados que no poseen la mutación G143A se secuenciaron por separado e independientemente dos veces más (tres veces en total). En una de las tres secuenciaciones, se amplificó y secuenció el gen *cytb* completo. No se encontraron otras mutaciones conocidas asociadas con la resistencia a QoI (F129L y G137R), ni se encontró ninguna otra mutación en la secuencia parcial o completa de este gen en ningún aislado evaluado. La proteína CYTB de *C. kikuchii* está codificada por un gen libre de intrones de 1,161 pb (Tabla 31). Este gen está muy conservado; no se observaron diferencias en la secuencia parcial o completa entre los aislados. La secuencia completa de aminoácidos para la proteína del citocromo b se muestra en la Figuras 150, 151 y 152.

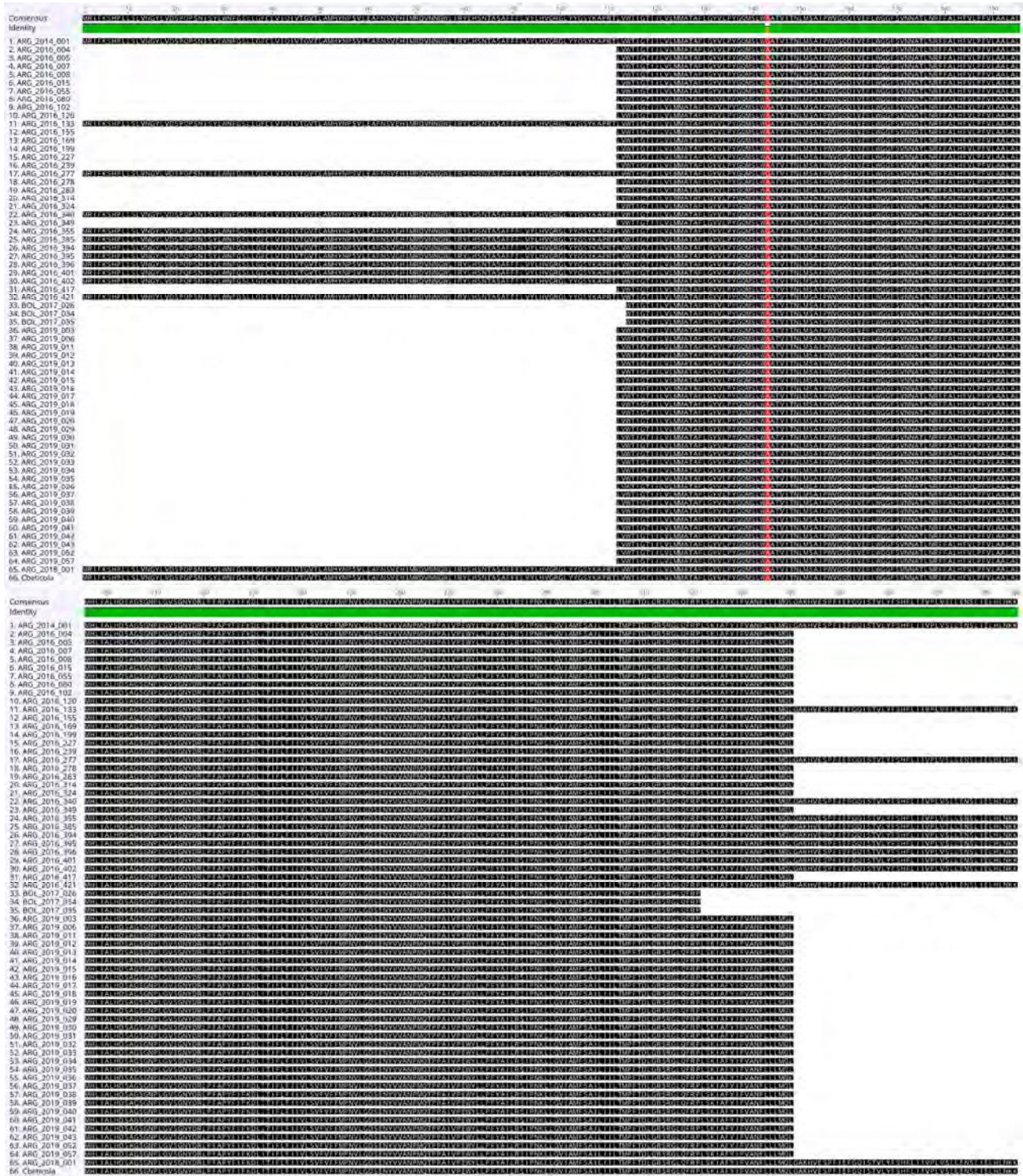


Figura 150. Alineación múltiple de 65 secuencias (52 parciales y 13 completas) de la proteína Citocromo b (subunidad principal del complejo enzimático transmembrana bc1, ubicado en la mitocondria), codificada por el gen *cytb*. Se incluyen aislados argentinos. La alineación se realizó utilizando MUSCLE (Edgar, 2004a, b). El color verde de la barra de identidad indica la conservación completa del aminoácido (idéntico). La numeración de los residuos de aminoácidos sigue la traducción del gen *cytb* para el aislado de referencia aislado ARG_18_001 (Sautua et al., 2019b). En la posición 143 se observan los aislados que portan la mutación G143A. Números de acceso: *C. beticola* JQ360627.

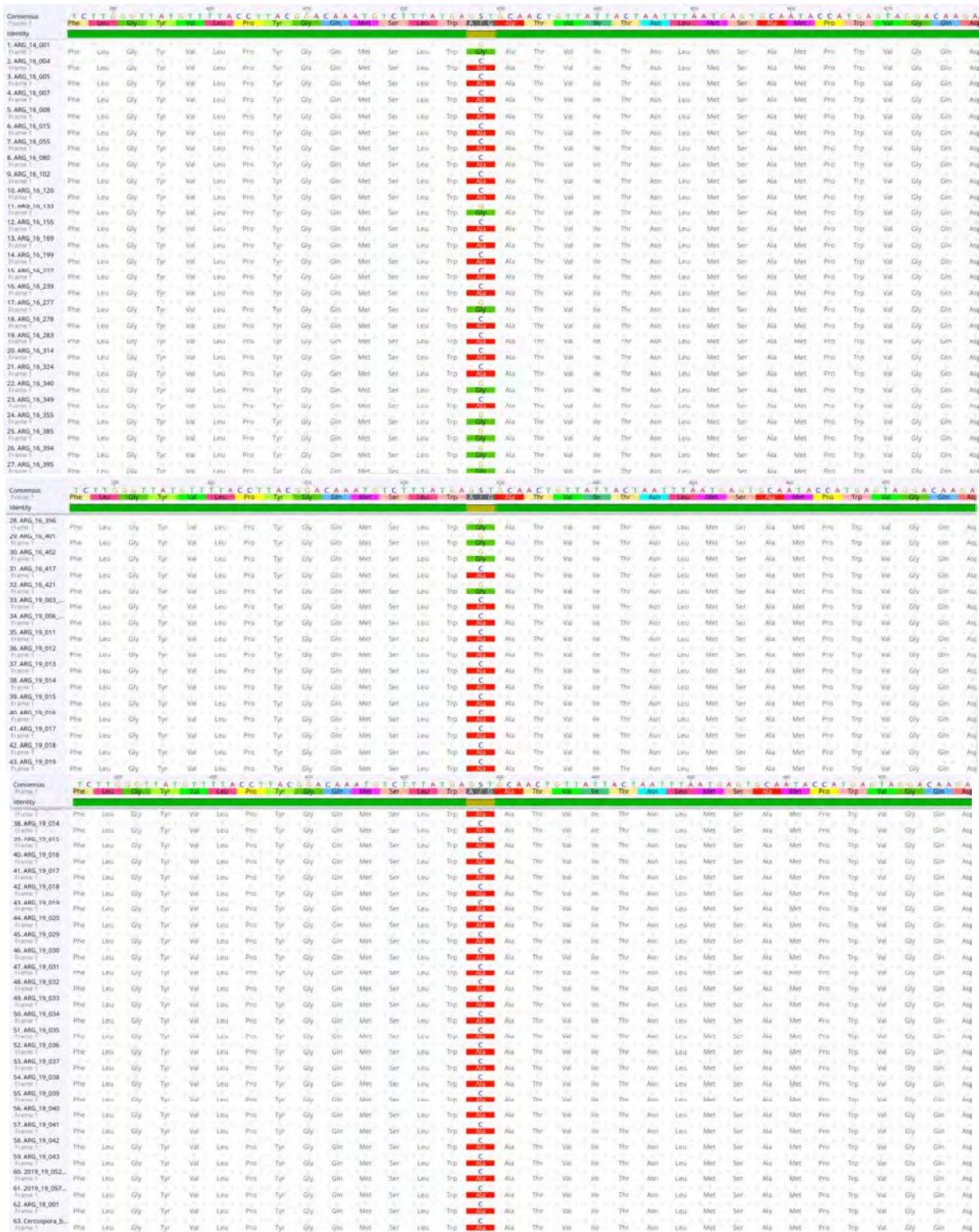


Figura 151. Detalle de la figura anterior, con alineación múltiple de 65 secuencias del gen *cytb* y de la proteína Citocromo b, donde se detalla la posición 428 de nucleótidos y la posición 143 de aminoácidos en la que se observan los aislados que portan la mutación G143A (GGT → GCT), resultante del reemplazo del aminoácido glicina (Gly) por alanina (Ala) en la posición 143.

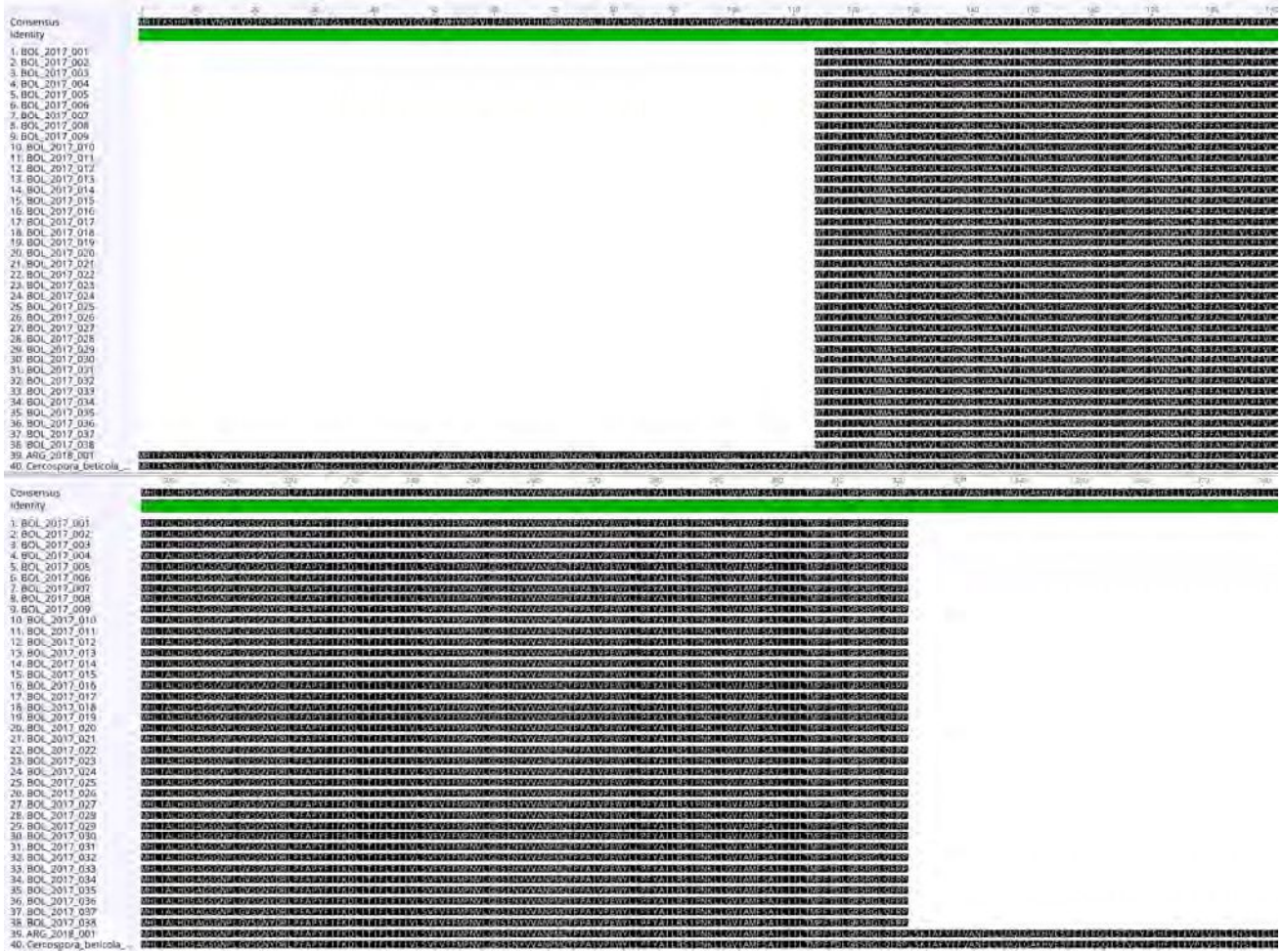


Figura 152. Alineación de secuencia múltiple de 38 secuencias parciales de la proteína Citocromo b (subunidad principal del complejo enzimático transmembrana bc1, ubicado en la mitocondria), codificada por el gen *cytb*. Se incluyen aislados bolivianos. La alineación se realizó utilizando MUSCLE (Edgar, 2004a, b). El color verde de la barra de identidad indica la conservación completa del aminoácido (idéntico). La numeración de los residuos de aminoácidos sigue la traducción del gen *cytb* para el aislado de referencia aislado ARG_18_001 (Sautua et al., 2019b). En la posición 143 se observa que todos los aislados portan la mutación G143A. Números de acceso: *C. beticola* JQ360627.

3.2.4. SDHI

No hubo mutaciones presentes en los genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* secuenciados en un subconjunto de 11 aislados para *sdhB* y *sdhC* y 8 aislados para *sdhD* (Tabla 37). Las proteínas SDHB, SDHC y SDHD de *C. kikuchii* están codificadas por genes de 1015, 881 y 775 pb, respectivamente, con dos intrones cada uno (Tabla 31). Los tres *loci* se encuentran altamente conservados, no se observaron diferencias en la secuencia completa entre especies ni entre ningún aislado. Se encontraron algunos SNPs intrónicos en todas las secuencias *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* de 11 aislados, incluidos *C. kikuchii*, *C. nicotianae*, *C. sp. G* y especies CRC (11 y 8 SNPs en intrones uno y dos, respectivamente, para *sdhB*; 0 y 1 SNP en intrones uno y dos, respectivamente, para *sdhC*; 1 y 0 SNP en intrones uno y dos, respectivamente, para *sdhD*). No se observó una asociación clara entre las secuencias de intrones y las especies asignadas. Las secuencias de aminoácidos completas de las proteínas SDHB, SDHC y SDHD para estos aislados se muestran en las Figuras 153, 154 y 155, respectivamente.

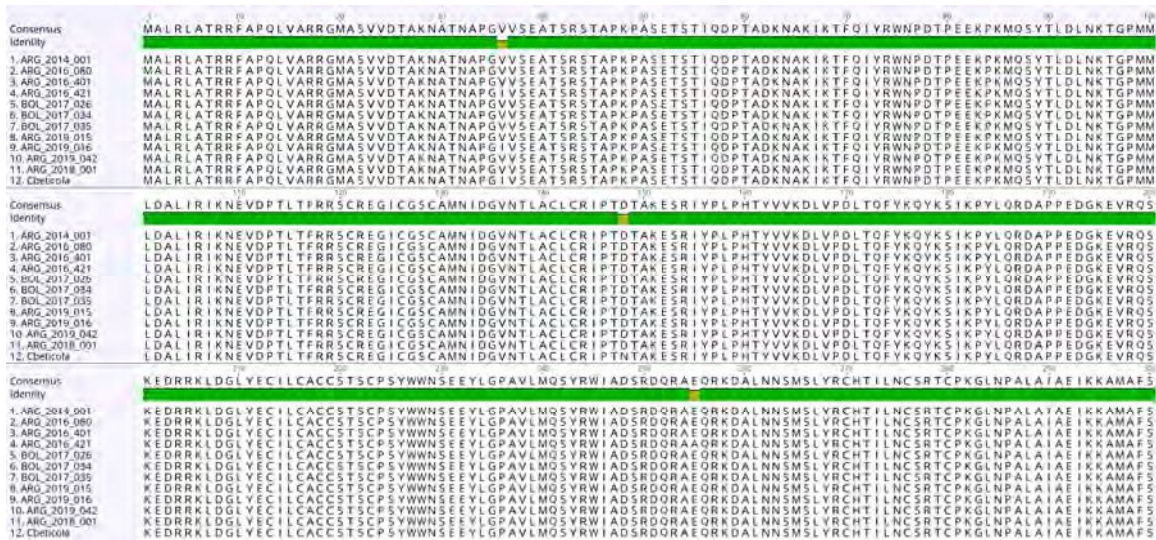


Figura 153. Alineación de secuencia múltiple de 11 secuencias seleccionadas de la proteína subunidad de hierro-azufre de la succinato deshidrogenasa [ubiquinona] o subunidad B del complejo enzimático succinato deshidrogenasa ubicado en la membrana mitocondrial, codificada por el gen *sdhB*. La alineación se realizó utilizando MUSCLE (Edgar, 2004a, b). Las brechas introducidas para maximizar la identidad de secuencia se muestran mediante un guion horizontal. Los asteriscos (*) indican la conservación completa del aminoácido (idéntico). La numeración de los residuos de aminoácidos sigue la traducción del gen *sdhB* para el aislado de referencia aislado ARG_18_001 (Sautua et al., 2019b). Números de acceso: *C. beticola* XM_023603984.

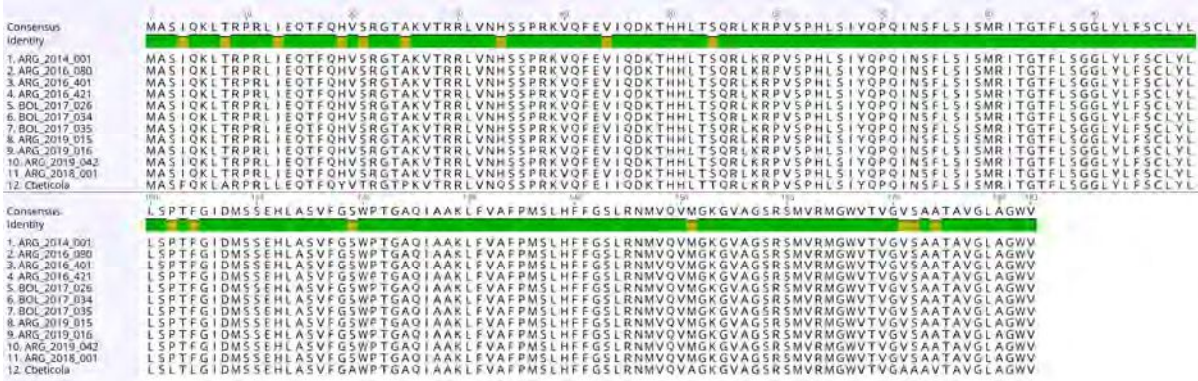


Figura 154. Alineación de secuencia múltiple de 11 secuencias seleccionadas de la proteína subunidad C del complejo enzimático succinato deshidrogenasa ubicado en la membrana mitocondrial, codificada por el gen *sdhC*. La alineación se realizó utilizando MUSCLE (Edgar, 2004a, b). Las brechas introducidas para maximizar la identidad de secuencia se muestran mediante un guion horizontal. Los asteriscos (*) indican la conservación completa del aminoácido (idéntico). La numeración de los residuos de aminoácidos sigue la traducción del gen *sdhC* para el aislado de referencia aislado ARG_18_001 (Sautua et al., 2019b). Números de acceso: *C. beticola* XM_023596614.



Figura 155. Alineación de secuencia múltiple de 8 secuencias seleccionadas de la proteína subunidad D del complejo enzimático succinato deshidrogenasa ubicado en la membrana mitocondrial, codificada por el gen *sdhD*. La alineación se realizó utilizando MUSCLE (Edgar, 2004a, b). Las brechas introducidas para maximizar la identidad de secuencia se muestran mediante un guion horizontal. Los asteriscos (*) indican la conservación completa del aminoácido (idéntico). La numeración de los residuos de aminoácidos sigue la traducción del gen *sdhD* para el aislado de referencia aislado ARG_18_001 (Sautua et al., 2019b). Números de acceso: *C. beticola* XP_023460564.

En la Tabla 37 se resumen las mutaciones encontradas para cada aislado y su relación con el fenotipo para cada modo de acción fungicida.

Tabla 37. Fenotipo (F, sensible o resistente) y genotipo (G, mutaciones asociadas con la resistencia a los fungicidas detectadas en cada gen) de cada aislado probado en este estudio contra los fungicidas DMI (cyproconazole, difenoconazole, epoxiconazole, prothioconazole and tebuconazole), fungicidas MBC (carbendazim), fungicidas QoI (azoxistrobina, trifloxistrobina, piractrostrobin) y fungicidas SDHI (boscalid, pydiflumetofen).

| N° | Aislado | Especie hospedante | Identificación especie | MBC | | QoI | | DMI | | SDHI | | sdhB | | sdhC | | sdhD | |
|----|--------------|--------------------|------------------------|-----|----------------|-----|-------|-----|---|------|----|------|----|------|----|------|----|
| | | | | P | G | P | G | P | G | P | G | G | G | G | G | | |
| 1 | ARG_2014_001 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | - | S | - | R | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | ARG_2016_004 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 3 | ARG_2016_005 | <i>Glycine max</i> | <i>C. sp. M</i> | S | - ^c | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 4 | ARG_2016_007 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 5 | ARG_2016_008 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 6 | ARG_2016_015 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 7 | ARG_2016_055 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 8 | ARG_2016_080 | <i>Glycine max</i> | CRC ^a | R | E198A | R | G143A | S | - | R | - | - | - | - | - | - | - |
| 9 | ARG_2016_102 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 10 | ARG_2016_120 | <i>Glycine max</i> | CRC | S | - | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 11 | ARG_2016_133 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | - | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 12 | ARG_2016_155 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 13 | ARG_2016_169 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 14 | ARG_2016_199 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 15 | ARG_2016_227 | <i>Glycine max</i> | CRC | R | E198A | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 16 | ARG_2016_239 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 17 | ARG_2016_277 | <i>Glycine max</i> | <i>C. nicotianae</i> | R | E198A | R | - | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 18 | ARG_2016_278 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 19 | ARG_2016_283 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| 20 | ARG_2016_314 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|--------------|----------------------------|----------------------|----------|-------|----------|-------|---|-------------------|----------|----|----|----|
| 21 | ARG_2016_324 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns |
| 22 | ARG_2016_340 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | - | S | - | R | ns | ns | ns |
| 23 | ARG_2016_349 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns |
| 24 | ARG_2016_355 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | - | S | - | R | ns | ns | ns |
| 25 | ARG_2016_385 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | - | S | - | R | ns | ns | ns |
| 26 | ARG_2016_394 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | - | S | - | R | ns | ns | ns |
| 27 | ARG_2016_395 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | - | S | - | R | ns | ns | ns |
| 28 | ARG_2016_396 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | - | S | - | R | ns | ns | ns |
| 29 | ARG_2016_401 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | - | S | - | R | - | - | - |
| 30 | ARG_2016_402 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | - | S | - | R | ns | ns | ns |
| 31 | ARG_2016_417 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | ns | ns | ns |
| 32 | ARG_2016_421 | <i>Glycine max</i> | <i>C. sp. G</i> | S | - | R | - | S | - | R | - | - | ns |
| 33 | BOL_2017_026 | <i>Glycine max</i> | CRC | R | E198A | R | G143A | S | - | R | - | - | - |
| 34 | BOL_2017_034 | <i>Glycine max</i> | <i>C. nicotianae</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | - | - | ns |
| 35 | BOL_2017_035 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | R | I387M?/ D440N? | R | - | - | - |
| 36 | ARG_2018_001 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | - | R | - | - | - |
| 37 | ARG_2019_003 | <i>Amaranthus hybridus</i> | <i>C. sp. H</i> | S | - | R | G143A | S | ns ^d | R | ns | ns | ns |
| 38 | ARG_2019_006 | <i>Amaranthus hybridus</i> | <i>C. sp. H</i> | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 39 | ARG_2019_011 | <i>Glycine max</i> | <i>C. kikuchii</i> | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 40 | ARG_2019_012 | <i>Glycine max</i> | nd ^b | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 41 | ARG_2019_013 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 42 | ARG_2019_014 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 43 | ARG_2019_015 | <i>Glycine max</i> | species indet. | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | - | - | - |
| 44 | ARG_2019_016 | <i>Glycine max</i> | nd | R | - | R | G143A | S | ns | R | - | - | ns |
| 45 | ARG_2019_017 | <i>Glycine max</i> | nd | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|--------------|-------------------------|--------------------|---|-------|---|-------|---|----|----------|----|----|----|
| 46 | ARG_2019_018 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 47 | ARG_2019_019 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 48 | ARG_2019_020 | <i>Glycine max</i> | nd | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 49 | ARG_2019_029 | <i>Glycine max</i> | nd | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 50 | ARG_2019_030 | <i>Glycine max</i> | nd | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 51 | ARG_2019_031 | <i>Glycine max</i> | nd | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 52 | ARG_2019_032 | <i>Glycine max</i> | nd | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 53 | ARG_2019_033 | <i>Glycine max</i> | nd | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 54 | ARG_2019_034 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 55 | ARG_2019_035 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 56 | ARG_2019_036 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 57 | ARG_2019_037 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 58 | ARG_2019_038 | <i>Glycine max</i> | nd | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 59 | ARG_2019_039 | <i>Glycine max</i> | nd | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 60 | ARG_2019_040 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 61 | ARG_2019_041 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 62 | ARG_2019_042 | <i>Glycine max</i> | nd | R | E198A | R | G143A | S | ns | R | - | - | - |
| 63 | ARG_2019_043 | <i>Glycine max</i> | nd | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 64 | ARG_2019_52 | <i>Araujia hortorum</i> | <i>C. kikuchii</i> | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |
| 65 | ARG_2019_57 | <i>Araujia hortorum</i> | <i>C. sp. O</i> | S | - | R | G143A | S | ns | R | ns | ns | ns |

“-” = sin detección de mutación, Ns= no secuenciado

3.3. Actividad fungitóxica *in vivo* en hoja destacada

La interacción entre los factores fungicida (difenoconazole, boscalid) * acción (preventiva, curativa) * dosis (0, 10, 40) fue no significativa ($p = 0,9089$) (Tabla 39). No hubo diferencias entre las dosis de 10 y 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pero ambas tuvieron un control de la enfermedad significativo respecto al testigo sin fungicida. No hubo diferencia entre la aplicación preventiva respecto a la curativa. Difenoconazole inhibió los síntomas de la enfermedad 35 veces más que boscalid a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (87.5% vs 2.5% de inhibición, tomando el promedio entre preventivo y curativo), mientras que a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue 5 veces más (100% vs 20% de inhibición, tomando el promedio entre preventivo y curativo) (Tabla 38).

Tabla 38. Porcentaje de inhibición de síntomas foliares en hoja destacada para dos aislados (A1 = ARG_16_080 y A2 = ARG_16_120).

| Fungicida | Acción | Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Porcentaje Inhibición | | |
|----------------|--------|--|-----------------------|-----|-----------|
| | | | A1 | A2 | Media (*) |
| Difenoconazole | prev | 10 | 73 | 100 | 87 |
| | | 40 | 100 | 100 | 100 |
| | cur | 10 | 77 | 100 | 88 |
| | | 40 | 100 | 100 | 100 |
| Boscalid | prev | 10 | 2 | 1 | 2 |
| | | 40 | 29 | 22 | 26 |
| | cur | 10 | 1 | 4 | 3 |
| | | 40 | 10 | 18 | 14 |

Prev = preventivo, aplicado 24hs antes de la inoculación; Cur = curativo, aplicado 24hs después de la inoculación

(*) Ver ANOVA con la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$) en tabla 39.

Tabla 39. Análisis de varianza para inhibición de síntomas foliares en hoja destacada promedio para dos aislados (ARG_16_080 y ARG_16_120).

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| crec* | 200 | 0,59 | 0,58 | 65,47 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|------------------------|----------|-----|---------|--------|---------|
| Modelo. | 13718,10 | 6 | 2286,35 | 47,11 | <0,0001 |
| fungicida | 3733,00 | 1 | 3733,00 | 76,91 | <0,0001 |
| accion | 3,93 | 1 | 3,93 | 0,08 | 0,7764 |
| dosis | 9971,90 | 2 | 4985,95 | 102,73 | <0,0001 |
| fungicida*accion*dosis | 9,28 | 2 | 4,64 | 0,10 | 0,9089 |
| Error | 9367,30 | 193 | 48,54 | | |
| Total | 23085,40 | 199 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,93

Error: 48,5353 gl: 193

| fungicida | Medias | n | E.E. | |
|----------------|--------|-----|------|---|
| difenoconazole | 8,66 | 100 | 0,72 | A |
| boscalid | 17,31 | 100 | 0,72 | B |

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,93

Error: 48,5353 gl: 193

| accion | Medias | n | E.E. | |
|--------|--------|-----|------|---|
| p | 12,84 | 100 | 0,72 | A |
| c | 13,13 | 100 | 0,72 | A |

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,99

Error: 48,5353 gl: 193

| dosis | Medias | n | E.E. | |
|-------|--------|----|------|---|
| 40,00 | 6,39 | 80 | 0,78 | A |
| 10,00 | 7,86 | 80 | 0,78 | A |
| 0,00 | 24,70 | 40 | 1,10 | B |

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

* la variable respuesta analizada fue el crecimiento de lesión (mm).

3.4. Actividad fungitóxica *in vivo* en microparcels a campo

La incidencia del TH en las parcelas tratadas con difenoconazole aplicado tanto en forma preventiva como curativa fue significativamente menor respecto al testigo sin aplicación de fungicida y al boscalid aplicado tanto preventiva como curativamente (Tablas 40 y 41). El boscalid no difirió del testigo, tanto preventiva como curativamente.

Tabla 40. Incidencia foliar de TH en microparcels de campo inoculadas en R5 con *Cercospora* spp. y tratadas con difenoconazole (75 g i.a. ha⁻¹) y boscalid (100 g i.a. ha⁻¹) en forma preventiva y curativa (48hs antes y después de la inoculación, respectivamente).

| Tratamiento | Incendencia TH (%) |
|---------------------------|--------------------|
| Testigo | 93 a |
| Difenoconazole preventivo | 14 b |
| Boscalid preventivo | 82 a |
| Difenoconazole curativo | 12 b |
| Boscalid curativo | 92 a |

(*) Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla 41. Análisis de varianza para incidencia (%) de síntomas de TH a campo, donde T1 = testigo sin aplicación de fungicida, T2 = difenoconazole preventivo, T3 = boscalid preventivo, T4 = difenoconazole curativo, T5 = boscalid curativo.

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|----|----------------|-------------------|------|
| I | 15 | 0,99 | 0,98 | 9,61 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|----------|----|---------|--------|---------|
| Modelo. | 21230,13 | 6 | 3538,36 | 112,69 | <0,0001 |
| T | 21210,00 | 4 | 5302,50 | 168,87 | <0,0001 |
| R | 20,13 | 2 | 10,07 | 0,32 | 0,7346 |
| Error | 251,20 | 8 | 31,40 | | |
| Total | 21481,33 | 14 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=21,43275

Error: 31,4000 gl: 8

| T | Medias | n | E.E. | |
|------|--------|---|------|---|
| 4,00 | 11,33 | 3 | 3,24 | A |
| 2,00 | 13,67 | 3 | 3,24 | A |
| 3,00 | 82,33 | 3 | 3,24 | B |
| 5,00 | 91,67 | 3 | 3,24 | B |
| 1,00 | 92,67 | 3 | 3,24 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$)

4. DISCUSIÓN

El presente estudio representa el primero que se realiza en Argentina para evaluar la sensibilidad de especies de *Cercospora* causantes de TH/MPS a fungicidas de diferente modo de acción. En total, 65 aislados de *Cercospora* evaluados fueron altamente resistentes a los fungicidas QoI, y la mitad de ellos fueron altamente resistentes a carbendazim. Estos resultados son coincidentes con los hallazgos de Price et al. (2015) y de Mello et al. (2021a), quienes encontraron aislados de *Cercospora* resistentes a los fungicidas QoI y MBC en Louisiana, EE. UU. y en varios estados de Brasil, respectivamente. Por otro lado, todos los aislados fueron insensibles a los fungicidas SDHI evaluados. En contraste, a excepción de una cepa de *C. kikuchii* de origen boliviano (BOL_17_035), las otras 64 fueron sensibles a los 5 fungicidas DMI evaluados.

Todas las moléculas QoI evaluadas (azoxistrobina, trifloxistrobina y pyraclastrobina) fueron inactivas contra todos los aislados, lo que indica que poseen una elevada resistencia cruzada. Aunque no fue posible evaluar picoxistrobina, se especula que también sería ineficaz contra los aislados evaluados en este estudio. Esta afirmación se basa en el hecho de que se observó resistencia cruzada en las pruebas de inhibición micelial *in vitro* y en observaciones de campo en la localidad Alejo Ledesma, Córdoba, donde se recuperaron los aislados N° 49 a 56. Estas parcelas de campo se encontraban con elevados niveles de infección de TH al momento del

muestreo, luego de haber sido tratadas dos veces (dos aplicaciones independientes) con una mezcla de picoxistrobina + cyproconazole (aplicada con una dosis de campo de 300 mL ha⁻¹). En Brasil, de Mello et al. (2021a) encontraron coincidentemente resistencia cruzada a este grupo de fungicidas al evaluar azoxystrobina, picoxistrobina y pyraclostrobina.

En general, la resistencia a fungicidas QoI y MBC en los ascomycetes es causada por mutaciones en los genes *cytb* y *tub2*, respectivamente (Gisi et al., 2002; Imazaki et al., 2006b,c; Bolton et al., 2012c; Sierotzki, 2015; Young, 2015). En el presente estudio, se han identificado las mutaciones G143A y E198A en la gran mayoría de los aislados analizados, que son las que se encuentran con más frecuencia confiriendo resistencia a moléculas QoIs y MBC, respectivamente. Al igual que lo sucedido en Luisiana (Price et al., 2015), Bolivia (Sautua et al., 2019a) y Brasil (de Mello et al., 2021a), en Argentina solo la mutación G143A en el gen *cytb* fue hallada responsable de las fallas de control del TH en campos tratados con QoI. No se identificaron otras mutaciones conocidas en este gen en otros patosistemas por conferir resistencia, tales como F129L y G137R (Pasche et al., 2005; Semar et al., 2007; Sierotzki et al., 2007; Young et al., 2010; Vaghefi et al., 2016; Li et al., 2020), en ninguno de los 65 aislados evaluados y secuenciados. La mutación G143A es el mecanismo de resistencia más frecuente a los fungicidas QoI en los patógenos de plantas (Sierotzki, 2015). Esta mutación no está involucrada en la actividad de la enzima CYTB, mientras que la mutación F129L se ubica más cerca al grupo hemo y está potencialmente involucrada en la transferencia de electrones. Estas características mecánicas podrían explicar las diferentes frecuencias de estas mutaciones y su impacto en la sensibilidad. Sin embargo, en el presente trabajo, aunque todos los aislados fueron resistentes a azoxistrobina, trifloxistrobina y pyraclostrobina, solo se detectó la mutación G143A en el gen *cytb* en el 82% de ellos. Por lo tanto, podría ser posible que otros factores, además de la modificación del sitio en el que actúan las estrobilurinas, estén involucrados en la resistencia de las especies de *Cercospora* a los fungicidas QoI. Por ejemplo, Vielba-Fernández et al. (2018) informaron recientemente sobre el papel de la heteroplasmia mitocondrial para el gen *cytb* en *Podosphaera xanthii* como un mecanismo que explica la resistencia a fungicidas QoI. Sus hallazgos sugieren que la proporción de alelos G143 y A143 en un mismo aislado puede determinar el nivel de resistencia a QoIs. Asimismo, Mosquera et al. (2019) encontraron el mismo mecanismo en el oídio del tomate *Leveillula taurica*, lo que sugiere que la resistencia a QoIs en este hongo es probable que sea cuantitativa en lugar de cualitativa. También, Steinfeld et al. (2001, 2002) no encontraron mutaciones en el gen *cytb* ni la activación del gen *aox* de los aislados de *Venturia inaequalis* resistentes a diferentes QoI. Estos autores proponen que en la resistencia de *V. inaequalis* podría estar involucrada una “vía metabólica productora de energía indefinida, aguas arriba del complejo III”. Similarmente, en Brasil se observó solo la mutación G143A en el 97% de los aislados clasificados como resistentes, al menos para dos fungicidas QoI (Mello et al., 2021a).

Del mismo modo, en el presente estudio se ha encontrado la mutación E198A en el gen *tub2* en 31 de 32 (97%) aislados resistentes a carbendazim. No se encontró ninguna otra mutación en la secuencia completa de este gen, lo que sugiere que otros mecanismos pueden conferir resistencia a carbendazim en el único aislado que no posee tal mutación. Estos resultados coinciden con los de Imazaki et al. (2006c) que descubrieron que de un total de 247 aislados de *C. kikuchii* de Japón, 154 (62.3%) eran altamente resistentes al tiofanato metil (MBC) y 12 de estos aislados resistentes secuenciados poseían la mutación E198A. Estos autores observaron que la resistencia a MBC se atribuyó solo a esta mutación en Japón. Adicionalmente, los resultados son coincidentes con los de Mello et al. (2021a), quienes encontraron la mutación E198A en el 71% de los aislados evaluados en Brasil.

Por otro lado, todos los aislados evaluados fueron insensibles a boscalid, fluxapyroxad y pydiflumetofen. Por ejemplo, a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ boscalid, fluxapyroxad y pydiflumetofen tuvieron un porcentaje de inhibición promedio de 9%, 11% y 20% en los 62 aislados de *Cercospora*, respectivamente; mientras que Miyamoto et al. (2010) encontraron aislados de *Corynespora cassiicola* de pepino en Japón altamente resistentes al boscalid con valores de EC_{50} entre 8.9 y $10.7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estos autores encontraron las mutaciones H278Y y H278R en el gen de la subunidad *sdhB* como responsables de la resistencia. Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron mutaciones en la secuencia completa de los genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* de los 11 aislados secuenciados. Además, en Argentina los fungicidas SDHI han comenzado a aplicarse en los cultivos de soja solo recientemente, en los últimos años. Estos fungicidas se usan con baja frecuencia y siempre en mezclas comerciales con fungicidas QoI y/o DMI. Por lo tanto, sería poco probable que se desarrollara un mecanismo de resistencia después de una breve exposición a estos fungicidas. En consecuencia, de acuerdo con estos resultados *in vitro*, se plantea la hipótesis de que las especies de *Cercospora* son naturalmente insensibles a los fungicidas SDHI *in vitro* debido a factores desconocidos. Estos resultados están en línea con los reportados por Nikou et al. (2009), quienes probaron diferentes fungicidas en el crecimiento micelial *in vitro* de *C. beticola* y descubrieron que el boscalid tuvo la fungitoxicidad más baja, con un porcentaje de inhibición promedio del 22% (1.7% - 39%) a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Recientemente, Ishii et al. (2016) informaron que “los aislados de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. cereale* y *C. orbiculare* son insensibles (naturalmente resistentes) a boscalid, fluxapyroxad y fluopiram”. En aquel estudio, los autores secuenciaron los genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* pero no encontraron mutaciones asociadas con la resistencia SDHI. Estos resultados son similares a los presentados aquí para *Cercospora*. En los experimentos *in vivo* realizados en la presente tesis, el boscalid no se diferenció del testigo al evaluar la incidencia del TH, sugiriendo un control bajo a nulo de la enfermedad. Estudios futuros, involucrando pruebas de inhibición *in vitro* e *in vivo* que involucren más cepas de *Cercospora* y diferentes i.a. SDHI deberían probar esta hipótesis. Para confirmar completamente la

insensibilidad de *Cercospora* a SDHI, es importante establecer la relación entre los ensayos de inhibición *in vitro* y la eficacia del control de TH/MPS en ensayos de campo. En segundo lugar, para descartar que otros mecanismos distintos de las mutaciones puntuales en el gen *sdh* puedan conferir resistencia a fungicidas SDHI, los estudios de asociación de genoma completo (**GWAS**, del inglés: *genome-wide association study*; o **WGAS**, *whole genome association study*) podrían ayudar a identificar diferentes mecanismos que podrían generar resistencia a ciertos fungicidas.

A diferencia de los fungicidas QoI, MBC y SDHI, que poseen resistencia cualitativa, los fungicidas DMI tienen resistencia cuantitativa, donde varios mecanismos diferentes (en lugar de solamente mutaciones puntuales individuales en la enzima objeto de control) pueden conducir a un proceso gradual de resistencia (Leroux y Walker, 2011; Price et al., 2015b). La proteína CYP51 de *C. kikuchii* está codificada por un gen libre de intrones de 1,632 pb con homología con otros genes *cyp51* fúngicos, y está presente como una copia única en el genoma de *C. kikuchii* (Sautua et al., 2019b). Si bien se evidenció polimorfismo en las secuencias parciales del gen *cyp51* de los 36 aislados secuenciados, ninguno de los SNPs que están presentes corresponde a ninguna mutación conocida en *Cercospora* u otros géneros de hongos fitopatógenos que confieran resistencia a DMI. Las diferencias en sensibilidad y resistencia a diferentes moléculas de DMI pueden explicarse por su diferente estructura molecular, ya que diferentes átomos de las moléculas de triazol interactúan con diferentes aminoácidos dentro del sitio activo de CYP51. Esta es una de las razones por las cuales los altos niveles de resistencia a todos los DMI no son conferidos por una o una combinación de sustituciones (mutaciones) no sinónimas (Leroux et al., 2007, Mullins et al., 2011). Por lo tanto, si bien las mutaciones en el gen *cyp51* pueden conferir resistencia cruzada, en general este proceso es incompleto en todo el grupo de DMI ya que los cambios de sensibilidad pueden ser específicos del compuesto y pueden variar entre países dependiendo de la molécula DMI principalmente utilizada para el control de enfermedades (Mullins et al., 2011; Stammler et al., 2008). En el presente estudio, el valor de EC₅₀ promedio más bajo correspondió al difenoconazole, cuyo uso solo comenzó a aumentar en las últimas campañas agrícolas y en mezclas con fungicidas SDHI o QoI. En contraste, se han detectado valores de EC₅₀ más altos para el cyproconazole, el fungicida DMI más utilizado en la historia de la producción de soja en Argentina, Bolivia y Brasil (Carmona et al., 2017a). Este hallazgo evidencia una pérdida de sensibilidad de las poblaciones de *Cercospora* de Argentina hacia esta molécula DMI particular. Sin embargo, todos los aislados resultaron sensibles a todas las moléculas de DMI analizadas, excepto un solo aislado boliviano de *C. kikuchii* que es resistente a algunas moléculas de DMI. Para este aislado se identificaron dos nuevas mutaciones en el gen *cyp51*, que confieren las sustituciones de aminoácidos I387M y D440N. Ninguno de estas coincide con las mutaciones que corresponden al polimorfismo de aminoácidos asociado con la resistencia a DMI reportado previamente en *C. beticola* (E169, I330T, P384S, E297K) (Nikou et

al., 2009), *Blumeria graminis* (Y136F, K147Q) (Wyand y Brown, 2005), *Monilinia fructicola* (G461S) (Lichtemberg et al., 2017) o *Z. tritici* (L50S, V136A, Y137F, S188N, A379G, I381V, Y459DEL, G460DEL, N513K, S524T) (Leroux et al., 2007; al. Leroux y Walker, 2011; Mullins et al., 2011; Cools y Fraaije, 2012; McDonald et al.; 2019). Sin embargo, dado que estas dos nuevas mutaciones solo están presentes en el único aislado resistente a DMI, se especula que pueden estar involucradas en la pérdida de sensibilidad y resistencia observada a cyproconazole, tebuconazole y prothioconazole (valores de EC_{50} iguales a 45.8, 10 y 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). De acuerdo con la estructura modelada del CYP51 de este aislado resistente a DMI (*C. kikuchii*, BOL-17_035), la mutación I387M ocurrió en un residuo próximo al grupo de hemo protésico (Figura 147). La resistencia podría atribuirse a esta mutación, pero futuros experimentos y análisis deberían confirmar esta hipótesis, ya que otros mecanismos además de las mutaciones en un solo sitio en el gen *cyp51* también podrían estar involucrados en la resistencia a DMI observada en el aislado boliviano. Esta información podría servir para futuras investigaciones sobre la aparición de resistencia a DMI en aislados de *Cercospora* que causan TH/MPS. Aunque el riesgo de desarrollar resistencia a las DMI puede ser más bajo en comparación con el de las moléculas QoI, SDHI y MBC (He et al., 2019), el proceso de selección hacia la resistencia podría aumentar con el tiempo, como ya ha sucedido en otros patosistemas (Cools et al., 2013).

Por último, los fungicidas multisitio se han utilizado ampliamente en horticultura durante muchos años. Durante los últimos diez años, su uso ha aumentado significativamente en Brasil para el control de la RAS (Carmona et al., 2017a). Aunque el riesgo de desarrollar resistencia al mancozeb se considera bajo (Carmona et al., 2018b), se ha reportado la aparición de varias especies de hongos tolerantes o resistentes en varios cultivos (Aguilar et al., 2014; Moreira et al., 2019; Yang et al., 2019). Por lo tanto, no se puede confirmar si las especies de *Cercospora* aquí evaluadas se consideran resistentes o naturalmente insensibles al mancozeb, ya que en Argentina este fungicida nunca se ha utilizado en el cultivo de soja para el control de ninguna enfermedad. Se necesita realizar más investigación para dilucidar la ineficiencia del control micelial *in vitro* encontrado en el presente estudio.

Los resultados de los experimentos *in vivo* fueron concordantes con los resultados *in vitro*. Difenconazole tuvo un control del TH mayor al 85% mientras que boscalid apenas alcanzó el 15%. En el experimento aquí realizado solamente se ha estimado la intensidad de la enfermedad mediante la incidencia del TH. Por lo tanto, estos resultados deben confirmarse con ensayos a campo en lotes comerciales, aplicando fungicidas que tengan en su formulación solamente un i.a. SDHI, es decir, una molécula SDHI aislada, como en los experimentos aquí realizados, y además de la intensidad de la enfermedad se debe estimar el rendimiento en grano por unidad de área. Para ello hay dos posibles enfoques experimentales: 1) inocular microparcels en el campo, que

tengan la mayor superficie posible, lo cual es muy laborioso y dificultoso de realizar en lotes comerciales de soja; 2) identificar lotes bajo monocultivo que históricamente hayan tenido elevados niveles de intensidad de TH, y que sea la enfermedad predominante, lo cual también es muy dificultoso, ya que en general en cultivos de soja de Argentina predominan más de una EFC a campo.

Finalmente, se necesitan más estudios para dilucidar completamente la base de los diferentes mecanismos moleculares que pueden estar involucrados en la resistencia a los fungicidas QoI, SDHI, MBC y DMI en *Cercospora*.

En la Figura 156 se muestra el resumen de los hallazgos de la presente tesis.

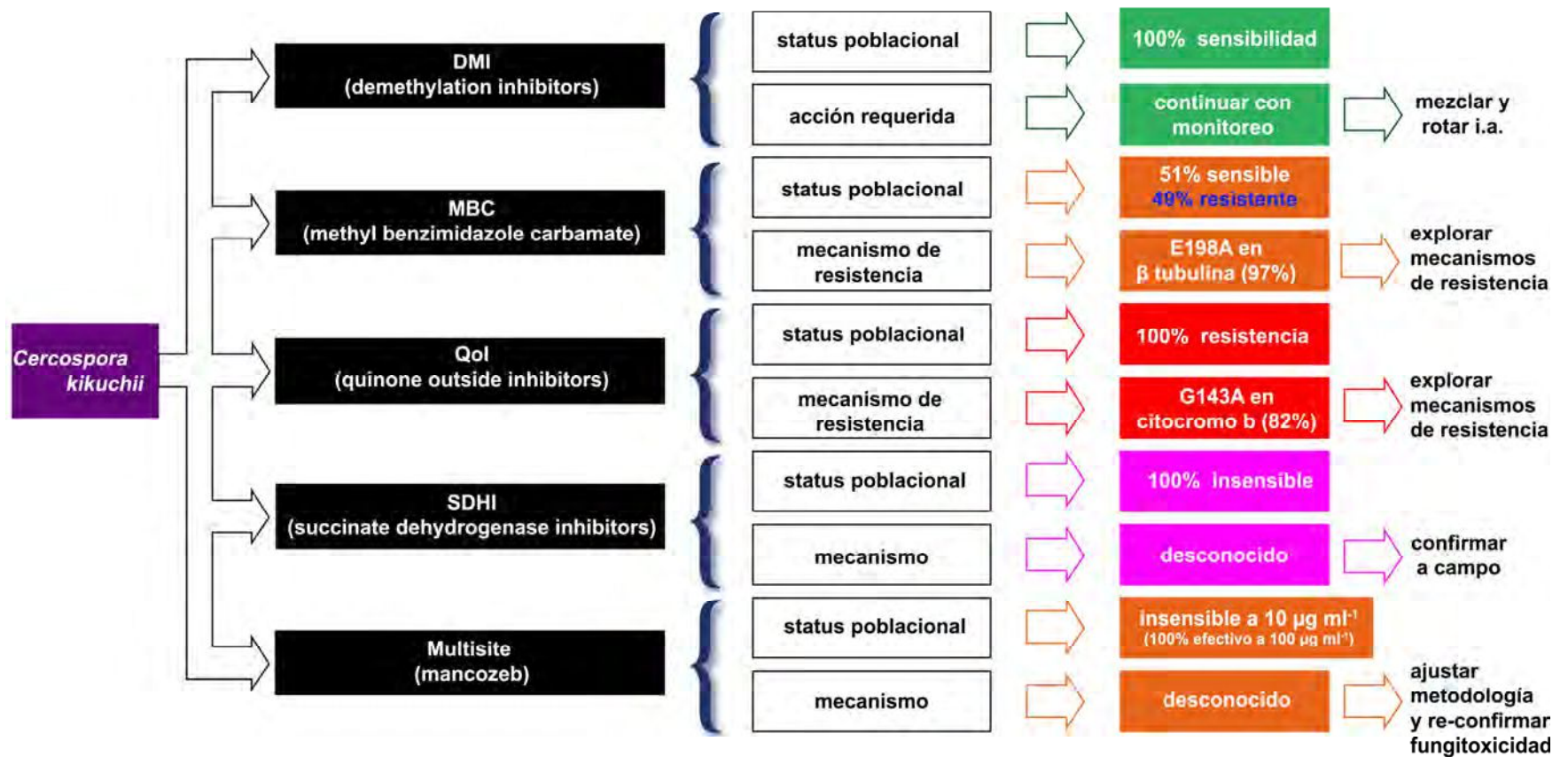


Figura 156. Resumen de los resultados de evaluación de sensibilidad a fungicidas y detección de resistencia a diferentes modos de acción fungicida en la población Argentina de especies de *Cercospora* spp. causantes de tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla, entre 2014 y 2021.

CAPÍTULO 4

1. DISCUSIÓN GENERAL

En Argentina no se habían realizado estudios previos de sensibilidad *in vitro* e *in vivo* de cepas de *Cercospora* spp. causantes de TH/MPS a fungicidas. El presente estudio intenta ser un primer aporte, al caracterizar aislados tanto de semilla como de hoja y evaluar su comportamiento frente a los i.a. de los fungicidas actualmente en uso en la Argentina. El estudio comprendió 62 aislados argentinos y 3 aislados bolivianos. Los aislados argentinos se eligieron al azar de un total de 516 cepas obtenidas del NOA, y de las zonas central y sur de la región pampeana; mientras que los aislados bolivianos se eligieron a partir de un total de 38 cepas de *Cercospora* spp. obtenidas de Santa Cruz. Mientras que los cultivos de soja de Bolivia, a partir de los cuales se realizaron los aislados, recibieron hasta 5 aplicaciones de fungicida por campaña agrícola, las poblaciones argentinas de *Cercospora* spp. recibieron un número significativamente menor. En Bolivia, se producen dos cultivos de soja por año en la misma parcela sin rotación de cultivos. Desde 2003, la frecuencia de aplicaciones de fungicidas para el control de la RAS en campos de soja en Bolivia y Brasil ha ido en aumento, con un número total de aplicaciones que se estiman entre 70 y 104 aplicaciones ininterrumpidas de estrobilurinas por parcela. Si bien estas aplicaciones se dirigen al control de la RAS, los patógenos “no objetivo”, incluidas las especies de *Cercospora* spp. causantes de TH/MPS, también están expuestos a los fungicidas. Luego del muestreo en Santa Cruz en 2017, se confirmó que la población boliviana de *Cercospora* spp. es resistente a QoI (Sautua et al., 2019a). Luego se incluyeron 3 aislados bolivianos en las pruebas de inhibición micelial *in vitro* junto con los aislados argentinos, para hacer comparaciones preliminares, de manera de tener un punto de referencia con una población muy diferente. Por ejemplo, los aislados bolivianos no estuvieron expuestos al difenoconazole, pero sí a la mayoría de los ingredientes activos aquí evaluados. De hecho, los 3 aislados bolivianos fueron sensibles al difenoconazole, pero uno de ellos fue menos sensible o resistente a otros DMI, y todos fueron resistentes a QoI y carbendazim (MBC). Sin embargo, sabiendo que 3 aislados no son representativos de una región, los resultados se indican de manera no concluyentes con respecto a Bolivia. A pesar de que los aislados de Bolivia son cada uno una especie diferente, no se han encontrado diferencias entre las especies de los 65 aislados (incluidos los 3 de Bolivia) con respecto a la sensibilidad a los fungicidas.

Los hallazgos aquí presentados sugieren que la resistencia a fungicidas QoI está generalizada y extendida en las poblaciones argentinas de *Cercospora* causantes de TH/MPS. La evidencia sugiere que todas las poblaciones analizadas parecen estar compuestas por individuos resistentes a las estrobilurinas, y que la mutación G143A está presente en la mayoría de los aislados recolectados de soja y de hospedantes alternativos como *Am. hybridus* y *Ar. hortorum*.

Asimismo, la mitad de los aislados evaluados fueron altamente resistentes a carbendazim, lo que sugiere que la resistencia a este fungicida se está extendiendo en las poblaciones de *Cercospora*. Además, esto confirma que los aislados de la población argentina de *Cercospora* albergan múltiples sustituciones de aminoácidos que confieren resistencia a fungicidas con diferentes modos de acción (resistencia múltiple a fungicidas). En Brasil, recientemente se reportó el mismo hallazgo, donde aproximadamente el 97% de los aislados de *Cercospora* spp. analizados poseían las dos mutaciones, G143A y E198A, en aislados menos sensibles a los fungicidas QoI y MBC, respectivamente (de Mello et al., 2021a). Este hallazgo tiene implicaciones en el manejo antiresistencia cuando se utilizan mezclas de i.a. fungicidas. En segundo lugar, los fungicidas SDHI son un caso especial para el que se propone que las especies de *Cercospora* aquí evaluadas son insensibles (naturalmente resistentes) *in vitro*. Sin embargo, esto debe ser confirmado mediante experimentos a campo con fungicidas cuyo único i.a. sea una molécula SDHI. Además, el mancozeb, como ejemplo de un fungicida multisitio, no exhibió una gran fungitoxicidad en la inhibición del crecimiento micelial. En consecuencia, solo fue posible establecer la sensibilidad de base *in vitro* (*in vitro* baseline sensitivity) para 5 fungicidas DMI y a carbendazim (MBC). Estos resultados, mediante la determinación de la concentración efectiva de base (EC_{50}) de cada i.a., servirán para el monitoreo de la sensibilidad de poblaciones de *Cercospora* spp. y evaluación de las posibles variaciones en el tiempo y generación de eventos de resistencia frente al uso intensivo de fungicidas en los próximos años.

Entre las principales y posibles causas agronómicas que originan la aparición de cepas fúngicas resistentes a los fungicidas se destacan: 1) uso continuo de moléculas con el mismo modo o mecanismo de acción (MoA), 2) utilización de subdosis y/o aplicaciones divididas, 3) cambios en los intervalos de aplicación u aplicaciones tardías, 4) inexistencia de medidas de manejo integrado de enfermedades (MIE), 5) ausencia del uso de diversidad química en las aplicaciones, etc. Especialmente los DMI deben utilizarse con cuidado y precaución en Argentina para prolongar su vida útil cuando se aplican a cultivos de soja. Estos i.a. nunca deben aplicarse solos, sino siempre en mezclas con fungicidas que tengan diferentes modos de acción y rotando las moléculas de DMI en aplicaciones sucesivas.

Según Brent y Hollomon (2007), las buenas prácticas agrícolas para evitar la resistencia de los hongos a fungicidas deberían basarse en:

1) limitar el número de tratamientos con fungicida. Aplicar un fungicida solamente cuando es necesario, de acuerdo con los umbrales de daño económico desarrollados y validados en el país (Carmona et al., 1999; Carmona et al., 2014a,b; Carmona et al., 2015a,b), cuando estuvieran disponibles;

2) evitar el uso erradicante del fungicida. Es decir, se deben realizar las aplicaciones al cultivo en el momento óptimo de acuerdo con la metodología científica disponible y siempre que sea necesario, de manera de lograr aplicaciones lo más preventivas posibles al inicio de las epidemias de TH/MPS (Reis y Carmona, 2013b; van den Berg et al., 2013; Carmona et al., 2014a,b; Carmona et al., 2015a,b);

3) no usar moléculas (i.a.) aisladas. Siempre se deben utilizar mezclas de i.a. fungicida con diferente mecanismo bioquímico de acción (Hollomon et al., 2002; Hobbelen et al., 2011; Carmona et al., 2011b; Hobbelen et al., 2014; van den Bosch et al., 2014b). Los i.a. que componen la mezcla fungicida deben tener alta eficiencia en el control del o de los patógenos que son objetivo de control. El retraso en la aparición de resistencia mediante la mezcla de un fungicida de alto riesgo con un fungicida de bajo riesgo se produce porque el fungicida de bajo riesgo: i) disminuye aún más el tamaño de la población del patógeno sensible y por lo tanto el número de mutantes generados por unidad de tiempo, y ii) disminuye la eficiencia de infección y por lo tanto la probabilidad de supervivencia de la cepa resistente (Hobbelen et al., 2011, 2014; van den Bosch et al., 2014a,b). Las mezclas exponen a una población de patógenos a diferentes MoA, aunque al mismo tiempo en lugar de secuencialmente como ocurre en los tratamientos alternados. Cada componente de una mezcla debe controlar una proporción de los aislados seleccionados por el otro componente, reduciendo de este modo la selección general hacia la resistencia en comparación con el uso de un solo ingrediente activo fungicida. La resistencia cruzada observada hace que los beneficios a largo plazo del uso de combinaciones de triazoles sean improbables, y pone de relieve la necesidad de la inclusión de i.a. con diferente modo o mecanismo bioquímico de acción en los programas de manejo antiresistencia de fungicidas (Dooley et al., 2015);

4) complementar el uso de fungicidas con inductores de la resistencia (ej. quitosanos, fosfitos) (Carmona y Sautua, 2011; Carmona et al., 2011c; Mercado Cárdenas et al., 2011; Ravotti et al., 2012; Elesgaray et al., 2014; Felipini et al., 2015), agentes de control biológico (Agaras et al., 2012; Simonetti et al., 2015), y cuando estén disponibles usar métodos no químicos, como por ejemplo métodos culturales (MIE). Respetar e integrar todas las estrategias de manejo integrado disponibles;

5) complementar el uso de fungicidas con fertilizantes. Estudios preliminares realizados en la Universidad de Louisiana en EE. UU. (Ward et al., 2013; Silva, 2014; Silva et al., 2014a,b; Ward, 2015), probando aplicaciones foliares de micronutrientes, determinaron que el hierro (Fe), el aluminio (Al) y el zinc (Zn) disminuyeron la severidad del TH. Silva (2014) y Silva et al. (2014a,b) probaron dos formulaciones de Fe, probando cuatro dosis distintas, aplicados en R3 y R5. Realizaron análisis de tejido de la hoja de micronutrientes y pruebas qPCR para detectar al patógeno. Observaron una disminución de la severidad de la enfermedad a medida que las concentraciones de Fe superaron las 200 ppm, y los síntomas de la enfermedad fueron

completamente suprimidos por encima del umbral de 280 ppm. En este estudio hubo una correlación positiva entre las concentraciones de Fe en las hojas y el rendimiento; y una correlación negativa entre el rendimiento y la biomasa *Cercospora*, la severidad del tizón y el color púrpura de la hoja. Ward (2015) observó que experiencias *in vitro*, con medios de agar modificado con hierro ($> 250 \text{ mg L}^{-1}$), manganeso ($> 250 \text{ mg L}^{-1}$) y zinc ($> 125 \text{ mg L}^{-1}$) inhibieron el crecimiento de *C. kikuchii*. Coincidentemente, aplicaciones foliares de cobre ($150 - 300 \text{ g ha}^{-1}$), hierro ($200 - 400 \text{ g ha}^{-1}$) y aluminio ($160 - 190 \text{ g ha}^{-1}$), fueron efectivas en eliminar la severidad del TH. Sin embargo, si bien estos resultados son promisorios, investigaciones adicionales son necesarias ya que mientras que muchos tratamientos fueron eficaces en la supresión de la severidad de la enfermedad en el campo y la reducción del crecimiento del hongo *in vitro*, no hubo efectos significativos sobre el rendimiento del cultivo de soja debido al tratamiento. En esta misma línea de investigación, Carvalho et al. (2015), en la Universidad Federal de Lavras, probaron cuatro dosis de manganeso (Mn) (0; 200; 400 y 600 g Mn ha^{-1}) en aplicación foliar en dos estados fenológicos (R1 o R3). Los investigadores evaluaron la incidencia de patógenos en semilla, mediante Blotter test, antes y después de 6 meses de almacenamiento. Estos investigadores verificaron que las aplicaciones foliares de Mn redujeron la incidencia de *C. kikuchii*;

6) Evitar el uso repetitivo de un mismo ingrediente activo. Alternar i.a. (entre y dentro de un mismo mecanismo bioquímico de acción) (Hollomon et al., 2002; Hobbelen et al., 2011; Hobbelen et al., 2014; van den Bosch et al., 2014b);

7) Respetar las dosis de marbete y obedecer las restricciones indicadas en los mismos. Respetar las indicaciones de los marbetes es otro componente importante de la gestión de resistencia a los fungicidas (Gressel, 2011; Reis et al., 2015). Tanto el tiempo de la vida efectiva de una molécula gastado durante la fase de aparición (emergencia), como el tiempo empleado durante la fase de selección se pueden maximizar, para un número fijo de aplicaciones de fungicidas por estación de crecimiento del cultivo, mediante el uso de la dosis más baja que pueda proporcionar un control eficaz de la enfermedad, es decir, la dosis desarrollada experimentalmente durante no menos de tres campañas agrícolas, que es la indicada por el fabricante en el marbete (Hobbelen et al., 2014);

8) Desarrollar un programa de monitoreo de la sensibilidad de las poblaciones de los patógenos principales objeto de control, y de valoración de la fungitoxicidad de los principales moléculas químicas y de determinación de dosis óptima a campo; y

9) Implementar un programa de MIE que incluya: siembra de genotipos resistentes o tolerantes, rotaciones, uso de semilla libre de patógenos, aplicación de prácticas culturales (ej. rotación), utilización de la nutrición como complemento para el manejo de enfermedades, etc. Se debe diseñar un programa de MIE específico para cada situación agronómica particular, ya que las

estrategias de manejo de resistencia a fungicidas sólo son útiles si al mismo tiempo retrasan la selección para la resistencia y dan un control de enfermedades suficiente (Hobbelen et al., 2011). Dichas estrategias deben ser implementadas desde la introducción de un nuevo ingrediente activo fungicida al mercado (Brent y Hollomon, 1998; Ishii 2004, 2006; Hobbelen et al., 2014). Cuando se detecta la resistencia en el campo por primera vez, es probable que la cepa resistente ya está presente con una frecuencia de uno por ciento o más en ciertas áreas. Para llegar a ese punto, la subpoblación resistente del patógeno ha ido evolucionando por aparición (emergencia) y selección durante muchas generaciones. Por lo tanto, gran parte de la posibilidad de retrasar la evolución ya se ha perdido si las estrategias antiresistencia se ponen en marcha en respuesta a la detección de fallas de control de la enfermedad en el campo.

El establecimiento de la sensibilidad de referencia a fungicidas (baseline sensitivity) es necesario y esencial para determinar si se producen cambios de sensibilidad en el futuro. Concomitantemente, el monitoreo de enfermedades y de la sensibilidad a fungicidas es de vital importancia para determinar si la resistencia a los fungicidas es la causa en los casos de falta de control de la enfermedad a campo, y para comprobar si las estrategias de manejo antiresistencia están funcionando correctamente. Este seguimiento de la sensibilidad de las poblaciones de patógenos a los diferentes i.a. fungicidas debe comenzar lo más temprano posible, para obtener los datos de referencia antes de que comience su uso comercial (Brent y Hollomon, 2007). Uno de los desafíos futuros más importantes para el agro argentino será el monitoreo nacional y regional de la sensibilidad y surgimiento de cepas resistentes de patógenos a cada ingrediente activo en los distintos cultivos (Ishii, 2004, 2015; Leadbeater, 2012; Carmona, 2013b; Oliver, 2014; Corio-Costet, 2015; Hollomon, 2015; Barrès et al., 2021). El modo o mecanismo de resistencia puede ser analizado en diferentes etapas tales como molecular, genética, bioquímica, fisiológica, y a nivel de población (Gisi et al., 2000; Rusell, 2003; Ishii, 2006; Hollomon e Ishii, 2015). Actualmente se están desarrollando diferentes “kits de campo” que facilitan la determinación de la resistencia *in situ*, ingresando la información en una base de datos coordinada vía internet, permitiendo el monitoreo oportuno de los perfiles de resistencia específicos para cada ubicación geográfica (Schnabel et al., 2012; Khater et al., 2017; Hu et al., 2019; Radhakrishnan et al., 2019; Mechan et al., 2020; Dodhia et al., 2021). Por lo tanto, el monitoreo en el tiempo de la sensibilidad de patógenos a fungicidas es de máxima importancia para poder maximizar la vida útil y la eficiencia de uso de los i.a. fungicidas actualmente disponibles en el mercado, durante el mayor período de tiempo, garantizando la sustentabilidad económica y ambiental (Ma y Michailides, 2005; Hollomon, 2012). La información aquí presentada podría ser útil para detectar y evaluar los cambios de sensibilidad en las poblaciones de *Cercospora* hacia estos fungicidas durante los años siguientes.

Otro aspecto fundamental, y que representa actualmente un desafío para la Argentina, es la difusión de información, y de actividades de educación y capacitación sobre la generación de resistencia a fungicidas (Brent y Hollomon, 2007). Estas actividades han demostrado ser muy valiosas en otros países para retrasar en el tiempo el surgimiento de fallas de control de enfermedades a campo debido a la generación de resistencia (McGrath, 2012; Hollomon 2012, 2015; Leadbeater, 2012; Corio-Costet, 2015; Hollomon y Ishii, 2015; Schnabel et al., 2015).

2. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos en esta tesis, las principales conclusiones son:

- (1) La morfología de los conidios y cultivos en placa, las pruebas de patogenicidad y la identificación filogenética molecular confirmaron que los agentes causales de los tejidos sintomáticos de TH/MPS muestreados en Argentina corresponden en su gran mayoría (71%) a la especie *C. kikuchii*. También fueron identificadas como agentes causales las especies *C. cf. nicotianae*, especies dentro del complejo *C. richardiicola* y dentro de los linajes *C. sp. M*, *C. sp. G*, *C. sp. H*, *C. sp. O*. En Bolivia, los agentes causales fueron *C. kikuchii*, *C. cf. nicotianae* y el linaje *C. sp. "P"*.
- (2) Por primera vez, se ha confirmado que la especie *C. nicotianae*, presente en Bolivia y Argentina, es un agente causal del TH/PMS.
- (3) Se confirma que las especies *C. flagellaris* y *C. sigesbeckiae*, presentes en EE. UU., no están presentes en Argentina y Bolivia.
- (4) Por primera vez se logró ensamblar un borrador de genoma de *C. kikuchii*.
- (5) Síntomas extremadamente similares a los causados por la Mancha Marrón de la soja, causada por *S. glycines*, podrían estar causados por *Cercospora* spp., pero se necesitan más estudios para corroborar estas observaciones. Como conclusión el diagnóstico a campo por síntomas visuales no es concluyente y se debe incubar el material vegetal en laboratorio para confirmar los agentes causales.
- (6) Por primera vez se confirmó en Argentina que *Am. hybridus* y *Ar. hortorum* son hospedantes alternativos o secundarios de *Cercospora* spp.
- (7) El método fotográfico desarrollado para estimar la intensidad del TH a través de la incidencia foliar demostró ser objetivo, práctico y repetible en la evaluación a campo del TH.
- (8) Todos los aislados evaluados fueron completamente resistentes a las moléculas QoI evaluadas (azoxistrobina, trifloxistrobina y pyraclastrobina), lo que indica que poseen una elevada resistencia cruzada.
- (9) La mutación G143A fue detectada en el gen *cytb* en el 82% de los aislados evaluados, siendo la principal responsable de las fallas de control del TH en campos tratados con QoI en Argentina y Bolivia.

- (10) La mitad (51%) de los aislados evaluados fueron sensibles y la otra mitad (49%) fueron altamente resistentes al carbendazim (MBC).
- (11) La mutación E198A fue detectada en el gen *tub2* en el 97% de los aislados resistentes a carbendazim.
- (12) Todos los aislados evaluados fueron insensibles a las moléculas SDHI evaluadas (boscalid, fluxapyroxad y pydiflumetofen).
- (13) No se detectaron mutaciones en los genes *sdhB*, *sdhC* y *sdhD* secuenciados en un subconjunto de 11 aislados para *sdhB* y *sdhC* y 8 aislados para *sdhD*.
- (14) Todos los aislados evaluados resultaron sensibles a todas las moléculas de DMI analizadas (difenoconazole, epoxiconazole, prothioconazole, tebuconazole and cyproconazole), excepto un solo aislado boliviano de *C. kikuchii* que es resistente a algunas moléculas de DMI.
- (15) Para el aislado boliviano de *C. kikuchii* se identificaron dos posibles nuevas mutaciones en el gen *cyp51*, que confieren las sustituciones de aminoácidos I387M y D440N, y podrían ser las causas de la resistencia.
- (16) Se han detectado valores de EC₅₀ más altos para el cyproconazole en aislados argentinos, lo que evidencia una pérdida de sensibilidad de las poblaciones de *Cercospora* de Argentina hacia esta molécula DMI particular.
- (17) Todos los aislados evaluados fueron insensibles a mancozeb a 1 µg mL⁻¹, poco sensibles a 10 µg mL⁻¹, y su crecimiento micelial fue recién inhibido completamente (100%) a 100 µg mL⁻¹.
- (18) Los valores promedio de EC₅₀ más bajos correspondieron al difenoconazole y al carbendazim, los ingredientes activos con la mayor fungitoxicidad para el crecimiento micelial de las especies de *Cercospora* spp. causantes de TH/MPS en Argentina.

3. CONSIDERACIONES FINALES

En función de los resultados obtenidos en esta tesis, se necesitan realizar más estudios para dilucidar los siguientes aspectos de este patosistema:

- (1) Resolver la filogenia de las especies de *Cercospora* spp. involucradas en la generación del TH/MPS en distintas regiones productoras de soja de Argentina, adicionando *loci* que posean un mayor poder de resolución. Posiblemente otras especies aún no identificadas también sean parte de este complejo críptico de especies agentes causales de esta enfermedad.
- (2) Identificar diferencias genéticas intraespecie (linajes) utilizando en enfoque de tipo Genotyping-by-sequencing (GBS), para abordar el estudio de las poblaciones de *Cercospora* spp. de diferentes regiones de Argentina a un nivel de población a escala fina. Identificar si estos diferentes linajes contribuyen a la diseminación de las variantes que confieren resistencia a fungicidas.
- (3) Esclarecer si los síntomas aquí observados son exclusivos de *Cercospora* spp., o corresponden a *S. glycines*, o a una combinación de ambos patógenos. Se debe estudiar la progresión epidemiológica de ambos patógenos desde estados fenológicos vegetativos, detectando y cuantificando la presencia de los patógenos asociados a los síntomas mediante qPCR o PCR real time.
- (4) Se podría desarrollar un método de captura fotográfica automatizada mediante el uso de drones, lo que aumentaría exponencialmente la capacidad de muestreo diario.
- (5) Estimar el impacto epidemiológico del reservorio del patógeno en hospedantes alternativos, y también su contribución en la variabilidad genética de las distintas especies patógenas que albergan. Para realizar este estudio se debe realizar una colección de aislados cercosporoides a partir de diferentes hospedantes alternativos en diferentes regiones productivas de Argentina.
- (6) Confirmar si la cercosporina es la única toxina sintetizada por especies de *Cercospora* spp., y la única que juega un rol en la patogénesis en soja.
- (7) Estimar el impacto del TH/MPS en la disminución del rendimiento del cultivo de soja y sus componentes (número de granos por unidad de área y peso de los granos) para las condiciones de Argentina (genética de las variedades de soja actualmente sembradas y variables climáticas predominantes).
- (8) Dilucidar completamente la base de diferentes mecanismos moleculares que pueden estar involucrados en la resistencia a fungicidas QoI, MBC y DMI. Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS o WGAS) podrían ayudar a identificar diferentes mecanismos que podrían generar resistencia a ciertos fungicidas.

- (9) Para confirmar completamente la insensibilidad de *Cercospora* a SDHI, se debe confirmar la insensibilidad o resistencia natural a SDHI *in vivo*, incluyendo experimentos a campo. Se debe establecer la relación entre los ensayos de inhibición *in vitro* y la eficacia del control de TH/MPS en ensayos de campo.
- (10) Ajustar una metodología que permita valorar y determinar con más precisión la acción fungitóxica de mancozeb, para confirmar o no la falta de fungitoxicidad de mancozeb en *Cercospora* spp.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agaras B, Scandiani MM, Luque A, Carmona M, Wall L, Valverde C (2012) Biological control of the soybean sudden-death-syndrome fungus *Fusarium tucumaniae* by *Pseudomonas* sp. strain SMMP3. Taller “Interacciones planta-microorganismos”, 2012, Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE), Mar del Plata, Argentina.
- Agarwal PC, Dev U, Singh B, Indra R, Khetarpal RK (2006) Seed-borne fungi detected in consignments of soybean seeds (*Glycine max*) imported into India. OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36: 53–58.
- Agrios G (2005) Plant Pathology, 5th Edition, Academic Press, 952 p.
- Aguilar-Barragan A, García-Torres AE, Odriozola-Casas O, Macedo-Raygoza G, Ogura T, Manzo-Sánchez G, et al. (2014) Chemical management in fungicide sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México. Braz J Microbiol 45:359-364. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014000100051>
- Albarrag AM, Anderson MJ, Howard SJ, Robson GD, Warn PA, Sanglad D, Denning DW (2011) Interrogation of related clinical pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains: G138C, Y431C, and G434C single nucleotide polymorphisms in *cyp51A*, upregulation of *cyp51A*, and integration and activation of transposon *Atf1* in the *cyp51A* promoter. Antimicrob Agents Chemother 55: 5113-5121. <https://doi.org/10.1128/aac.00517-11>
- Albu S, Price P, Doyle V, Schneider R (2014a) A Molecular Phylogenetic Redefinition of *Cercospora kikuchii*. In: Proceedings of the Southern Soybean Disease Workers 41st Annual Meeting, March 5th to 6th, 2014, Pensacola Beach, Florida, p.9.
- Albu S, Price P, Doyle V, Schneider R (2014b) Is *Cercospora kikuchii* the causal agent of Cercospora leaf blight and purple seed stain in the Gulf South? In Proceedings of the 2014 APS-CPS Joint Meeting, August 9-13, 2014, Minneapolis, Minnesota, 361-P. Available online at: https://www.apsnet.org/meetings/Documents/2014_meeting_abstracts/aps2014abP361.htm
- Albu A, Price T, Doyle V, Padgett B, Schneider R (2016a) The G143A mutation is responsible for strobilurin fungicide resistance in *Cercospora* cf. *flagellaris*, a leaf blight and purple seed stain pathogen of Louisiana soybean. Plant Health Progress 17:197-197. <https://doi.org/10.1094/PHP-BR-16-0043>
- Albu S, Schneider RW, Price PP, Doyle VP (2016b) *Cercospora* cf. *flagellaris* and *Cercospora* cf. *sigesbeckiae* Are Associated with Cercospora Leaf Blight and Purple Seed Stain on Soybean in North America. Phytopathology 106: 1376-1385. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0332-R>
- Albu S, Sharma S, Bluhm BH, Price PP, Schneider RW, Doyle VP (2017) Draft Genome Sequence of *Cercospora* cf. *sigesbeckiae*, a Causal Agent of Cercospora Leaf Blight on Soybean. Genome Announcements 5 (36) e00708-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00708-17>.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E (2013) Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. Frontiers in Microbiology 3: 439. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00439>
- Allen TW, Bradley CA, Sisson AJ, et al. (2017) Soybean Yield Loss Estimates Due to Diseases in the United States and Ontario, Canada, from 2010 to 2014. Plant Health Progress 18(1):19-27. <https://doi.org/10.1094/PHP-RS-16-0066>

- Alloatti J, Li S, Chen P, Jaureguy L, Smith SF, Florez-Palacios L, Orazaly M, Rupe J (2015a) Screening a diverse soybean germplasm collection for reaction to purple seed stain caused by *Cercospora kikuchii*. *Plant Disease* 99: 1140-1146. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0878-RE>
- Alloatti J, Chen P, Zeng A, Li S, Rupe J, Florez-Palacios L, Orazaly M (2015b) Inheritance of and molecular markers for purple seed stain resistance in soybean. *Euphytica* 206: 701–709. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1492-2>
- Almeida AMR, Saraiva OF, Farias JRB, Gaudêncio CA, Torres E (2001) Survival of pathogens on soybean debris under no-tillage and conventional tillage systems. *Pesq. agropec. bras.* 36(10): 1231-1238. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001001000003>
- Almeida AMR, Piuga FF, Marin SRR, Binneck E, Sartori F, Costamilan LM, Teixeira MRO, Lopes M (2005) Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of *Cercospora kikuchii*. *Fitopatologia Brasileira* 30: 594-602. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000600005>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amnuaykanjanasin A, Daub M (2009) The ABC transporter ATR1 is necessary for efflux of the toxin cercosporina in the fungus *Cercospora nicotianae*. *Fungal Genetics and Biology* 46: 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.11.007>
- Andrade CCL, de Resende MLV, Moreira SI, et al. (2021) Infection process and defense response of two distinct symptoms of *Cercospora* leaf spot in coffee leaves. *Phytoparasitica*. <https://doi.org/10.1007/s12600-021-00902-2>
- Aranes MR, Dias LP, Costa JH, et al. (2020) Gene expression during development and overexpression after *Cercospora kikuchii* and salicylic acid challenging indicate defensive roles of the soybean toxin. *Plant Cell Reports* 39: 669–682. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02523-1>
- Arduim GS, Reis EM, Barcellos AL (2007) Sensibilidade de *Puccinia triticina* quando tratadas curativamente com diferentes fungicidas *in vivo*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 32, n. Suplemento, p. S194.
- Arie T, Christiansen SK, Yoder OC, Turgeon BG (1997) Efficient cloning of ascomycete mating type genes by PCR amplification of the conserved MAT HMG Box. *Fungal Genetics and Biology* 21(1): 118-30. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.0961>
- Arie T, Kaneko I, Yoshida T, Noguchi M, Nomura Y, Yamaguchi I (2000) Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *MPMI* 13(12): 1330-1339. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.12.1330>
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J and Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195–201. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770>
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology, *Nat. Genet.* 25: 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Assante G, Locci R, Camarda L, Merlini L, Nasini G (1977) Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. *Phytochemistry* 16: 243-247. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86794-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86794-1)

- Atteia A, van Lis R, van Hellemond JJ, Tielens AGM, Martin W, Henze K (2004) Identification of prokaryotic homologues indicates an endosymbiotic origin for the alternative oxidases of mitochondria (AOX) and chloroplasts (PTOX). *Gene* 330: 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.01.015>
- Avenot HF, Michaelidis TJ (2007) Resistance to boscalid fungicide in *Alternaria alternata* isolates from pistachio in California. *Plant Disease* 91: 1345–1350. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1345>
- Avenot HF, Michailides TJ (2010) Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 29: 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.019>
- Avenot HF, Thomas A, Gitaitis RD, Langston DB, Stevenson KL (2012) Molecular characterization of boscalid- and penthiopyrad-resistant isolates of *Didymella bryoniae* and assessment of their sensitivity to fluopyram. *Pest Management Science* 68: 645–651. <https://doi.org/10.1002/ps.2311>
- Avila-Adame C, Koller W (2003) Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *Magnaporthe grisea* to Qo-inhibiting fungicides. *Pest Management Science* 59: 303–309. <https://doi.org/10.1002/ps.638>
- Avozani A (2011) Sensibilidade de *Corynespora cassiicola*, isolados da soja, à fungicidas *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo/UPF. PassoFundo/RS.
- Avozani A, Tonin RB, Reis EM, Camera J, Ranzi C (2014) *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum* isolates to fungicides. *Summa Phytopathologica* 40: 231–247. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1891>
- Backman PA, Rodríguez Cabaña R, Hammond JM, Turlow DL (1979) Cultivar environment and fungicide effects on foliar disease losses in soybean. *Phytopathology* 69: 562–564. doi: 10.1094/Phyto-69-562
- Baird RE, Mullinix BG, Peery AB, Lang ML (1997) Diversity and longevity of the soybean debris mycobiota in a no-tillage system. *Plant Disease* 81: 530–534. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.530>
- Bakhshi M, Arzanlou M, Babai-Ahari A (2011) Uneven distribution of mating type alleles in Iranian populations of *Cercospora beticola*, the causal agent of Cercospora leaf spot disease of sugar beet. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 101–109. <https://www.jstor.org/stable/26458682>
- Bakhshi M, Arzanlou M, Babai-Ahari A, Groenewald JZ, Crous PW (2015a) Is morphology in *Cercospora* a reliable reflection of generic affinity? *Phytotaxa* 213(1): 022–034. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.213.1.2>
- Bakhshi M, Arzanlou M, Babai-Ahari A, Groenewald JZ, Braun U, Crous PW (2015b) Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. *Persoonia*. 34: 65–86. <https://doi.org/10.3767/003158515X685698>
- Bakhshi M, Arzanlou M, Babai-Ahari A, Groenewald JZ, Crous PW (2018) Novel primers improve species delimitation in *Cercospora*, *IMA Fungus* 9: 299–332. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2018.09.02.06>
- Bakhshi M, Zare R, Kermanian M, Ebrahimi L (2021) Cryptic diversity, multi-locus phylogeny and pathogenicity of cercosporoid fungi associated with common bean and cowpea. *Plant Pathol.* Accepted Author Manuscript. <https://doi.org/10.1111/ppa.13403>
- Bandara AY, Weerasooriya DK, Bradley CA, Allen TW, Esker PD (2020) Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. *PLoS ONE* 15(4): e0231141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231141>

- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin V, Nikolenko S, Pham S, Prjibelski A, Pyshkin A, Sirotkin A, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19: 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Banno S, Fukumori F, Ichiishi K, Okada H, Uekusa M, Fujimura M (2008) Genotyping of benzimidazole resistance, dicarboximide resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. *Phytopathology* 98: 397–404. <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-4-0397>
- Barrès B, Corio-Costet M-F, Debieu D, Délye C, Fillinger S, Gauffre B, Grosman J, Hannachi M, de Jerphanion P, le Goff G, Plantamp C, Siegwart M, Walker A-S, Nistrup-Jørgensen L (2021) Monitoring systems for resistance to plant protection products across the world: Between redundancy and complementarity. *Pest Management Science*. Accepted Author Manuscript. <https://doi.org/10.1002/ps.6275>
- Barreto DE, Rossi LA, Traut E, Fortugno C (1981) Hongos patógenos en semillas de soja. IV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Libro de Resúmenes: 27. Fac. de Ciencias Agropecuarias. UNC. Córdoba. 19 al 21 de agosto.
- Barros GG, Torres AM, Rodriguez MI, Chulze SN (2006) Genetic diversity within *Aspergillus flavus* strains isolated from peanut-cropped soils in Argentina. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.04.028>
- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M, Parr-Dobrzanski B (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58: 649–662. <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- Becher R, Wirsal SGR (2012) Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95: 825-840. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4195-9>
- Beck N, Lang B (2010) MFannot, organelle genome annotation webserver. <http://megasun.bch.umontreal.ca/cgi-bin/mfannot/mfannotInterface.pl>
- Beckerman (2013) Detection of Fungicide Resistance. Chapter 11, pp. 281-310. In: *Fungicides – Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*. Mizuho Nita (Eds.), ISBN 978-953-51-1130-6, Publisher: InTech, Chapters published May 15, 2013 under CC BY 3.0 license.
- Bekele B, Hodgetts J, Tomlinson J, Boonham N, Nikolić P, Swarbrick P, Dickinson M (2011) Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and 16SrXII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathology* 60: 345–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02384.x>
- Beltrán-García MJ, Prado FM, Oliveira MS, Ortiz-Mendoza D, Scalfò AC, Pessoa A Jr, Medeiros MH, White JF, Di Mascio P. (2014) Singlet molecular oxygen generation by light-activated DHN-melanin of the fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in black Sigatoka disease of bananas. *PLoS One* 9(3):e91616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091616>
- Bergamin Filho A, Kimati H, Amorin L (1995) *Manual de Fitopatologia*, Ceres, São Paulo, 324 pp.
- Beseli A, Amnuaykanjanasin A, Herrero S, Thomas E, Daub ME (2015a) Membrane transporters in self resistance of *Cercospora nicotianae* to the photoactivated toxin cercosporin. *Current Genetics* 61: 601–620. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0486-x>
- Beseli A, Noar R, Daub ME (2015b) Characterization of *Cercospora nicotianae* hypothetical proteins in cercosporin resistance. *PLoS ONE* 10, e0140676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140676>

- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2006) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution* 22(3): 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Bienert S, Waterhouse A, de Beer TAP, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, Schwede T (2017) The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic Acids Research* 45: D313-D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Birla K, Rivera-Varas V, Secor GA, et al. (2012) Characterization of cytochrome b from European field isolates of *Cercospora beticola* with quinone outside inhibitor resistance. *Eur J Plant Pathol* 134: 475–488. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0029-y>
- Bluhm BH, Dhillon B, Lindquist EA, Kema GHJ, Goodwin SB, Dunkle LD (2008) Analyses of expressed sequence tags from the maize foliar pathogen *Cercospora zea-maydis* identify novel genes expressed during vegetative, infectious and reproductive growth. *BMC Genomics* 9: 523. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-523>
- Bluhm BH, Burnham AM, Dunkle LD (2010) A circadian rhythm regulating hyphal melanization in *Cercospora kikuchii*. *Mycologia* 102(6): 1221–1228. <https://doi.org/10.3852/09-041>
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data, *Bioinformatics*, 30: 2114-20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bolton M, Secor GA, Rivera V, et al. (2012a) Evaluation of the potential for sexual reproduction in field populations of *Cercospora beticola* from USA. *Fungal Biology* 116: 511–521. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.01.011>
- Bolton MD, Rivera-Varas V, Secor GA, Cattanaach AW, Metzger MS (2012b) Identification of the G143A mutation in cytochrome b associated with QoI resistance in *Cercospora beticola* isolates from the Red River Valley. *Plant Health Progress* 14:1. <https://doi.org/10.1094/PHP-2013-0812-02-RS>
- Bolton MD, Birla K, Rivera-Varas V, Rudolph KD, Secor GA (2012c) Characterization of CbCyp51 from field isolates of *Cercospora beticola*. *Phytopathology* 102: 298-305. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-11-0212>
- Bolton MD, Rivera V, Secor G (2013) Identification of the G143A mutation associated with QoI resistance in *Cercospora beticola* field isolates from Michigan, United States. *Pest Management Science* 69: 35-39. <https://doi.org/10.1002/ps.3358>
- Bonacci M, Formento Á, Morales M, Orlando J, Ibáñez F, Sartori M, Etcheverry M, Nesci A, Barros G (2020) *Conyza bonariensis* as an alternative host for *Colletotrichum* species in Argentina. *J Appl Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/jam.14879>
- Borges LL, Ferreira TF, Lana MG, Caliman ID, Bluhm BH, Oliveira LO (2018) Multi-host species of *Cercospora* are associated with *Cercospora* leaf blight and purple seed stain of soybean. *Trop. plant pathol.* 43: 170. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0205-x>
- Boué SM, Carter CH, Ehrlich KC, Cleveland TE (2000) Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6): 2167-2172. <https://doi.org/10.1021/jf9912809>
- Boyette CD, Walker HL (1985) Production and storage of inoculum of *Cercospora kikuchii* for field studies. *Phytopathology*. 75(2): 183-184. doi: 10.1094/Phyto-75-183.
- Bradley CA, Pedersen DK (2011) Baseline sensitivity of *Cercospora zea-maydis* to quinone outside inhibitor fungicides. *Plant Disease* 95: 189-194. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-10-0356>

- Bradley CA, Wood A, Zhang GR, Murray JE, Phillips DV, Ming R (2012) Genetic diversity of *Cercospora sojina* revealed by amplified fragment length polymorphism markers. Canadian Journal of Plant Pathology 34(3): 410–416. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.711775>
- Braun U, Crous P (2016) (2415) Proposal to conserve the name *Cercospora* (Ascomycota: Mycosphaerellaceae) with a conserved type. Taxon 65: 185. <https://doi.org/10.12705/651.18>
- Brent KJ, Hollomon DW, Shaw MW (1990) Predicting the evolution of fungicide resistance. In: Managing Resistance to Agrochemicals, Green, M B, Le Baron, H M, and Moberg, W K eds. American Chemical Society, Washington DC, 303-319.
- Brent KJ, Hollomon DW (1998) Fungicide resistance: the assessment of risk. FRAC Monograph No.2. GCPF (Brussels). 50 pp.
- Brent KJ, Hollomon DW (2007) Fungicide resistance in crop protection, how can it be managed? FRAC Monograph 1, 2nd edition. Fungicide Resistance Action Committee, Brussels, Belgium, 56pp.
- Brent KJ (2012) Historical perspectives of fungicide resistance. In: Fungicide resistance in crop protection: risk and management (ed. T.S. Thind). CAB International. 3-18 pp.
- Brunner PC, Stefansson TS, McDonald VA (2008) Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. Molecular Plant Pathology 9(3): 305-316. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00464.x>
- Brunner PC, Stefansson TS, Fountaine J, Richina V, McDonald VA (2015) A global analysis of CYP51 diversity and azole sensitivity in *Rhynchosporium commune*. Phytopathology 106: 355-361. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-15-0158-R>
- Cai G (2004) *Cercospora* leaf blight of soybean: pathogen vegetative compatibility groups, population structure, and host resistance. PhD Thesis, Louisiana State University. 84 pp.
- Cai G, Schneider RW (2005) Vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*, the causal agent of *Cercospora* leaf blight and purple seed stain in soybean. Phytopathology 95: 257-261. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0257>
- Cai G, Schneider RW (2008) Population structure of *Cercospora kikuchii*, the causal agent of *Cercospora* leaf blight and purple seed stain in soybean. Phytopathology 98: 823-829. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-7-0823>
- Cai GH, Schneider RW, Padgett GB (2009) Assessment of lineages of *Cercospora kikuchii* in Louisiana for aggressiveness and screening soybean cultivars for resistance to *Cercospora* leaf blight. Plant Disease 93: 868-874. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0868>
- Calegari Fagundes W (2018) Molecular Basis of Pathogenesis and Host Determination in *Cercospora sojina*: from Phenotypic to Genotypic Patterns. Theses and Dissertations. 3020. <https://scholarworks.uark.edu/etd/3020>
- Callahan T, Rose M, Meade M, Ehrenshaft M, Upchurch R (1999) CFP, the putative cercosporin transporter of *Cercospora kikuchii*, is required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean. Molecular Plant-Microbe Interactions 12: 901-910. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.10.901>
- Gilchrist CLM, Chooi YH (2021) clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. Bioinformatics: btab007. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab007>
- Cañas-Gutierrez GP, Angaria-Velasquez MJ, Restrepo-Florez JM, Rodriguez P, Moreno CX, Arango R (2009) Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. Pest Management Science 65: 892-899. <https://doi.org/10.1002/ps.1770>

- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Carmona M (2005) Aplicar eficientemente los agroquímicos: Monitoreo, Fungicidas y su relación con la calidad de aplicación y éxito de control. Una visión desde la Fitopatología. Ed.: INTA, Mario Bogliani y Jorge Hilbert editores. pp 31-42. 2005 ISBN 987521172-9
- Carmona M, Scandiani M, Luque A (2009) Severe outbreaks of soybean frog-eye leaf spot in the pampean region, Argentina. *Plant Disease* 93: 966. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0966B>
- Carmona M, Sautua F (2011) Impacto de la nutrición y de fosfitos en el manejo de enfermedades en cultivos extensivos de la región pampeana. *Actas Simposio Fertilizar 2011*. Ed IPNI (International Plant Nutrition Institute) y Fertilizar 73- 82 pp. 18 y 19 de Mayo, Rosario, Argentina.
- Carmona M, Cortese P, Moschini R, Pioli R, Ferrazzini M, Reis E (1999) Economical damage Threshold for fungicide control of leaf blotch and tan spot of wheat in Argentina. Expuesto y publicado en el XIVth International Plant Protection Congress Jerusalem, Israel, Julio 25-30, 1999. p.119.
- Carmona M, Gally M, Grijalba P, Sugía V, Jaeggi E (2004) Frequency and chemical control of causal pathogens of soybean late season diseases in the Pampeana Region. *Proceedings of 7th World Soybean Research Conference, 4th International Soybean Processing and Utilization Conference, Congresso Mundial de Soja*. EMBRAPA, Foz de Iguazú, Brasil. p. 159.
- Carmona M (2006) Importancia de las enfermedades de fin de ciclo: su relación con la ecofisiología y el uso estratégico de fungicidas en el cultivo de soja. *Proceedings of Mercosoja 2006, 3er Congreso de Soja del Mercosur, Workshop de enfermedades de hoja, tallo y raíz*. ACSOJA, Rosario. pp. 321-324.
- Carmona M, Gally M, López S (2007) Studies on Asian Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Argentina. *Fitopatología* 42: 25-30.
- Carmona M (2009) Desarrollo, evolución y futuro de los fungicidas. Impactos en la agricultura. In: Ricci D. (Ed.). *La Argentina 2050 La revolución tecnológica del agro. Hacia el desarrollo integral de nuestra sociedad*. pp. 382-398. Buenos Aires, Argentina.
- Carmona M, Moschini R, Cazenave G, Sautua F (2010) Relación entre la precipitación registrada en estados reproductivos de la soja y la severidad de *Septoria glycines* y *Cercospora kikuchii*. *Tropical Plant Pathology* 35 (2):71-78. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000200001>
- Carmona M, Sautua F, Perelman S, Reis EM, Gally M (2011a) Relationship between Late Soybean Diseases Complex and rain in determining grain yield responses to fungicide applications. *Journal of Phytopathology* 159: 687–693. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01828.x>
- Carmona M, Abello A, Sautua F (2011b) Resistencia de los hongos a los fungicidas. *Guía de Productos Fitosanitarios*. Pp.161-168, CASAFE.
- Carmona MA, Sautua FJ, Gally M (2011c) Phosphites as a complementary tool of integrated management of soybean late season diseases. XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Bento Gonçalves RS, Publicado en *Tropical Plant Pathology* 36 (Suplemento), p. 387 agosto 2011.
- Carmona M, Gally M, Sautua F, Abello A, Lopez P (2011d) Uso de mezclas de azoxistrobina y triazoles para controlar enfermedades de fin de ciclo de la soja. *Summa Phytopathologica* 37(2): 134-139. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052011000200009>
- Carmona M, Reis EM (2012) Capítulo 7. Sistema de pontuação auxiliar na tomada de decisão para a aplicação de fungicidas visando ao controle das doenças de final de ciclo. 333-347 pp. En: *Doenças da soja* 436 p. E. M. Reis & R. T. Casa Editores. ISBN 978-85-7912-082-4. (In português).

- Carmona M (2013a) Sistema de pontuação auxiliar indicador do momento para aplicação de fungicidas no controle de doenças de final de ciclo na cultura da soja. Capítulo 11: 133-157 Indicadores do momento para aplicação de fungicidas visando ao controle de doenças nas culturas da soja e do trigo 2da edição revista e ampliada Compilador, E. M. Reis Ed Berther Passo Fundo, Brasil, 246 pp.
- Carmona M (2013b) Desafíos de la Fitopatología en los cultivos extensivos Actas del 9º Encuentro Nacional de Monitoreo de Plagas, Enfermedades y Malezas, Córdoba, 18 y 19 de junio de 2013.
- Carmona M, Sautua F, Gally M, Mónaco C, Reis EM (2013) Sustainable chemical control of frog-eye leaf spot and late season diseases of soybean in Argentina. Abstract 228: World Soybean Research Conference 2013. Durban, South Africa. February 17-22, 2013.
- Carmona M (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 doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina. 180 p.
- Carmona M, Sautua F, Reis EM (2014a) Control de enfermedades fúngicas del trigo mediante fungicidas. En: Enfermedades del trigo: avances científicos en la Argentina. Cordo C., Sisterna M. (Eds.). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), La Plata, Bs. As. pp. 349-370. ISBN 9789871985357.
- Carmona M, Viotti G, Sautua F (2014b) Tizón del maíz. Cuantificación de daños y propuesta de umbral. Pag. 260 Libro de Resúmenes del 3er Congreso Argentino de Fitopatología, 4,5, y 6 de junio de 2014, San Miguel de Tucumán.
- Carmona MA, Gally ME, Grijalba PE, Sautua F (2015a) Evolución de las enfermedades de la soja en la Argentina: pasado, y presente: aportes de la FAUBA al manejo integrado. Agronomía y Ambiente: Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires 35(1): 37-52.
- Carmona MA, Sautua FJ, Perelman S, Gally M, Reis EM (2015b) Development and validation of a fungicide scoring system for management of late season soybean diseases in Argentina. Crop Protection 70: 83 -91. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.019>
- Carmona MA, Sautua F, Reis EM (2015c) Soybean frog-eye leaf spot (*Cercospora sojina*): First economic damage threshold determination. Advances in Applied Agricultural Science, 3:01-07.
- Carmona M, Sautua F (2017) La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos. Agronomía & Ambiente, Revista de la Facultad de Agronomía UBA 37(1): 1-19. ISSN 2344-9039. Disponible en: <http://agronomiayambiente.agro.uba.ar/index.php/AyA/article/view/60>
- Carmona M, Reis E, Sautua F (2017a) Sustainable Chemical Control of Main Soybean Diseases in South America. pp. 203-245. In: Fletcher B (Ed.), Soybeans: Cultivation, Nutritional Properties and Effects on Health. 1st Edition. Nova Science Publishers Inc. ISBN: 978-1-63485-842-7
- Carmona MA, Sautua FJ, Scandiani M, Luque AG (2017b) Estudio de sensibilidad in vitro de *Cercospora kikuchii* al carbendazim. XIII Encuentro Nacional de Monitoreo. -28 y 29 de junio de 2017.
- Carmona M, Sautua F, Scandiani M, Bello R, Lopez V and Luque A (2017c) *In vitro* sensitivity assessment for late season soybean pathogens to fungicide mixtures. Australasian Plant Dis Notes 12:20. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0244-7>
- Carmona M, Sautua F, Pérez-Hernández O, Mandolesi JI (2018a) AgroDecisor EFC: First Android™ app decision support tool for timing fungicide applications for management of late-season soybean diseases. Computers and Electronics in Agriculture 144: 310-313. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.11.028>

- Carmona M, Reis E, Sautua F (2018b) Fungal resistance to fungicides in field crops: a growing problem worldwide. pp. 149-193. In: Rodríguez PP, Soto-Gómez D, de la Calle I (Eds), Fungicides: perspectives, resistance management and risk. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA. ISBN: 978-1-53613-307-3
- Carvalho ER, Oliveira JA, Reis LV, Ferreira TF (2015) Foliar manganese in the health and lignin quality of conventional and glyphosate-resistant soybean seeds. *Revista Ciência Agronômica* 46(1): 135-143. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902015000100016>
- Carter HE, Fraaije BA, West JS, Kelly SL, Mehl A, Shaw MW, Cools HJ (2014) Alterations in the predicted regulatory and coding regions of the sterol 14 α -demethylase gene (*cyp51*) confer decreased azole sensitivity in the oilseed rape pathogen *Pyrenopeziza brassicae*. *Molecular Plant Pathology* 15: 513-522. <https://doi.org/10.1111/mpp.12106>
- Casadevall A, Pirofski L (1999) Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infection and Immunity* 67: 3703–3713. doi: <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.3703-3713.1999>
- Casadevall A (2007) Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biology Reviews* 21(4): 130-132. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.007>
- Castroagudín VL, Ceresini PC, de Oliveira SC, Reges JTA, Maciel JLN, Bonato ALV, Dorigan AF, McDonald BA (2015) Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathology* 105: 284-294. <https://doi.org/10.1094/PHTO-06-14-0184-R>
- Chai A, Zhao Q, Shi Y, Xie X, Li L, Li B (2021) First Report of Cercospora Leaf Spot Caused by *Cercospora cf. flagellaris* on Okra in China. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2155-PDN>
- Chamilos G, Kontoyiannis DP (2005) Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updates* 8: 344-358. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2006.01.001>
- Chan PP, Lowe TM (2019) tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences, *Methods in Molecular Biology* 1962: 1-14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_1
- Chand R, Pal C, Singh V, Kumar M, Singh VK, Chowdappa P (2015) Draft genome sequence of *Cercospora canescens* a leaf spot causing pathogen. *Current Science* 109: 2103–2110. doi: 10.18520/cs/v109/i11/2103-2110
- Chanda AK, Ward NA, Robertson CL, Chen Z-Y, Schneider RW (2014) Development of a quantitative polymerase chain reaction detection protocol for *Cercospora kikuchii* in soybean leaves and its use for documenting latent infection as affected by fungicide applications. *Phytopathology* 104: 1118-1124. <https://doi.org/10.1094/PHTO-07-13-0200-R>
- Chang HX, Domier LL, Radwan O, Yendrek CR, Hudson ME, Hartman GL (2016) Identification of multiple phytotoxins produced by *Fusarium virguliforme* including a phytotoxic effector (FvNIS1) associated with sudden death syndrome foliar symptoms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29(2): 96-108. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-15-0219-R>
- Chen MD, Lyda SD, Halliwell RS (1979a) Infection of soybeans with conidia of *Cercospora Kikuchii*. *Mycologia* 71:6, 1158-1165. <https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12021127>
- Chen MD, Lyda SD, Halliwell RS (1979b) Environmental factors influencing growth and sporulation of *Cercospora kikuchii*. *Mycologia* 71:1150-1157. <https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12021126>

- Chen H, Lee M-H, Daub ME, Chung K-R (2007) Molecular analysis of the cercosporin biosynthetic gene cluster in *Cercospora nicotianae*. *Molecular Microbiology* 64(3): 755–770. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05689.x>
- Chen CJ, Yu JJ, Bi CW, Zhang YN, Xu JQ, Wang JX, Zhou MG (2009) Mutations in a β -tubulin confer resistance of *Gibberella zeae* to benzimidazole fungicides. *Phytopathology* 99(12): 1403–1411. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-12-1403>
- Chong P, Arango R, Stergiopoulos I (2011) Analysis of azole fungicide resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Black Sigatoka. In: Dehne HW, Deising HB, Gisi U, Kuck KH, Russel PE, Lyr H (eds) *Modern fungicides and antifungal compounds VI: proceedings of the 16th international Reinhardtsbrunn symposium on modern fungicides and antifungal compounds, 2011*. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, pp 217–222.
- Choquer M, Dekkers KL, Chen H-Q, Cao L, Ueng PP, Daub ME, Chung K-R (2005) The CTB1 Gene Encoding a Fungal Polyketide Synthase Is Required for Cercosporin Biosynthesis and Fungal Virulence of *Cercospora nicotianae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(5): 468–476. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0468>
- Chung K-R, Jenks AE, Ehrenshaft M, Daub ME (1999) A novel gene required for cercosporin toxin resistance in the fungus, *Cercospora nicotianae*. *Molecular and General Genetics* 262: 382–389. <https://doi.org/10.1007/PL00008642>
- Chung KR, Daub ME, Kuchler K, Schaller C (2003) The CRG1 gene required for resistance to the singlet oxygen-generating cercosporin toxin in *Cercospora nicotianae* encodes a putative fungal transcription factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302: 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00171-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00171-2)
- Chupp C (1954) *A monograph of the fungus genus Cercospora*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA. 667 p.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21(Suppl 18): 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>
- Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos P, Cottyn B (2016) Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathology* 65: 792–806. <https://doi.org/10.1111/ppa.12461>
- Cools HJ, Ishii H, Hollomon DW (2002) Cloning and sequence analysis of the eburicol 14 α -demethylase encoding gene (CYP51) from the Japanese fungus *Venturia nashicola*. *Journal of Phytopathology* 150: 444–450. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00776.x>
- Cools HJ, Fraaije BA (2012) Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implication for future control. *Pest Management Science* 69: 150–155. <https://doi.org/10.1002/ps.3348>
- Cools HJ, Bayon C, Atkins S, Lucas JA, Fraaije BA (2012) Over-expression of the sterol 14 α -demethylase gene (*Mgcyp51*) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Management Science* 68: 1034–1040. <https://doi.org/10.1002/ps.3263>
- Cools HJ, Hawkins NJ, Fraaije BA (2013) Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathol* 62: 36–42. <https://doi.org/10.1111/ppa.12128>
- Cooley RN, Caten CE (1993) Molecular analysis of the *Septoria nodorum* β -tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. *Mol Gen Genet* 237: 58–64.

- Corio-Costet MF (2015) Monitoring Resistance in Obligate Pathogens by Bioassays Relating to Field Use: Grapevine Powdery and Downy Mildews. In: Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management. Hideo Ishii, Derek William Hollomon (Eds.). Springer Japan, ISBN: 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online). pp. 251-279.
- Costa de Novaes MI, Doyle V, Robertson CL, Thomas-Sharma S (2020) Alternative mechanisms of self-resistance to cercosporin in *Cercospora* leaf blight pathogens on soybean. APS Annual Meeting, August 10-14, Virtual Meeting.
- Couretot L (2011) Efecto de las rotaciones de cultivos y labranzas sobre la severidad y altura de la planta con síntomas de Mancha Marrón de la Soja, causada por *Septoria glycines* Hemmi. M Sc Tesis Fac. Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina 59 pp.
- Crous PW, Aptroot A, Kang J-C, Braun U, Wingfield MJ (2000) The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Studies in Mycology* 45: 107-121.
- Crous PW, Braun U (2003) *Mycosphaerella* and its anamorphs. 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. *CBS Biodiversity Series* 1: 1–571.
- Crous PW, Groenewald JZ, Risede JM and Hywel-Jones NL (2004) *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology* 50: 415–430. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.213>
- Crous PW, Groenewald JZ (2005) Hosts, species and genotypes: Opinions versus data. *Australasian Plant Pathology* 34: 463-470. <https://doi.org/10.1071/AP05082>
- D'Arcy CJ, Eastburn DM, Schumann GL (2001) Illustrated glossary of plant pathology. The Plant Health Instructor doi: 10.1094/phi-1-2001-0219-01
- Daub M (1982) Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. *Phytopathology* 72: 370-373. doi: 10.1094/Phyto-72-370
- Daub ME, Hangarter RP (1983) Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin. *Plant Physiology* 73: 855–857. <https://doi.org/10.1104/pp.73.3.855>
- Daub ME (1987) The fungal photosensitizer cercosporin and its role in plant disease. *ACS Symposium Series* 339: 271-280. doi: 10.1021/bk-1987-0339.ch020
- Daub ME, Hangarter RP (1983) Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin. *Plant Physiology* 73: 855-857. <https://doi.org/10.1104/pp.73.3.855>
- Daub ME, Ehrenshaft M (2000) The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. *Annual Review of Phytopathology* 38: 461-490. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.461>
- Daub ME, Herrero Herrero S, Chung K-R (2005) Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiology Letters* 252: 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.033>
- Daub ME, Chung K-R (2007) Cercosporin: A photoactivated toxin in plant disease. Online. APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeature/2007-0207
- Daub ME, Chung KR (2009) Photoactivated Perylenequinone Toxins in Plant Pathogenesis. In: Deising H.B. (eds) *Plant Relationships. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*, vol 5. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-87407-2_11

- Davidse LC, Flach W (1977) Differential binding of benzimidazole-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Cell Biology* 72: 174–193. <https://doi.org/10.1083/jcb.72.1.174>
- Davidse LC (1986) Benzimidazole fungicides: mechanisms of action and biological impact. *Annual Review of Phytopathology* 24:43–65. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.000355>
- Davidse LC (1988) Benzimidazole fungicides: mechanisms of action and resistance. In: Delp CJ (ed.) *Fungicide Resistance in North America*. St Paul, Minnesota, USA, APS Press, pp. 25–27.
- Davidse LC, Ishii H (1995) Biochemical and molecular aspects of the mechanism of action of benzimidazoles, N-phenylcarbamates and N-phenylformamidoximes and the mechanism of resistance to these compounds in fungi. In: Lyr H (ed) *Modern selective fungicides – properties, applications, mechanisms of action*, 2nd edn. Gustav Fischer Verlag, Jena, Germany. pp 305–322
- Davidson RM, Hanson LE, Franc GD, Panella L (2006) Analysis of β -tubulin Gene Fragments from Benzimidazole-sensitive and-tolerant *Cercospora beticola*. *Journal of Phytopathology* 154: 321–328. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01080.x>
- Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J (2008) Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72(2): 317-364. <https://doi.org/10.1128/membr.00031-07>
- Day DA, Whelan J, Millar AH, Siedow JN, Wiskich JT (1995) Regulation of the Alternative Oxidase in Plants and Fungi. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 497-509. <https://doi.org/10.1071/PP9950497>
- de Jonge R, Bolton MD, Thomma BP (2011) How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.005>
- de Jonge R, Ebert MK, Huitt-Roehl CR, Pal P, Suttle JC, Spanner RE, Neubauer JD, Jurick WM 2nd, Stott KA, Secor GA, Thomma BPHJ, Van de Peer Y, Townsend CA, Bolton MD (2018) Gene cluster conservation provides insight into cercosporin biosynthesis and extends production to the genus *Colletotrichum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115(24): E5459-E5466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712798115>
- De Lisi V, Reznikov S, Claps MP, Bernal M, Díaz F, Villafañe P, Aguaysol C, Martínez Monteros MJ, González V, Ploper LD (2014) Panorama fitosanitario del cultivo de la soja en Tucumán (R. Argentina), durante la campaña 2013/2014. *Avance Agroindustrial* 35(2): 19-21.
- de Mello, F.E., Lopes-Caitar, V.S., Prudente, H. et al. (2021a) Sensitivity of *Cercospora* spp. from soybean to quinone outside inhibitors and methyl benzimidazole carbamate fungicides in Brazil. *Tropical plant pathology* 46: 69–80. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00410-4>
- de Mello FE, Mathioni SM, Fantin LH, Rosa DD, Desjardins Antunes RF, Chagas Filho NR, Duvaresch DL, Canteri MG (2021b) Sensitivity assessment and SDHC-I86F mutation frequency of *Phakopsora pachyrhizi* populations to benzovindiflupyr and fluxapyroxad fungicides from 2015 to 2019 in Brazil. *Pest Management Science*. Accepted Author Manuscript. <https://doi.org/10.1002/ps.6466>
- De Waard MA, Van Nistelrooy JGM (1990) Stepwise development of laboratory resistance to DMI-fungicides in *Penicillium italicum*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96(6): 321-329.
- Del Sorbo G, Schoonbeek H, De Waard MA (2000) Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology* 30: 1–15. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1206>

- Deising HB, Reimann S, Pascholati SF (2008) Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 286-295. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200017>
- Delp CJ, Dekker J (1985) Fungicide resistance: definitions and use of terms. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 15: 333-335.
- Delp CJ (1995) Benzimidazole and related fungicides. In: Lyr H (ed) *Modern selective fungicides – properties, applications, mechanisms of action*, 2nd edn. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp 291–303
- Délye C, Laigret F, Corio-Costet MF (1997) A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2966–2970. <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.2966-2970.1997>
- Délye C, Bousset L, Corio-Coster MF (1998) PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (*CYP51*) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, a recalcitrant fungus. *Current Genetics* 34: 399-403. <https://doi.org/10.1007/s002940050413>
- Diachun S, Valleau WD (1941) Conidial production in culture by *Cercospora nicotianae*. *Phytopathology* 31: 97-98.
- Díaz CG, Ploper LD, Gálvez MR, González V, Zamorano MA, Jaldo HE, López C, Ramallo JC (2005) Effect of late season diseases on the growth of different soybean genotypes in relation to planting date. *Agriscientia* 21(1):1-7.
- Distéfano SG, Giorda LM (1997) *Enfermedades de la soja en Argentina*. INTA Centro Regional Córdoba. 72 pp.
- Distéfano S, Gadbán L (2007) Panorama fitopatológico del cultivo de soja en la campaña 2006–2007. Soja Actualización 2007. Informe de Actualización Técnica. INTA, Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez 7: 15–9.
- Distéfano SG, Gadbán LC (2009) Estimación de pérdidas de rendimiento causadas por la “mancha ojo de rana” en diferentes cultivares de soja. Libro de Resúmenes E031. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Río Hondo, Santiago del Estero.
- Divon HH, Fluhr R (2007) Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiology Letters* 266: 65–74. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00504.x>
- Dixon RA (1999) Isoflavonoids: Biochemistry, molecular biology, and biological functions. pp. 778-823. En: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol 1. Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives. U. Sankara, ed. Elsevier, Oxford.
- Dobrowolski DC, Foote CS (1983) Cercosporin, a singlet oxygen generator. *Angew Chem Int Ed Engl* 22: 720–721.
- Dodhia KN, Cox BA, Oliver RP, et al. (2021) Rapid in situ quantification of the strobilurin resistance mutation G143A in the wheat pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Scientific Reports* 11: 4526. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83981-9>
- Dooley H, Shaw MW, Spink J, Kildea S (2015) Effect of azole fungicide mixtures, alternations and dose on azole sensitivity in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 65: 124-136. <https://doi.org/10.1111/ppa.12395>
- Doukas EG, Markoglou AN, Vontas JG, Ziogas BN (2012) Effect of DMI-resistance mechanisms on cross-resistance patterns, fitness parameters and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* Speare. *Fungal Genetics and Biology* 49: 792-801. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.07.008>

- Doyle VP, Andersen JJ, Nelson BJ, Metzker ML, Brown JM (2014) Untangling the influences of unmodeled evolutionary processes on phylogenetic signal in a forensically important HIV-1 transmission cluster. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 75: 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.02.022>
- Doyle VP, Young RE, Naylor GJ, Brown JM (2015) Can We Identify Genes with Increased Phylogenetic Reliability?. *Systematic Biology* 64(5): 824-837. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syv041>
- Doyle VP, Tonry HT, Amsden B, Beale J, Dixon E, Li H, Szarka D, Ward Gauthier N (2019) First Report of *Cercospora* cf. *flagellaris* on Industrial Hemp (*Cannabis sativa*) in Kentucky. *Plant Disease* 103: 1784-1784. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0135-PDN>
- Duan Y, Zhang X, Ge C, Wang Y, Cao J, Jia X, Wang J, Zhou M (2014) Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports* 4: 7094. <https://doi.org/10.1038/srep07094>
- Duan Y, Xiu Q, Li H, Li T, Wang J, Zhou M (2019) Pharmacological Characteristics and Control Efficacy of a Novel SDHI Fungicide Pydiflumetofen Against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* 103(1): 77-82. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0763-RE>
- Ducrot P-H, Lallemand J-Y, Milat M-L, Blein J-P (1994a) The yellow toxins produced by *Cercospora beticola*. Part VIII: Chemical equilibrium between beticolins; structures of minor compounds: Beticolin 6 and beticolin 8. *Tetrahedron Letters* 35: 8797-8800. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)78501-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)78501-7)
- Ducrot PH, Milat ML, Blein JP, Lallemand JY (1994b) The yellow toxins produced by *Cercospora beticola*. Revised structure of beticolin-1 and beticolin-3. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 2215-2216. <https://doi.org/10.1039/C39940002215>
- Ducrot P-H, Einhorn J, Kerhoas L, et al. (1996) *Cercospora beticola* toxins. Part XI: isolation and structure of beticolin 0. *Tetrahedron Letters* 37: 3121-3124. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)00506-0](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00506-0)
- Ebert MK (2018) Effector biology of the sugar beet pathogen *Cercospora beticola*. Doctor of Philosophy, Wageningen University, Wageningen. 160 p. <https://doi.org/10.18174/453825>
- Ebert MK, Spanner RE, de Jonge R, Smith DJ, Holthusen J, Secor GA, Thomma BPHJ, Bolton MD (2019) Gene cluster conservation identifies melanin and perylenequinone biosynthesis pathways in multiple plant pathogenic fungi. *Environmental Microbiology* 21: 913-927. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14475>
- Ebert, MK, Rangel, LI, Spanner, RE, et al. (2020) Identification and characterization of *Cercospora beticola* necrosis-inducing effector CbNip1. *Molecular Plant Pathology* 22: 301- 316. <https://doi.org/10.1111/mpp.13026>
- Eddy SR (2011) Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput. Biol.* 7(10): e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>
- Edgar RC (2004a) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids Res.* 32:1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Edgar RC (2004b) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinform.* 5:113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Edgington LV, Khew KL, Barron GL (1971) Fungitoxic Spectrum of Benzimidazole Compounds. *Phytopathology* 61(1): 42-44. DOI: 10.1094/Phyto-61-42

- Ehrenshaft M, Upchurch RG (1991) Isolation of light-enhanced cDNA clones of *Cercospora kikuchii*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2671-2676. <https://doi.org/10.1128/aem.57.9.2671-2676.1991>
- Ehrenshaft M, Jenks AE, Chung KR, Daub ME (1998) SOR1, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora* fungi, is highly conserved in divergent organisms. *Molecular Cell* 1(4): 603-609. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80060-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80060-X)
- El-Gholl NE, Alfieri SA, Ridings WH, Schoulties CL (1982) Growth and sporulation *in vitro* of *Cercospora apii*, *Cercospora arachidicola*, *Cercospora kikuchii* and other species of *Cercospora*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 60: 862-868.
- Elesgaray A, Zilli C, Balestrasse K, Carmona M (2014) Podridão cinzenta da soja causada por *Macrophomina phaseolina*: Efeitos da associação de glifosato e fosfito de manganês. Uma nova ferramenta para seu manejo. Conferencia VII Reunión Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos”, Universidad Estadual de Maringá, 19 al 21 de noviembre de 2014.
- Ellis MB (1971) Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Ellis MB (1976) More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Fajola AO (1978) Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. *Physiological Plant Pathology* 13: 157-164. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(78\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0048-4059(78)90029-2)
- Fan J, Urban M, Parker JE, Brewer HC, Kelly SL, Hammond-Kosack KE, Fraaije BA, Liu X, Cools HJ (2013) Characterization of the sterol 14 alpha-demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. *New Phytologist* 198: 821-835. <https://doi.org/10.1111/nph.12193>
- Faretra F, Pollastro S (1991) Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycological Research* 95: 943-951. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80091-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80091-9)
- Felipini RB, Luiz C, Costa MEB, Di Piero RM (2015) Mode of action of chitosan and ASM for the control of *Cercospora* leaf spot on table beet. *Tropical Plant Pathology* 40: 176-183. <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0029-5>
- Fehr WR, Caviness CF, Burmood DT, Pennington JS (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop science* 11: 929-931.
- Fehr WR, Caviness CE (1977) Stages of soybean development. Cooperative Extension Service, Agriculture and Home Economics Experiment Station, Iowa State University, Ames, Iowa.
- Fernandez-Ortuño D, Chen F, Schnabel G (2012) Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Disease* 96: 1198-1203. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1049-RE>
- Fernández-Ortuño D, Pérez-García A, Chamorro M, de la Peña E, de Vicente A, Torés JA (2017) Resistance to the SDHI Fungicides Boscalid, Fluopyram, Fluxapyroxad, and Penthiopyrad in *Botrytis cinerea* from Commercial Strawberry Fields in Spain. *Plant Disease* 101(7): 1306-1313. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0067-RE>
- Fisher N, Brown CA, Sexton G, Cook A, Windass J, Meunier B (2004) Modeling the Qo site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b. *European Journal of Biochemistry* 271: 2264-2271. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04169.x>
- Fisher N, Meunier B (2008) Molecular basis of resistance to cytochrome bc1 inhibitors. *FEMS Yeast Research* 8: 183-192. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00328.x>

- Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* 360(6390): 739-742. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aap7999>
- Fones HN, Bebbler DP, Chaloner TM, et al. (2020) Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. *Nature Food* 1: 332–342. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0075-0>
- Formento AN, de Souza J (2007) Efecto del manchado púrpura de la semilla de soja (*Cercospora kikuchii*) sobre la germinación. *Análisis de Semillas*. Tomo 1(3):93-96.
- Formento AN, Schutt de Varini L, Velázquez JC (2009) Enfermedades de Fin de Ciclo (EFC), Roya Asiática (RAS) y Emergentes en el Cultivo de Soja en Entre Ríos. Informe Fitopatológico Cultivo de Soja. Año V – N°52.
- Formento AN, Mainez HJ, Penco R, Scandiani MM, Carmona MA (2016) Calidad sanitaria de las semillas de soja 2016 y su efecto sobre el poder germinativo. *Serie Extensión INTA Paraná* N° 79:81-89.
- FRAC (2018) Importance of multisite fungicides in managing pathogen resistance. Disponible online en: <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-recommendations-for-multisites/frac-statement-on-multisite-fungicides-2018.pdf>
- FRAC (fungicide resistance action committee), *Crop Life*. www.frac.info, acceso 2020.
- Fraaije BA, Burnett FJ, Cools HJ, Clark WS, Pavely N, Norman K, Lucas JA (2011) Understanding evolution and selection of azole resistance mechanisms in UK populations of *Mycosphaerella graminicola*. HGCA Project Report No. 475, 125 pp. Available at <http://cereals.ahdb.org.uk/publications/2011/february/17/understanding-evolution-and-selection-of-azole-resistance-mechanisms-in-uk-populations-of-mycosphaerella-graminicola.aspx>
- Fraaije BA, Bayon C, Atkins S, Cools HJ, Lucas JA, Fraaije MW (2012) Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septoria leaf blotch in wheat. *Molecular Plant Pathology* 13(3): 263–275. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00746.x>
- Franca Neto JB, West SH (1989) Effects of *Colletotrichum truncatum* and *Cercospora kikuchii* on viability and quality of soybean seed. *Journal of Seed Technology* 13: 136-149.
- Fuckel KWGL (1863) *Fungi Rhenani exsiccata*. Fasc. I-IV. *Hedwigia* 2: 132-136.
- Fujita Y (1990) Ecology and control of purple seed stain of soybean caused by *Cercospora kikuchii*. *Bull. Tohoku Natl. Agric. Exp. Stn.* 81:99-109.
- Galagedara NN, Doyle V, Price P, Robertson CL, Thomas-Sharma S (2020) Importance of air-borne conidia in the epidemiology of Cercospora Leaf Blight on soybean. APS Annual Meeting, August 10-14, Virtual Meeting.
- Galli JA, De Cássia Panizzi R, Fessel SA, De Simoni F, Fumiko Ito M (2005) Effect of *Colletotrichum dematium* var. *truncata* and *Cercospora kikuchii* on soybean seed germination. *Revista Brasileira de Sementes* 27(1): 182-187. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222005000200026>
- Gao D, Sun Q, Hu B, Zhang S (2020) A Framework for agricultural pest and disease monitoring based on internet-of-things and unmanned aerial vehicles. *Sensors* 20(5): 1487. <https://doi.org/10.3390/s20051487>
- García J, March G, Oddino C, Ferrari S, Tarditti L, Marinelli A (2009) Transmisión por semilla y detección temprana de *Cercospora kikuchii* y *C. sojina*, en cultivo de soja. Libro de Resúmenes E043. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 30 de septiembre, 1 y 2 de octubre. Río Hondo, Santiago del Estero.

- Garcia Aroca T (2016) Effects of glyphosate on soybean nutrition, endophytic colonization by *Cercospora* cf. *flagellaris* and development of cercospora leaf blight. Master thesis, Louisiana State University. 4485. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/4485
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Garrán S, Montangie G, Mika R (2001) Resistencia de los hongos a los fungicidas. Un tema central en la estrategia del control químico e integrado. *INTA idiaXXI*, pp. 33 - 36.
- Garsia-Effron G, Dilger A, Alcazar-Fuoli L, Park S, Mellado E, Perlin DS (2008) Rapid detection of triazole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 1200-1206. <https://doi.org/10.1128/jcm.02330-07>
- Georgopoulos SG (1982) Genetical and Biochemical Background of Fungicide Resistance. In: Dekker, J.; Georgopoulos, S. G. *Fungicide Resistance in Crop Protection*. Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation, p. 46-52.
- Georgopoulos SG, Skylakakis G (1986) Genetic variation in the fungi and the problem of fungicide resistance. *Crop Protection* 5: 299-305. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(86\)90107-9](https://doi.org/10.1016/0261-2194(86)90107-9)
- Ghosoph JM, Schmidr LS, Margosan DA, Smilunick JL (2007) Imazalil resistance linked to a unique insertion sequence in the *Pdcyp51* promoter region of *Penicillium digitatum*. *Postharvest Biology and Technology* 44: 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.008>
- Giraldo MC, Valent B (2013) Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology* 11: 800–814. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3119>
- Gisi U, Chin KM, Knapova G, KuKng FaKrberr R, Mohr U, Parisi S, Sierotzki H, Steinfeld U (2000) Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protection* 19: 863-872. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00114-9)
- Gisi U, Sierotzki H (2002) Cook A and McCaffery A, Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58: 859-867. <https://doi.org/10.1002/ps.565>
- Glaettli A, Stammli G, Schlehuber S (2009) Mutations in the target proteins of succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI) and 14 α -demethylase inhibitors (DMI) conferring changes in the sensitivity – structural insights from molecular modelling. In: 9th international conference on plant diseases, Tours, France, pp 670–681.
- Glass NL, Vollmer SJ, Staben C, Grotelueschen J, Metzberg RL, Yanofsky C (1988) DNAs of the two mating-type alleles of *Neurospora crassa* are highly dissimilar. *Science* 241(4865): 570-573. <https://doi.org/10.1126/science.2840740>
- Glass NL, Smith ML (1994) Structure and function of a mating type gene from the homothallic species *Neurospora Africana*. *Molecular and General Genetics* 244: 401-409. <https://doi.org/10.1007/BF00286692>
- Gomez BL, Nosanchuk JD (2003) Melanin and fungi. *Current Opinion in Infectious Diseases* 16: 91–96. <https://doi.org/10.1097/0001432-200304000-00005>
- González AM, Turino L, Rapela MGL, Lurá MC (2008) *Cercospora kikuchii* aislada en la provincia de Santa Fe (Argentina): variabilidad genética y producción de cercosporina in vitro. *Revista Iberoamericana de Micología* 25: 237-241. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70056-1)

- Goodwin SB, Dunkle LD, Zismann VL (2001) Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 648–658. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.7.648>
- Goodwin SB, Waalwijk C, Kema GHJ, Cavaletto JR, Zhang G (2003) Cloning and analysis of the mating-type idiomorphs from the barley pathogen *Septoria passerinii*. *Molecular Genetics and Genomics* 269: 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0795-x>
- Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K (2009) Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaphthol blue. *Biotechniques*. 46: 167–172. <https://doi.org/10.2144/000113072>
- Goudet, C., Véry, A.A., Milat, M.L., Ildefonse, M., Thibaud, J.B., Sentenac, H. et al. (1998) Magnesium ions promote assembly of channel-like structures from beticolin 0, a non-peptide fungal toxin purified from *Cercospora beticola*. *The Plant Journal* 14: 359–364. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00129.x>
- Goudet C, Milat M-L, Sentenac H, Thibaud J-B (2000) Beticolins, nonpeptidic, polycyclic molecules produced by the phytopathogenic fungus *Cercospora beticola*, as a new family of ion channel-forming toxins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 203–209. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.203>
- Graham TL, Graham MY (1996) Signaling in soybean phenylpropanoid responses. *Plant Physiol.* 110: 1123–1133. <https://doi.org/10.1104/pp.110.4.1123>
- Gressel J, Levy AA (2006) Agriculture: the selector of improbable mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 12215–12216. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603666103>
- Gressel J (2011) Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Management Science* 67: 253–257. <https://doi.org/10.1002/ps.2071>
- Groenewald JZ, Nakashima C, Nishikawa J, Shin H-D, Park J-H, Jama AN, Groenewald M, Braun U, Crous PW (2013) Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 75: 115–170. <https://doi.org/10.3114/sim0012>
- Groenewald M, Groenewald JZ, Crous PW (2006a) Characterization of *Cercospora* mating type genes. *APS 2006 Annual Meeting, Quebec, Canada, July 29–August 2, 2006.* p44.
- Groenewald M, Groenewald JZ, Harrington TC, Abeln ECA, Crous PW (2006b) Mating type gene analysis in apparently asexual *Cercospora* species is suggestive of cryptic sex. *Fungal Genetics and Biology* 43: 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.05.008>
- Groenewald M, Linde CC, Groenewald JZ, Crous PW (2008) Indirect evidence for sexual reproduction in *Cercospora beticola* populations from sugar beet. *Plant Pathology* 57: 25–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01697.x>
- Groenewald M, Groenewald JZ, Crous PW (2010) Mating type genes in *Cercospora beticola* and allied species. In: *Cercospora Leaf Spot of Sugar Beet and Related Species* (Lartey RT, Weiland JJ, Panella L, Crous PW, Windels CE, editors. , eds). APS Press, Minnesota USA: 39–53.
- Gu X, Ding J, Liu W, Yang X, Yao L, Gao X, Zhang M, Yang S, Wen J (2020) Comparative genomics and association analysis identifies virulence genes of *Cercospora sojina* in soybean. *BMC Genomics*. 21(1):172. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6581-5>
- Guex N, Peitsch MC, Schwede T (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30: S162–S173. <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>

- Gullino ML, Tinivella F, Garibaldi A, Kemmitt GM, Bacci L, Sheppard B (2010) Mancozeb: Past, Present, and Future. *Plant Disease* 94:1076-1087. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1076>
- Gutiérrez-Alonso O, Hawkins NJ, Cools HJ, Shaw MW, Fraaije BA (2017) Dose-dependent selection drives lineage replacement during the experimental evolution of SDHI fungicide resistance in *Zymoseptoria tritici*. *Evol Appl*. 10: 1055–1066. <https://doi.org/10.1111/eva.12511>
- Hahn M (2014) The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology* 7(4): 133-141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Hamamoto H, Hasegawa K, Nakaune R, Lee YJ, Makizumi Y, Akutsu K, Hibi T (2000) Tandem repeat of a transcription enhancer upstream of the sterol 14 α demethylase gene (*cyp51*) in *Penicillium digitatum*. *Appl Environ Microbiol* 66: 3421-3426. <https://doi.org/10.1128/aem.66.8.3421-3426.2000>
- Hartman GL (2007) Soybean diseases: ecology and control. In *Encyclopedia of Pest Management*. Taylor and Francis: New York, Published online: 12 Dec 2007; 1-3.
- Hartman GL, Rupe JC, Sikora EJ, Domier LL, Davis JA, Steffey KL (2015) *Compendium of Soybean Diseases and Pests*, 5 ed., Amer Phytopathological Society, 201 p. ISBN:978-0-89054-475-4, doi: 10.1094/9780890544754
- Hasegawa M (2003) Chemical control of benzimidazole-resistant strains of *Cercospora kikuchii*. Abstracts of the 13th Symposium of Research Committee on Fungicide Resistance.
- Hawkins NJ, Cools HJ, Sierotzki H, Shaw MW, Knogge W, Kelly SL, Kelly DE, Fraaije BA (2014) Paralog re-emergence: a novel, historically-contingent mechanism in the evolution of antimicrobial resistance. *Molecular Biology and Evolution* 31: 1793-1802. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu134>
- He M-H, Wang Y-P, Wu E-J, Shen L-L, Yang L-N, Wang T, Shang L-P, Zhu W and Zhan J (2019) Constraining evolution of *Alternaria alternata* resistance to a demethylation Inhibitor (DMI) fungicide difenoconazole. *Frontiers in Microbiology* 10: 1609. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01609>
- He Q, McLellan H, Boevink PC, Birch PRJ (2020) All Roads Lead to Susceptibility: The Many Modes of Action of Fungal and Oomycete Intracellular Effectors. *Plant Communications* 1(4): 100050. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100050>
- Heaney SP, Hall AA, Davies SA, Olaya G (2000) Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives. *Brighton Crop Prot Conf*: 755–762
- Hemmi T (1915) A new brown spot disease of the leaf of *Glycine hispida* Maxim caused by *Septoria glycines* sp.n. *Transactions of Sapporo Natural History Society*. Vol 6 pp. 12-17.
- Hepperly PR, Sinclair JB (1981) Relationships among *Cercospora kikuchii*, other seed mycoflora, and germination of soybeans in Puerto Rico and Illinois. *Plant Disease* 65: 130.132. doi: 10.1094/PD-65-130.
- Herrero S, Amnuaykanjanasin A, Daub ME (2007) Identification of genes differentially expressed in the phytopathogenic fungus *Cercospora nicotianae* between cercosporin toxin-resistant and -susceptible strains. *FEMS Microbiology Letters* 275: 326–337. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00903.x>
- Hirooka T, Ishii H (2013) Chemical control of plant diseases. *Journal of General Plant Pathology* 79(6): 390–401. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0470-6>
- Hnátová M, Gbelská Y, Obernauerová M, Šubíková V, Šubík J (2003) Cross-resistance to strobilurin fungicides in mitochondrial and nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica* 48(4): 496–500. <https://doi.org/10.1007/BF02931331>

- Hobbelen PHF, Paveley ND, van den Bosch F (2011) Delaying selection for fungicide insensitivity by mixing fungicides at a low and high risk of resistance development: A modeling analysis. *Phytopathology* 101:1224-1233. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-10-0290>
- Hobbelen PHF, Paveley ND, Oliver RP, van den Bosch F (2013) The usefulness of concurrent, alternating and mixture use of two high-risk fungicides for delaying the selection of resistance in populations of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat. *Phytopathology* 103: 690–707. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0142-R>
- Hobbelen PHF, Paveley ND, van den Bosch F (2014) The Emergence of Resistance to Fungicides. *PLoS ONE* 9(3): e91910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091910>
- Hof H (2008) Mycotoxins: pathogenicity factors or virulence factors? *Mycoses* 51(2): 93-94. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2007.01455.x>
- Hoffmann LL (2002) Controle de oídio e doenças de final de ciclo em soja. M. Sc. Tesis. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil. 68 pp.
- Hollomon D, Cooke L, Locke T (2002) Maintaining the effectiveness of DMI fungicides in cereal disease control strategies. HGCA Project Report No. 275. 26 pp.
- Hollomon DW, Brent KJ (2009) Combating plant diseases—the Darwin connection. *Pest Management Science* 65: 1156-1163. <https://doi.org/10.1002/ps.1845>
- Hollomon DW (2012) Do we have the tools to manage resistance in the future? *Pest Management Science* 68: 149–154. <https://doi.org/10.1002/ps.2291>
- Hollomon DW (2015) Fungicide Resistance: 40 Years on and Still a Major Problem. In: *Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management*. Hideo Ishii, Derek William Hollomon (Eds.). Springer Japan, ISBN: 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online). pp. 3-11.
- Hollomon DW, Ishii H (2015) Monitoring Resistance Using Molecular Methods. In: *Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management*. Hideo Ishii, Derek William Hollomon (Eds.). Springer Japan, ISBN: 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online). pp. 295-309.
- Hou YP, Luo QQ, Chen CJ, Zhou MG (2011) Application of cycleave PCR to the detection of a point mutation (F167Y) in the b2-tubulin gene of *Fusarium graminearum*. *Pest Management Science* 67: 1124–1128. <https://doi.org/10.1002/ps.2161>
- Hsieh WH, Goh TK (1990) *Cercospora* and similar fungi from Taiwan. Maw Chang Book Company, Taipei, Taiwan
- Hu Y, Green GS, Milgate AW, Stone EA, Rathjen JP, Schwessinger B (2019) Pathogen Detection and Microbiome Analysis of Infected Wheat Using a Portable DNA Sequencer. *Phytobiomes Journal* 3: 92-101. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-01-19-0004-R>
- Huang X, Luo J, Li B, Song Y, Mu W, Liu F (2019) Bioactivity, physiological characteristics and efficacy of the SDHI fungicide pydiflumetofen against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 160: 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.017>
- Hulvey J, Porko JT Jr, Hyunkyu J, Berg A, Jung C (2012) Overexpression of ShCYP51B and ShatrD in *Sclerotinia homeocarpa* isolates exhibiting practical resistance to a demethylation inhibitor fungicide. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 6674-6682. <https://doi.org/10.1128/aem.00417-12>
- Hunt RS (1994) Comment on the letter by Andrivon-Re: pathogenicity and virulence. *Phytopathology* 84: 874–875.

- Hyde KD, Jones EBG, Liu JK, et al. (2013) Families of dothideomycetes. *Fungal Diversity* 63: 1–313. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0263-4>
- Imazaki I, Homma Y, Kato M, Vallone S, Yorinori JT, Henning AA, Iizumi H, Koizumi S (2006a) Genetic relationships between *Cercospora kikuchii* populations in South America and Japan. *Phytopathology* 96: 1000-1008. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1000>
- Imazaki I, Iizumi H, Ishikawa K, Sasahara M, Yasuda N, Koizumi S (2006b) Effects of thiophanate-methyl and azoxystrobin on the composition of *Cercospora kikuchii* populations with thiophanate-methyl resistant strains. *Journal of General Plant Pathology* 72: 292-300. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0285-9>
- Imazaki I, Ishikawa K, Yasuda N, Miyasaka A, Kawasaki S, Koizumi S (2006c) Incidence of thiophanate-methyl resistance in *Cercospora kikuchii* within a single lineage based on amplified fragment length polymorphisms in Japan. *J Gen Plant Pathol* 72:77–84. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0260-x>
- Imazaki I, Sasahara M, Koizumi S (2007) Spatial distribution of purple seed stain of soybean caused by *Cercospora kikuchii* in fields. *Journal of General Plant Pathology* 73: 41-45. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0323-7>
- Imbusch F, Liebe S, Erven T, Varrelmann M (2021) Dynamics of *Cercospora* leaf spot disease determined by aerial spore dispersal in artificially inoculated sugar beet fields. *Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/ppa.13337>
- Ingham JL, Keen NT, Mulheirn LJ, Lyne RL (1981) Inducibly-formed isoflavonoids from leaves of soybean. *Phytochemistry* 20: 795-798. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85177-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85177-1)
- Irieda H, Inoue Y, Mori M, Yamada K, Oshikawa Y, Saitoh H, Uemura A, Terauchi R, Kitakura S, Kosaka A, Singkaravanit-Ogawa S, Takano Y (2019) Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116: 496-505. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807297116>
- Ishii H (2004) Studies on fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Journal of General Plant Pathology* 70:379–381. <https://doi.org/10.1007/s10327-004-0144-5>
- Ishii H (2006) Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *JARQ* 40 (3): 205–211. <https://doi.org/10.6090/jarq.40.205>
- Ishii H (2010) QoI Fungicide Resistance: Current Status and the Problems Associated with DNA-Based Monitoring. In: Gisi et al. (eds.) *Recent Developments in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21st Century* 1, DOI 10.1007/978-1-4020-8804-9_3, Springer Science+Business Media B.V. 37-45 pp.
- Ishii H (2015) Stability of Resistance. In: *Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management*. Hideo Ishii, Derek William Hollomon (Eds.). Springer Japan, ISBN: 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online). pp. 35-48.
- Ishii H, Zhen F, Hu M, Li X, Schnabel G (2016) Efficacy of SDHI fungicides, including benzovindiflupyr, against *Colletotrichum* species. *Pest Management Science* 72: 1844-1853. <https://doi.org/10.1002/ps.4216>
- Ivancovich A, Botta G (2000) Enfermedades de final de ciclo. *Revista de Tecnología Agropecuaria* 5 (13):23.
- Ilyas MB, Dhingra OD, Ellis MA, Sinclair JB (1975) Location of mycelium of *Diaporthe phaseolorum* var *sojae* and *Cercospora kikuchii* in infected soybean seeds. *Plant Disease Reporter* 59: 17–19.

- Jackson EW, Fenn P, Chen P (2006) Inheritance of resistance to purple seed stain caused by *Cercospora kikuchii* in PI 80837 soybean. *Crop Science* 46: 1462–1466. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0621>
- Jackson EW, Feng C, Fenn P, Chen P (2008) Genetic mapping of resistance to purple seed stain in PI 80837 soybean. *Journal of Heredity* 99: 319-322. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm123>
- Jahn B, Koch A, Schmidt A, et al. (1997) Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infection and Immunity* 65: 5110–5117. <https://doi.org/10.1128/iai.65.12.5110-5117.1997>
- Jayawardena RS, Hyde KD, Chen YJ, et al. (2020) One stop shop IV: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera: 76–100 (2020). *Fungal Diversity* 103: 87–218. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00460-8>
- Jenns AE, Daub ME, Upchurch RG (1989). Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. *Phytopathology* 79: 213–219. doi: 10.1094/Phyto-79-213
- Jones JP (1968) Survival of *Cercospora kikuchii* on soybean stems in the field. *Plant Disease Reporter* 52: 931-934.
- Jones PM, George AM (Mar 2004) The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 (6): 682–99. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3336-9>
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Joosten MH, Vogelsang R, Cozijnsen TJ, Verberne MC, De Wit PJ (1997) The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *Plant Cell* 9(3): 367-79. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.3.367>
- Jordá T, Puig S (2020) Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes* 11(7): 795. <https://doi.org/10.3390/genes11070795>
- Joseph-Horne T, Hollomon DW (2000) Functional diversity within the mitochondrial electron transport chain of plant pathogenic fungi. *Pest Management Science* 56: 24–30. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200001\)56:1<24::AID-PS71>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200001)56:1<24::AID-PS71>3.0.CO;2-Y)
- Jung MK, Wilder IB, Oakley BR (1992) Amino acid alterations in the benA (b-tubulin) gene of *Aspergillus nidulans* that confer benomyl resistance. *Cell Motility Cytoskeleton* 22: 170–174. <https://doi.org/10.1002/cm.970220304>
- Karaoglanidis GS, Thanassouloupoulos CC (2003) Cross-resistance patterns among sterol biosynthesis inhibiting fungicides (SBIs) in *Cercospora beticola*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 929–934. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000003672.36076.8a>
- Karlekar A, Seal A (2020) SoyNet: Soybean leaf diseases classification. *Computers and Electronics in Agriculture* 172: 105342. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105342>
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20: 1160-1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Keen NT, Taylor OC (1975) Ozone injury in soybean. *Plant Physiology* 55: 731-733. <https://doi.org/10.1104/pp.55.4.731>
- Keilin D (1925) On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. *Proceedings of the Royal Society of London B*98: 312–399.

- Keller NP (2019) Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology* 17(3): 167-180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>
- Khater M, de la Escosura-Muñiz A, Merkoçi A (2017) Biosensors for plant pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics* 93: 72-86. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.091>
- Kilpatrick RA (1956) Longevity of *Cercospora kikuchii* on soybean stems. *Phytopathology* 46: 58-58.
- Kilpatrick RA, Johnson HW (1956) Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar. *Phytopathology* 46:180-181.
- Kikuchi R (1924) The scientific researches of the alumni association of Utsunomiya agricultural college (Japan) I: 7-25.
- Kim H, Newell AD, Cota-Sieckmeyer RG, Rupe JC, Fakhoury AM, Bluhm BH (2003a) Mating-type distribution and genetic diversity of *Cercospora sojina* populations on soybean from Arkansas: Evidence for potential sexual reproduction. *Phytopathology* 103: 1045-1051. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-12-0229-R>
- Kim YS, Dixon EW, Vincelli P, Farman ML (2003b) Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* 93: 891–900. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.7.891>
- Klingelfuss LH, Yorinori JT (2001) Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *Cercospora kikuchii* em soja. *Fitopatologia Brasileira* 26: 158-164. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000200007>
- Koenraadt H, Somerville SC, Jones AL (1992) Characterization of mutations in the beta-tubulin gen of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354. doi: 10.1094/Phyto-82-1348
- Kohler AC, Chen L-H, Hurlburt N, Salvucci A, Schwessinger B, Fisher AJ, Stergiopoulos I (2016) Structural analysis of an Avr4 effector ortholog offers insight into chitin binding and recognition by the Cf-4 Receptor. *Plant Cell* 28: 1945–1965. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00893>
- Kretschmer M, Leroch A, Mosbach A, Walker AS, Fillinger S, Memke D (2009) Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens* 5:e1000696. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>
- Krishnan-Natesan S, Chandrasekar PH, Alangaden GJ, Manavathu EK (2008) Molecular characterisation of *cyp51A* and *cyp51B* genes coding for P450 14 α -lanosterol demethylases A (CYP51Ap) and B (CYP51Bp) from voriconazole-resistant laboratory isolates of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32: 519-524. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.06.018>
- Krizsán K, Almási É, Merényi Z, et al. (2019) Transcriptomic atlas of mushroom development reveals conserved genes behind complex multicellularity in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 116(15): 7409-7418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817822116>
- Ku Y-S, Cheng S-S, Gerhardt A, Cheung M-Y, Contador CA, Poon L-YW, Lam H-M (2020) Secretory peptides as bullets: effector peptides from pathogens against antimicrobial peptides from soybean. *International Journal of Molecular Sciences* 21(23): 9294. <https://doi.org/10.3390/ijms21239294>
- Kudo AS, Blum LEB (2010) Reaction of soybean genotypes to *Cercospora* leaf blight. *Bragantia* 70(2): 397-401.
- Kudo AS, Blum LEB, Lima MA (2011) Aerobiology of *Cercospora kikuchii*. *Ciência Rural* 41(10): 1682-1688. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011005000128>

- Kühlbrandt W (2015) Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* 13, 89. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
- Kulik MM (1984) Symptomless infection, persistence, and production of pycnidia in host and non-host plants by *Phomopsis batatae*, *Phomopsis phaseoli*, and *Phomopsis sojae*, and the taxonomic implications. *Mycologia* 76: 274–291. <https://doi.org/10.1080/00275514.1984.12023837>
- Kuck KH, Mehl A (2004) Prothioconazole: sensitivity profile and anti-resistance strategy. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 57: 225-236.
- Kuraku K, Zmasek CM, Nishimura O, Katoh K (2013) aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Research* 41: W22-W28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt389>
- Kuyama S, Tamura T (1957) Cercosporin. A pigment of *Cercospora kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu. I. Cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. *Journal of the American Chemical Society* 79: 5725–5726. <https://doi.org/10.1021/ja01578a038>
- Kuyama S (1962) Cercosporin- Pigment of *Cercosporina kikuchii* -Matsomoto Et Tomoyasu 3. Nature of aromatic ring of cercosporin. *Journal of Organic Chemistry* 27: 939-944. <https://doi.org/10.1021/jo01050a061>
- Lagesen K, Hallin PF, Rødland E, Stærfeldt HH, Rognes T, Ussery DW (2007) RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes, *Nucleic Acids Res.* 35: 3100–3108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm160>
- Laguna I, Rodríguez Pardina P, Truol G, Fiorona M, Nome C, Di Feo L, Alemandri V (2008) Enfermedades causadas por virus en cultivos de soja en Argentina. *INTA-IPAVE*. 90 p.
- Lamb BC, Mandaokar S, Bahsoun B, Grishkan I, Nevo E (2008) Differences in spontaneous mutation frequencies as a function of environmental stress in soil fungi at “Evolution Canyon,” Israel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 5792-5796. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801995105>
- Lanfear R, Calcott B, Ho SY, Guindon S (2012) PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol* 29:1695-1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>
- Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B (2016) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol* 34: 772-773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* 38: 143-58. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00526-1](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00526-1)
- Larran S, Rollán C, Bruno Ángeles H, Alippi HE, Urrutia MI (2002) Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Invest. Agr., Prod. Prot. Veg.* Vol. 17(1):173-178.
- Lartey RT, Weiland JJ, Panella L, Crous PW, Windels CE (2010) *Cercospora* leaf spot of sugar beet and related species. APS Press, New York. 296 p. ISBN 978-0-89054-387-0
- Laviolette FA, Athow KL (1972) *Cercospora kikuchii* infection of soybean as affected by stage of plant development. *Phytopathology* 62: 771 (Abstract).

- Leadbeater A (2012) The Role of the Fungicide Resistance Action Committee in Managing Resistance. In: Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management (ed. T.S. Thind). CAB International. 271-278 pp.
- Lee JH, Hwang S-R, Lee Y-H, Kim K, Cho KM, Lee YB (2015) Changes occurring in compositions and antioxidant properties of healthy soybean seeds [*Glycine max* (L.) Merr.] and soybean seeds diseased by *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kikuchii* fungal pathogens. Food Chemistry 185: 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.139>
- Lehman SG (1950) Purple stain of soybean seeds. North Carolina Agriculture Experimental Station Bulletin 369:1-11.
- Lemmon AR, Brown JM, Stanger-Hall K, Lemmon EM (2009) The effect of ambiguous data on phylogenetic estimates obtained by maximum likelihood and Bayesian inference. Systematic Biology 58(1): 130-145. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp017>
- Leroux P, Albertini C, Gautier A, Gredt M, Walker A (2007) Mutations in the *CYP51* gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. Pest Management Science 63: 688-698. <https://doi.org/10.1002/ps.1390>
- Leroux P, Walker AS (2011) Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. Pest Management Science 67: 44–59. <https://doi.org/10.1002/ps.2028>
- Leslie (1993) Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology 31: 127-150. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.001015>
- Li HX, Lu YJ, Wang JX, Zhou MG (2003) Cloning of beta-tubulin gene from *Gibberella zeae* and analysis its relationship with carbendazim resistance. Acta Microbiologica Sinica 43: 424–429.
- Li S, Chen P, Zhang B, Shannon G (2016) Research on purple seed stain of soybean: germplasm screening and genetic resistance. pp. 65–77. In: Melanie W (ed.) Germplasm Characteristics, Diversity and Preservation. Nova Science Publisher. ISBN: 978-1-53610-336-6
- Li S, Sciumbato G, Boykin D, Shannon G, Chen P (2019) Evaluation of soybean genotypes for reaction to natural field infection by *Cercospora* species causing purple seed stain. PLoS ONE 14(10): e0222673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222673>
- Li H, Barlow W, Dixon E, Amsden BF, Hirsch R, Pfeufer EE. (2020) Molecular Identification of Mutations Conferring Resistance to Azoxystrobin in *Cercospora nicotianae*. Plant Disease. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-20-0441-RE>
- Liang H, Li J, Luo C, Li J, Zhu F-X (2019) Effects of SHAM on the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* to QoI fungicides. Plant Disease 103(8): 1884-1888. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2142-RE>
- Lichtemberg PSF, Luo Y, Morales RG, Muehlmann-Fischer JM, Michailides TJ, May De Mio LL (2017) The Point Mutation G461S in the MfCYP51 Gene is Associated with Tebuconazole Resistance in *Monilinia fructicola* Populations in Brazil. Phytopathology 107: 1507-1514. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0050-R>
- Lin HA, Mideros SX (2021) Accurate quantification and detection of *Septoria glycines* in soybean using quantitative PCR. Current Plant Biology 25: 100192. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100192>
- Link T, Iwata M, Björkman J, van der Spoel D, Stocker A, Iwata S (2003) Molecular modeling of inhibitors at Qi and Qo sites in cytochrome bc1 complex. In: Voss G, Ramos G (eds) Chemistry of crop protection. Wiley-VCH Weinheim, Germany

- Liu Y-C, Cortesi P, Double ML, MacDonald WL, Milgroom MG (1996) Diversity and multilocus genetic structure in populations of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 86: 1344-1351. doi: 10.1094/Phyto-86-1344
- Liu X, Yu F, Schnabel G, Wu J, Wang Z, Ma Z (2011) Paralogous *cyp51* genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Fungal Genetics and Biology* 48: 113-123. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.10.004>
- Liu GY, Nizet V (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology* 17: 406-413. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.06.006>
- Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R (2015) Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* 66: 513-45. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114623>
- Lousberg RJJ, Weiss U, Salmink. CA, Arnone A, Merlini L, Nasini G (1971) The structure of cercosporin, a naturally occurring quinone. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications* 71: 1463-1464. <https://doi.org/10.1039/C29710001463>
- Lucas JA, Hawkins NJ, Fraaije BA (2015) The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology* 90: 29-92 <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>
- Luck JE, Gillings MR (1995) Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. *Mycological Research* 99: 1483-1488. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80797-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80797-1)
- Luo C-X, Schnabel G (2008a) The cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 359-366. <https://doi.org/10.1128/aem.02159-07>
- Luo CX, Cox KD, Amiri A, Schnabel G (2008b) Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. *Plant Disease* 92(7): 1099-1103. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1099>
- Luo X, Cao J, Huang J, Wang Z, Guo Z, Chen Y, Ma S, Liu J. (2018) Genome sequencing and comparative genomics reveal the potential pathogenic mechanism of *Cercospora sojina* Hara on soybean. *DNA Research* 25(1): 25-37. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsx035>
- Lurá MC, Di Conza JA, González AM, Latorre Rapela MG, Turino L, Ibáñez MM, Iacona V (2007) Detection of genetic variability in *Cercospora kikuchii* isolates from a single soybean field. *Revista Argentina de Microbiología* 39: 11-14.
- Lurá MC, Latorre Rapela MG, Vaccari MC, Maumary R, Soldano A, Mattio M, González AM (2011) Genetic diversity of *Cercospora kikuchii* isolates from soybean cultured in Argentina as revealed by molecular markers and cercosporin production. *Mycopathologia* 171: 361-371. <https://doi.org/10.1007/s11046-010-9362-x>
- Lygin AV, Hill CB, Zernova OV, Crull L, Widholm JM, Hartman GL, Lozovaya VV (2010) Response of soybean pathogens to glyceollin. *Phytopathology* 100: 897-903. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-9-0897>
- Lygin AV, Zernova OV, Hill CB, Kholina NA, Widholm JM, Hartman GL, Lozovaya VV (2013) Glyceollin is an important component of soybean plant defense against *Phytophthora sojae* and *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 103(10): 984-94. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0328-R>

- Ma Z, Michailides TJ (2005) Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853–863. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.011>
- Ma Z, Proffer TJ, Jacobs JL, Sundin GW (2006) Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (*cyp51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2581-2585. <https://doi.org/10.1128/aem.72.4.2581-2585.2006>
- Magoc T, Salzberg S (2011) FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27: 2957-2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- McDonald MC, Renkin M, Spackman M, Orchard B, Croll D, Solomon PS, Milgate A (2019) Rapid Parallel Evolution of Azole Fungicide Resistance in Australian Populations of the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Applied and Environmental Microbiology* 85: e01908-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01908-18>
- McGrath MT (2012) Challenge of fungicide resistance and anti-resistance strategies in managing vegetable diseases in the USA. In: *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management* (ed. T.S. Thind). CAB International. pp. 191-207.
- Madden LV, Hughes G, van den Bosch F (2007) Temporal Analysis I: Quantifying and Comparing Epidemics. In: *The Study of Plant Disease Epidemics*. The American Phytopathological Society. Pages 63-116. Print ISBN: 978-0-89054-505-8
- Maiden MJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG (1998) Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *PNAS* 95: 3140-3145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
- Mair WJ, Thomas GJ, Dodhia K, Hills AL, Jayasena KW, Ellwood SR, Oliver RP, Lopez-Ruiz FJ (2020) Parallel evolution of multiple mechanisms for demethylase inhibitor fungicide resistance in the barley pathogen *Pyrenophora teres* f. sp. *maculata*. *Fungal Genetics and Biology* 145: 103475. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103475>
- Marinelli A, Cardetti C, March G, García J, Oddino C (2011a) Efecto del momento de cosecha sobre la calidad de la semilla de soja. *Proceedings of 2º Congreso Argentino de Fitopatología*. AAF, Mar del Plata. p. 312.
- Marinelli A, Mainardi A, March G, Oddino C, García J (2011b) Transmisión de *Cercospora kikuchii* (tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla) y su detección temprana en el cultivo. *Mercosoja* 2011. 14-16 septiembre. Rosario, Argentina.
- Marquardt H (1972) Spontaneous mutations in fungi. *Humangenetik* 16: 7-18. <https://doi.org/10.1007/BF00393979>
- Martin KF, Walters HJ (1982) Infection of soybean by *Cercospora kikuchii* as affected by dew temperature and duration of dew periods. *Phytopathology*. 72: 974 (abstract).
- Martins MC, Guerzoni RA, Câmara GMS, et al. (2004) Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. *Fitopatologia Brasileira* 29: 179-184. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582004000200009>
- Matsumoto T, Tomoyasu R (1925) Studies on the purple speck of soybean seed. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 1(6): 10.
- Matsumoto T, Tomoyasu R (1927) *Cercospora kikuchii* (T. Matsumoto & Tomoy.) M.W. Gardner. *Proceedings of the Indiana Academy of Science* 36: 242 (1926).

- McLean KS, Roy KW (1988) Purple seed stain of soybean caused by isolates of *Cercospora kikuchii* from weeds. Canadian Journal of Plant Pathology 10: 166-171. <https://doi.org/10.1080/07060668809501749>
- Mechan Llontop ME, Sharma P, Aguilera Flores M, et al. (2020) Strain-level identification of bacterial tomato pathogens directly from metagenomic sequences. Phytopathology 110(4): 768-779. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-19-0351-R>
- Mehl HL, Zhou T, Holshouser D (2015) Development and optimization of a weather-based decision aid for soybean foliar fungicide applications in Virginia. APS Annual Meeting, August 1-5, Pasadena, California, USA. 382-P. Disponible en: http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015_meeting_abstracts/aps2015abP424.htm
- Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL (2001) Identification of two different 14 α -sterol demethylase related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. Journal of Clinical Microbiology 39: 2431-2438. <https://doi.org/10.1128/jcm.39.7.2431-2438.2001>
- Mellado E, Garcia-Effron G, Buitrago MJ, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella A, Rodriguez-Tudela JL (2005) Targeted gene disruption of the 14- α sterol demethylase (*cyp51A*) in *Aspergillus fumigatus* and its role in azole drug susceptibility. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49: 2536-2538. <https://doi.org/10.1128/aac.49.6.2536-2538.2005>
- Mellado E, Alcazar-Fuoli L, Garcia-Effron G, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL (2006) New resistance mechanisms to azole drugs in *Aspergillus fumigatus* and emergence of antifungal drugs-resistant *A. fumigatus* atypical strains. Medical Mycology 44: 367-371. <https://doi.org/10.1080/13693780600902243>
- Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Melchers WJG, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL (2007) A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring *in vitro* cross-resistance to azole antifungal involves a combination of *cyp51A* alterations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51: 1897-1904. <https://doi.org/10.1128/aac.01092-06>
- Melouk HA, Banks DJ (1978) A Method of Screening Peanut Genotypes for Resistance to *Cercospora* Leafspot. Peanut Science 5: 112-114. <https://doi.org/10.3146/i0095-3679-5-2-14>
- Menezes M, Sila-Hanlin DMW (1997) Guia prático para fungos fitopatogênicos, Recife, Imprensa Universitária, UFRPE. 106 p.
- Mercado Cárdenas G, Chocobar M, Carmona M, Monge J (2011) Effect of phosphites on charcoal rot control in soybean. XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Bento Gonçalves RS, Publicado en Tropical Plant Pathology 36 (Suplemento), p. 942 agosto 2011.
- Mesarich CH, Stergiopoulos I, Beenen HG, Cordovez V, Guo Y, Karimi Jashni M, Bradshaw RE, de Wit PJ (2016) A conserved proline residue in Dothideomycete Avr4 effector proteins is required to trigger a Cf-4-dependent hypersensitive response. Molecular Plant Pathology 17(1): 84-95. <https://doi.org/10.1111/mpp.12265>
- Metzenberg RL, Glass LN (1990) Mating type and mating strategies in *Neurospora*. BioEssays 12(2): 53-59. <https://doi.org/10.1002/bies.950120202>
- Miguez M, Reeve C, Wood PM, Hollomon DW (2004) Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QoI fungicides. Pest Management Science 60: 3-7. <https://doi.org/10.1002/ps.837>
- Mikaberidze A, McDonald BA (2015) Fitness Cost of Resistance: Impact on Management. pp. 77-89. In: Ishii H, Hollomon WD (Eds.) Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to

- Practical Management. Springer Japan, ISBN: 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online).
- Milat ML, Prang C T, Ducrot PH, Tabet JC, Einhorn J, Blein JP, Lallemand JY (1992) Structures of the beticolins, the yellow toxins produced by *Cercospora beticola*. Journal of the American Chemical Society 114: 1478-1479. <https://doi.org/10.1021/ja00030a051>
- Milat ML, Blein JP, Einhorn J, Tabet JC, Ducrot PH, Lallemand JY (1993) The yellow toxins produced by *Cercospora beticola*. Part 11. Isolation and structure of beticolins 3 and 4. Tetrahedron Letters 34: 1483-1486. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)60324-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)60324-6)
- Milat M-L, Blein J-P (1995) *Cercospora beticola* toxins III. Purification, thin-layer and high performance liquid chromatographic analyses. Journal of Chromatography 699: 277–283. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00079-3](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00079-3)
- Miles TD, Miles LA, Fairchild KL, Wharton PS (2013) Screening and characterization of resistance to succinate dehydrogenase inhibitors in *Alternaria solani*. Plant Pathology 53: 155–164. <https://doi.org/10.1111/ppa.12077>
- Milgroom MG (1996) Recombination and the multilocus structure of fungal populations. Annual Review of Phytopathology 34: 457-477. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.457>
- Min B, Grigoriev IV, Choi I-G (2017) FunGAP: Fungal Genome Annotation Pipeline using evidence-based gene model evaluation, Bioinformatics 33(18): 2936–2937. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx353>
- MINAGRI (2020) Estimaciones agrícolas. SIIA Sistema integrado de información agropecuaria. Disponible en: <http://datosestimaciones.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>
- Miyamoto T, Ishii H, Seko T, Kobori S, Tomita Y (2009) Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. Plant Pathology 58: 1144–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02151.x>
- Miyamoto T, Ishii H, Stammler G, Koch A, Ogawara T, Tomita T, Fountaine J, Ushio T, Seko T, Kobori S (2010a) Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* strains resistant to boscalid. Plant Pathology 59: 873–881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02321.x>
- Miyamoto T, Ishii H, Tomita T (2010b) Occurrence of boscalid resistance in cucumber powdery mildew in Japan and molecular characterization of the iron-sulfur protein of succinate dehydrogenase of the causal fungus. Journal of General Plant Pathology 76: 261–267. <https://doi.org/10.1007/s10327-010-0248-z>
- Möbius N, Hertweck C (2009) Fungal phytotoxins as mediators of virulence. Current Opinion in Plant Biology 12: 390-398. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.004>
- Moore AL, Siedow JN (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics 1059(2): 121–140. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(05\)80197-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(05)80197-5)
- Moreira RR, Hamada NA, Peres NA, and May De Mio LL (2019) Sensitivity of the *Colletotrichum acutatum* species complex from apple trees in Brazil to dithiocarbamates, methyl benzimidazole carbamates, and quinone outside inhibitor fungicides. Plant Dis 103:2569-2576. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1144-RE>
- Morton V, Staub T (2008) A Short History of Fungicides. Online, APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeature-2008-0308

- Mosquera S, Chen L-H, Aegerter B, Miyao E, Salvucci A, Chang T-C, Epstein L, Stergiopoulos I (2019) Cloning of the Cytochrome b gene from the tomato powdery mildew fungus *Leveillula taurica* reveals high levels of allelic variation and heteroplasmy for the G143A mutation. *Frontiers in Microbiology* 10: 663. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00663>
- Mullins JGL, Parker JE, Cools HJ, Togawa RC, Lucas JA, Fraaije BA, Kelly DE, Kelly SL (2011) Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 6: e20973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020973>
- Mulrooney CA, O'Brien EM, Morgan BJ, Kozlowski MC (2012) Perylenequinones: Isolation, Synthesis, and Biological Activity. *European Journal of Organic Chemistry* 3887-3904. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200184>
- Munir M, Wang H, Agudelo P, Anco DJ (2020) Rapid detection of fungicide resistance phenotypes among populations of *Nothopassalora personata* in South Carolina peanut fields. *Plant Health Progress* 21: 123-132. <https://doi.org/10.1094/PHP-12-19-0087-RS>
- Murakishi HH (1951) Purple seed stain of soybean. *Phytopathology* 41: 305-318.
- Murataliev MB, Feyereisen R, Walker FA (2004) Electron transfer by diflavin reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1698: 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.10.003>
- Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, et al. (2000) A Whole-Genome Assembly of *Drosophila*. *Science* 287: 2196-2204. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2196>
- Nagel CM (1934) Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. *Phytopathology* 24: 1101–1110.
- Nakaune R, Adachi K, Nawata O, Tomiyama M, Akutsu K, Hibi T (1998) A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3983-3988. <https://doi.org/10.1128/aem.64.10.3983-3988.1998>
- Nance NW (1957) Some new and important plant disease occurrences and developments in the United States in 1956. *Plant Disease Reporter Supplement* 248, p. 123.
- Nikou DC, Malandrakis AA, Konstantakaki M, Vontas JG, Markoglou AN, Ziogas BN (2009) Molecular characterization and detection of overexpressed C-14 alpha-demethylase-based DMI resistance in *Cercospora beticola* field isolates. *Pestic Biochem Physiol* 95: 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.04.014>
- Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S (2020) Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology* 37: 101674. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>
- Nosanchuk JD, Casadevall A (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 5: 203–223. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x>
- Nosanchuk JD, Casadevall A (2006) Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 3519–3528. <https://doi.org/10.1128/aac.00545-06>
- Nosanchuk JD, Stark RE and Casadevall A (2015) Fungal Melanin: What do We Know About Structure? *Frontiers in Microbiology* 6: 1463. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01463>

- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28 (12): E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Nutter FW Jr, Gleason ML, Jenco JH, Christians NC (1993) Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. *Phytopathology* 83: 806-812. doi: 10.1094/Phyto-83-806
- Ogle DH, Wheeler P and Dinno A (2019) FSA: Fisheries Stock Analysis. R package version 0.8.24. <https://github.com/droglenc/FSA>.
- Oh JH, Kang NW (2002) Efficacy of fluazinam and iprodione+propineb in the suppression of *Diaporthe phaseolorum*, *Colletotrichum truncatum* and *Cercospora kikuchii*, the causal agents of seed decay in soybean. *The Plant Pathology Journal* 4: 216-220. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2002.18.4.216>
- Oliver RP (2014) A reassessment of the risk of rust fungi developing resistance to fungicides. *Pest Management Science* 70(11): 1641–1645. <https://doi.org/10.1002/ps.3767>
- Oliver RP, Hewitt HG (2014) Fungicides in crop protection. CABI 2nd edition. Wallingford, UK. p. 190.
- Oliveira SC, Castroagudin VL, Maciel JLN, Pereira DAS, Ceresini PC (2015) Resistência cruzada aos fungicidas IQo azoxistrobina e piraclostrobina no patógeno da brusone do trigo *Pyricularia oryzae* no Brasil. *Summa Phytopathologica* 41: 298-304. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2072>
- Orner VA, Cantonwine EG, Wang XM, Abouelleil A, Bochicchio J, Nusbaum C, Culbreath AK, Abdo Z, Arias RS (2015) Draft genome sequence of *Cercospora arachidicola*, the causal agent of early leaf spot in peanuts. *Genome Announcements* 3: e01281–e01215. <https://doi.org/10.1128/genomea.01281-15>
- Orth CE, Schuh W (1992) Histological comparison of latent and active infections of soybean foliage by *Cercospora kikuchii*. *Plant Disease* 82: 1159 (Abstract).
- Orth CE, Schuh W (1994) Resistance of 17 soybean cultivars to foliar, latent, and seed infection by *Cercospora kikuchii*. *Plant Disease* 78: 661-664. doi: 10.1094/PD-78-0661
- Park MJ, Back CG, Park JH (2020) Occurrence of Cercospora Leaf Spot caused by *Cercospora* cf. *flagellaris* on melon in Korea. *Mycobiology* 48(5): 418-422. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1792133>
- Parker JE, Warrilow AGS, Cools HJ, Martel CM, Nes WD, Fraaije BA, Lucas JA, Kelly DE, Kelly SL (2011) Mechanism of binding of prothioconazole to *Mycosphaerella graminicola* CYP51 differs from that of other azole antifungals. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 1460-1465. <https://doi.org/10.1128/aem.01332-10>
- Parker JE, Warrilow AG, Cools HJ, Fraaije BA, Lucas JA, Rigdova K, Griffiths WJ, Kelly DE, Kelly SL. (2013) Prothioconazole and prothioconazole-desthio activities against *Candida albicans* sterol 14- α -demethylase. *Appl Environ Microbiol* 79: 1639-1945. <https://doi.org/10.1128/AEM.03246-12>
- Pasche JS, Wharam CM, Gudmestad NC (2004) Shift in sensitivity of *Alternaria solani* in response to QoI fungicides. *Plant Disease* 88: 181-187. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.181>
- Pasche JS, Piche LM, Gudmestad NC (2005) Effect of the F129L Mutation in *Alternaria solani* on Fungicides Affecting Mitochondrial Respiration. *Plant Disease* 89: 269-278. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0269>
- Pathan MA, Sinclair JB, McClary RD (1989) Effects of *Cercospora kikuchii* on soybean seed germination and quality. *Plant Disease* 73: 720-723. doi: 10.1094/PD-73-0720

- Pérez-Hernández O, Sautua F, Ziegler V, Scandiani M, Carmona MA (2018) Novel, practical, and reliable method to assess intensity of *Cercospora* leaf blight in soybean. 2018. APS North Central Division Meeting, June 12-14, 2018 at the Radisson Hotel Fargo in Fargo, North Dakota.
- Pfeufer EE, Ngugi HK (2012) Orchard factors associated with resistance and cross resistance to sterol demethylation inhibitor fungicides in population of *Venturia inaequalis* from Pennsylvania. *Phytopathology* 102: 272-282. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-11-0117>
- Pildain MB, Vaamonde G, Cabral D (2004) Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *International Journal of Food Microbiology* 93: 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.007>
- Ploper LD, Abney S, Roy KW (1992) Influence of soybean genotype on rate of seed maturation and its impact on seedborne fungi. *Plant Disease* 76: 287-292. doi: 10.1094/PD-76-0287
- Ploper LD, Gálvez RM, González V, Jaldo H, Zamorano MA, Devani M (2001) Manejo de las enfermedades de fin de ciclo del cultivo de soja. *Avance Agroindustrial* 22(1): 20-26.
- Pöggeler S (2001) Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 589–601. <https://doi.org/10.1007/s002530100721>
- Price PP (2013) Sensitivity and resistance of *Cercospora kikuchii*, causal agent of *Cercospora* leaf blight and purple seed stain of soybean, to selected fungicides. LSU Doctoral Dissertations. 3593. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_dissertations/3593
- Price P, Purvis MA, Cai G, Padgett GB, Robertson CL, Schneider RW, Albu S (2015a) Fungicide resistance in *Cercospora kikuchii*, a soybean pathogen. *Plant Disease* 99: 1596-1603. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0782-RE>
- Price CL, Warrilow AGS, Parker JE, Mullins JGL, Nes WD, Kelly DE, Kelly SL (2015b) Novel substrate specificity and temperature-sensitive activity of *Mycosphaerella graminicola* CYP51 supported by the native NADPH cytochrome P450 reductase. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 3379-3386. <https://doi.org/10.1128/aem.03965-14>
- Qiu J, Xu J, Yu J, Bi C, Chen C, Zhou M (2011) Localisation of the benzimidazole fungicide binding site of *Gibberella zeae* β 2-tubulin studied by site-directed mutagenesis. *Pest Management Science* 67(2): 191–198. <https://doi.org/10.1002/ps.2050>
- Qiu J, Huang T, Xu J, Bi C, Chen C, Zhou M (2012) β -Tubulins in *Gibberella zeae*: their characterization and contribution to MBC resistance. *Pest Management Science* 68(8): 1191–1198. <https://doi.org/10.1002/ps.3283>
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>
- Radhakrishnan GV, Cook NM, Bueno-Sancho V, et al. (2019) MARPLE, a point-of-care, strain-level disease diagnostics and surveillance tool for complex fungal pathogens. *BMC Biology* 17(1): 65. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0684-y>
- Ramos M, Franco Tadic L, Cinto I, Carmona M, Gally M (2013) Molecular characterization of *Colletotrichum* species causing soybean anthracnose in Argentina. *Mycotaxon* 123: 457-465.
- Rangel LI, Spanner RE, Ebert MK, et al. (2020) *Cercospora beticola*: The intoxicating lifestyle of the leaf spot pathogen of sugar beet. *Molecular Plant Pathology* 21: 1020–1041. <https://doi.org/10.1111/mpp.12962>

- Rasanayagam MS, Paul ND, Royle DJ, Ayres PG (1995) Variation in responses of spores of *Septoria tritici* and *S. nodorum* to UV-B irradiation in vitro. *Mycological Research* 99: 1371-1377. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81224-0](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81224-0)
- Ravotti M, Simonetti E, Scandiani M, Luque A, Formento N, Carmona M (2012) Control in vitro de fitopatógenos habitantes del suelo que atacan al cultivo de soja mediante el uso de fosfitos. XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas JFA, 3, 4 y 5 Octubre 2012, Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. p 16.
- Reijo RA, Cooper EM, Beagle GJ, Huffaker TC (1994) Systematic mutational analysis of the yeast β -tubulin gene. *Molecular Biology of the Cell* 5: 29–43. <https://doi.org/10.1091/mbc.5.1.29>
- Reimann S, Deising HB (2005) Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3269–3275. <https://doi.org/10.1128/aem.71.6.3269-3275.2005>
- Reis EM, Reis AC, Carmona MA (2010) Manual de Fungicidas: Guia para o Controle Químico de Doenças de Plantas. Ed. Universidade de Passo Fundo, 6. ed., 226 p.
- Reis EM, Baruffi D, Remor L, Zanatta M (2011) Decomposition of corn and soybean residues under field conditions and their role as inoculum source. *Summa Phytopathologica* 37(1): 65-67. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052011000100011>
- Reis EM, Casa RT, Reis AC (2012) Septoriose da soja. En: Reis EM, Casa RT (eds.) Doenças da soja. Universidade de Passo Fundo, RS Brasil. pp. 179-190.
- Reis EM, Carmona MA (2013a) Classification of fungicides. pp. 91–104. In: Wheeler MN, Johnston BR (eds.) Fungicides: Classification, role in disease management and toxicity effects. New York, NY, Nova Science Publishers Inc. ISBN 9781629480435
- Reis EM, Carmona MA (2013b) Integrated disease management of Fusarium Head Blight. pp. 159-173. In: Aconada T, Chulze SN (eds.) Fusarium Head Bligh in Latin America. Editorial: Springer.
- Reis EM, Zanatta M, Carmona M, Menten JOM (2015) Relationship between IC50 determined in vitro / in vivo and the fungicide rate used in the field. *Summa Phytopathologica* 41: 49-53. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1997>
- Ringuelet JA, Viña SZ (2013) Productos naturales vegetales. 1a ed. Universidad Nacional de La Plata, La Plata. E-Book. ISBN 978-950-34-0971-8
- Ritz C, Streibig JC (2005) Bioassay Analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12: 1–22. <https://doi.org/10.18637/jss.v012.i05>
- Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D (2015) Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* 10: e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Robbertse B, van der Rijst M, van Aarde IMR, Lennox C, Crous PW (2001) DMI sensitivity and cross-resistance patterns of *Rhynchosporium secalis* isolates from South Africa. *Crop Protection* 20: 97-102. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00061-2)
- Rodrigues ML (2018) The Multifunctional Fungal Ergosterol. *mBio*. 9(5): e01755-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.01755-18>
- Rollins JA, Ehrenshaft M, Upchurch RG (1993) Effects of light- and altered-cercosporin phenotypes on gene expression in *Cercospora kikuchii*. *Canadian Journal of Microbiology* 39: 118-124. <https://doi.org/10.1139/m93-017>

- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA and Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rosenzweig N, Olaya G, Atallah ZK, Cleere S, Stanger C, Stevenson WR (2008) Monitoring and tracking changes in sensitivity to azoxystrobin fungicide in *Alternaria solani* in Wisconsin. *Plant Disease* 92: 555-560. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0555>
- Rossi RL (2003) First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the province of Misiones, Argentina. *Plant Disease* 87: 102-102. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.102A>
- Roure B, Baurain D, Philippe H (2013) Impact of missing data on phylogenies inferred from empirical phylogenomic data sets. *Molecular Biology and Evolution* 30(1): 197-214. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss208>
- Roy KW, Abney TS (1976) Purple seed stain of soybeans. *Phytopathology* 66: 1045-1049. doi: 10.1094/Phyto-66-1045
- Roy KW (1982) *Cercospora kikuchii* and other pigmented *Cercospora* species: Cultural and reproductive characteristics and pathogenicity to soybean. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 226-232. <https://doi.org/10.1080/07060668209501286>
- Rupe JC, Siegel MR, Hartman JR (1982) Influence of environment and plant maturity on grey leaf spot of corn caused by *Cercospora zea-maydis*. *Phytopathology* 72: 1587-1591. doi: 10.1094/Phyto-72-1587
- Russell PE (1995) Fungicide resistance: occurrence and management. *The Journal of Agricultural Science* 124: 317-323. <https://doi.org/10.1017/S0021859600073275>
- Russell P (2003a) Sensitivity baselines in fungicide resistance research and management. Ed: FRAC. Cambridge, UK. pp. 60.
- Russell P (2003b) Taking the path of least resistance – what resistance is, why it is a problem and what we can do to combat it. *Pesticide Outlook* 14(2): 57-61. <https://doi.org/10.1039/B302999A>
- Saccardo PA (1876) *Fungi Veneti novi vel critici*. Series V. *Nuovo Giornale Bot. Italiano* 8: 162–211.
- Sacristán S, García-Arenal F (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology* 9: 369-384. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00460.x>
- Sajeesh PK, Rao MSL, Shamarao J (2014) Screening of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes against purple seed stain and anthracnose disease. *Environment & Ecology* 32(3A): 1092-1095.
- Sakai Y (1999) Optimum timing of thiophanate-methyl application in the control of purple seed stain on soybean seed with consideration of development of resistance. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65: 510-514.
- Santos Rezende J, Zivanovic M, Costa de Novaes MI, Chen Z-Y (2020) The AVR4 effector is involved in cercosporin biosynthesis and likely affects the virulence of *Cercospora* cf. *flagellaris* on soybean. *Molecular Plant Pathology* 21: 53-65. <https://doi.org/10.1111/mpp.12879>
- Saupe (2000) Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 489-502. <https://doi.org/10.1128/mmlr.64.3.489-502.2000>
- Sautua F (2005) Enfermedades de fin de ciclo en soja: efecto de la aplicación de fungicida y fertilización potásica foliar sobre componentes del rendimiento. Tesis de grado, FAUBA, 52 p. Disponible en: <http://ri.agro.uba.ar/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=ti&d=cd496>

- Sautua F, Perez-Hernandez O, Carmona M, Scandiani M, Ziegler V (2018) Characterization of the temporal progress of soybean *Cercospora* leaf blight using a tactical on-plant-canopy method. APS North Central Division Meeting, June 12-14, 2018 at the Radisson Hotel Fargo in Fargo, North Dakota.
- Sautua FJ, Searight J, Doyle VP, Price PP III, Scandiani MM and Carmona MA (2019a) The G143A mutation confers azoxystrobin resistance to soybean *Cercospora* leaf blight in Bolivia. *Plant Health Progress* 20: 2-3. <https://doi.org/10.1094/PHP-10-18-0060-BR>
- Sautua S, Gonzalez S, Doyle V, Berretta M, Gordó M, Scandiani M, Rivarola M, Fernandez P, Carmona M (2019b) Draft genome sequence data of *Cercospora kikuchii*, a causal agent of *Cercospora* leaf blight and purple seed stain of soybeans. *Data in Brief* 27: 104693. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104693>
- Sautua FJ, Searight J, Doyle VP, Scandiani MM, Carmona MA (2020a) *Cercospora* cf. *nicotianae* is a causal agent of *Cercospora* Leaf Blight of soybean. *European Journal of Plant Pathology* 156: 1227–1231. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01969-z>
- Sautua FS, Doyle VP, Price PP III, Porfiri A, Fernandez P, Scandiani MM, Carmona MA (2020b) Fungicide resistance in *Cercospora* species causing *Cercospora* leaf blight and purple Purple seed stain of soybean in Argentina. *Plant Pathology* 69: 1678–1694. <https://doi.org/10.1111/ppa.13261>
- Scalliet G, Bowler J, Luksch T, Kirchhofer-Allan L, Steinhauer D, Ward K, Niklaus M, Verras A, Csukai M, Daina A, Fonné-Pfister R (2012) Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* 7(4): e35429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035429>
- Scandiani MM, Luque AG (2009) Identificación de patógenos en semilla de soja. *Análisis de Semillas. Suplemento Especial N° 2*. 148 p.
- Scandiani M, Ferri M, Ferrari B, et al. (2012) First Report of Races 11 and 12 of *Cercospora sojina*, the Causal Agent of Soybean Frogeye Leaf Spot, in Argentina. *Plant Disease* 96(7): 1067. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0154-PDN>
- Schmitz HK, Medeiros CA, Craig IR (2013) Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-outside-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Management Science* 70: 378-388. <https://doi.org/10.1002/ps.3562>
- Schnabel G, Jones AL (2001) The 14 α -demethylase (*cyp51A1*) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* 91: 102-110. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2001.91.1.102>
- Schnabel G, Amiri A, Brannen PM (2012) Field kit- and internet-supported fungicide resistance monitoring. 116-132 pp. In: Thind TS (ed.) *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management*. CAB International.
- Schnabel G, Hu M, Fernández-Ortuño (2015) Monitoring resistance by bioassay: relating results to field use using culturing methods. pp. 281-293. In: Ishii H, Hollomon DW (eds.) *Fungicide Resistance in plant pathogens. principles and a guide to practical management*. Springer Japan, ISBN: 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online).
- Schneider RW, Bollich PK, Harville BG (2003) Evaluation of soybean cultivars for reactions to three foliar diseases. *Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases* 18: P003. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2617-SR>
- Schneider RW, Robertson CL, Giles CG, Mumma EP (2005) Evaluation of fungicides, registered to control Asian soybean rust, for the control of *Cercospora* leaf blight, 2005. *Fungicide and Nematicide Tests* 61: FC015.

- Schroeder WT, Provvidenti R (1969) Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits. *Plant Disease Reporter* 53: 271-275.
- Schuh W (1991) Influence of temperature and leaf wetness period on conidial germination in vitro and infection of *Cercospora kikuchii* on soybean. *Phytopathology* 81:1315-1318. doi: 10.1094/Phyto-81-1315
- Schuh W (1992) Effect of pod developing stage, temperature, and pod wetness duration on the influence of purple seed stain of soybean. *Phytopathology* 82:446-451. doi: 10.1094/Phyto-82-446
- Schuh W (1993) Influence of interrupted dew periods, relative humidity, and light on disease severity and latent infections caused by *Cercospora kikuchii* on soybean. *Phytopathology* 83:109-113. doi: 10.1094/Phyto-83-109.
- Schumacher J (2016) DHN melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* is based on two developmentally regulated key enzyme (PKS)-encoding genes. *Molecular Microbiology* 99: 729-748. <https://doi.org/10.1111/mmi.13262>
- Selin C, de Kievit TR, Belmonte MF and Fernando WGD (2016) Elucidating the Role of Effectors in Plant-Fungal Interactions: Progress and Challenges. *Frontiers in Microbiology* 7: 600. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00600>
- Semar M, Strobel D, Koch A, Klappach K and Stammler G (2007) Field efficacy of pyraclostrobin against populations of *Pyrenophora teres* containing the F129L mutation in the cytochrome b gene. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114: 117. <https://doi.org/10.1007/BF03356718>
- Senesi SI, Dulce E, Daziano M, Ordoñez I, Moggi L (2016) La soja en Argentina: un sistema de agronegocios clave y competitivo. 1ra Ed. Buenos Aires, Bayer. ISBN 978-987-42-0867-5
- Serfling A, Wohlrab J, Deising HB (2007) Treatment of a clinically relevant plant pathogenic fungus with an agricultural azole causes cross-resistance to medical azoles and potentiates caspofungin efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 3672-3676. <https://doi.org/10.1128/aac.00654-07>
- Seyran M, Breneman TB, Stevenson KL (2010) *In vitro* toxicity of alternative oxidase inhibitors salicylhydroxamic acid and propyl gallate on *Fusicladium effusum*. *Journal of Pesticide Science* 83: 421-427. <https://doi.org/10.1007/s10340-010-0312-7>
- Sharon A, Yamaguchi K, Christiansen S, Horwitz BA, Yoder OC, Turgeon BG (1996) An asexual fungus has the potential for sexual development. *Molecular and General Genetics* 251(1): 60-68. <https://doi.org/10.1007/BF02174345>
- Shim WB, Dunkle LD (2002) Identification of genes expressed during cercosporin biosynthesis in *Cercospora zea-maydis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 237-248. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0437>
- Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, Tenzer I, Poirey S, Gisi U (2000a) Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc₁ enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science* 56: 833-841. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200010\)56:10<833::AID-PS200>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200010)56:10<833::AID-PS200>3.0.CO;2-Q)
- Sierotzki H, Wullschleger J, Gisi U (2000b) Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 68: 107-112. <https://doi.org/10.1006/pest.2000.2506>
- Sierotzki H, Frey R, Wullschleger J, Palermo S, Karlin S, Godwin J, Gisi U (2007) Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Management Science* 63: 225-233. <https://doi.org/10.1002/ps.1330>

- Sierotzki H, Scalliet G (2013) A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* 103: 880-887. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW>
- Sierotzki H (2015) Respiration Inhibitors: Complex III. pp. 119-143. In: Ishii H, Hollomon DW (eds.) *Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management*. Springer Japan, ISBN: 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online).
- Silva E (2014) Effects of Iron on Cercospora Leaf Blight of Soybean. Tesis de Maestria, Louisiana State University, Disponible en: http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-07022015-144703/unrestricted/SILVAEC_Thesis.pdf
- Silva EC, Chanda AK, Aroca TG, Robertson CL, Ward BM, Schneider RW (2014a) Foliar applications of iron suppress Cercospora leaf blight and increases yield in soybean. APS Annual Meeting, August 9-13, 2014, Minneapolis, Minnesota, USA. 233-P. Disponible: http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2014_meeting_abstracts/aps2014abP233.htm
- Silva E, Chanda A, Garcia T, Robertson C, Tubana E, Ward B, Schneider R (2014b) Management of Cercospora Leaf Blight of Soybean with Foliar Applications of Iron. Southern Soybean Disease Workers (p. Abst.). Pensacola, FL: SSDW.net
- Silva EC, Garcia TG, Lygin AV, Chanda AK, Robertson CL, Ward BM, Schneider RW (2015a) Cercosporin concentration and fungal biomass suggest two modes of pathogenesis for *Cercospora kikuchii* in soybean. APS Annual Meeting, August 1-5, 2015, Pasadena, California, USA. 35-P. Disponible: http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015_meeting_abstracts/aps2015abP488.htm
- Silva EC, Garcia TG, Lygin AV, Chanda AK, Robertson CL, Ward BM, Schneider RW (2015b) A new perspective on Cercospora leaf blight symptoms on soybean. In: Proc. South. Soybean Dis. Workers 40th Annu. Meet. Pensacola Beach, FL.
- Silva E, Garcia T, Chanda A, Robertson C, Lygin A, Ward B, Schneider R (2016) Two Symptoms of Cercospora Leaf Blight of Soybean: An Indication of Two Diseases Caused by the Same Pathogen. (Abs). *Phytopathology*, 106:S2.6.
- Silva EC, Abhayawardhana PL, Lygin AV, Robertson CL, Liu M, Liu Z, Schneider RW (2018) Coumestrol Confers Partial Resistance in Soybean Plants Against Cercospora Leaf Blight. *Phytopathology* 108: 935-947. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0189-R>
- Simon-Plas F, Gomes E, Milat M-L, Pugin A, Blein J-P (1996) *Cercospora beticola* toxins. Part X. Inhibition of plasma membrane H⁺-ATPase by beticolin-1. *Plant Physiology* 111: 773-779. <https://doi.org/10.1104/pp.111.3.773>
- Simonetti E, Pin Viso N, Montecchia M, Zilli C, Balestrasse K, Carmona M (2015) Evaluation of native bacteria and manganese phosphite for alternative control of charcoal root of soybean. *Microbiological Research* 180: 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.07.004>
- Sinclair JB (1991) Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease* 75: 220-222. doi: 10.1094/PD-75-0220
- Singh T, Sinclair JB (1986) Further studies on the colonization of soybean seeds by *Cercospora kikuchii* and *Phomopsis* sp. *Seed Science and Technology* 14: 71-77.
- Skinner W, Bailey A, Renwick A, Keon J, Gurr S, Hargreaves J (1998) A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* 34: 393-398. <https://doi.org/10.1007/s002940050412>

- Soares APG, Guillin EA, Borges LL, Silva ACTd, Almeida ÁMRd, Grijalba PE, et al. (2015) More Cercospora Species Infect Soybeans across the Americas than Meets the Eye. PLoS ONE 10(8): e0133495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133495>
- Solomon PS, Tan K-C, Oliver RP (2003) The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. Molecular Plant Pathology 4: 203-210. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00161.x>
- Spezzazzini C (1910) Mycetes Argentinenses; Anales del Museo Nacional de Historia Natural: Buenos Aires, Argentina.
- Srisombun S, Supapornhem P (1993) Inheritance of soybean resistance to purple seed stain. Soybean Genet Newsl. 20: 92–93.
- Stamatakis A (2014) RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30: 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stammler G, Brix HD, Glaettli A, Semar M, Schoeßl U (2007) Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. In: Proceedings of BCPC XVI international plant protection congress, Alton. British Crop Protection Council Publications, Hampshire, pp 16–21.
- Stammler G, Carstensen M, Koch A, Semar M, Strobel D, Schlehüßler S (2008) Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and -field efficacy. Crop Protection 27: 1448–1456. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.07.007>
- Stammler G, Glaettli A, Koch A (2010) Mutations in the target protein conferring resistance to SDHI fungicides. In: Dehne HW et al (eds) Modern fungicides and antifungal compounds V. 16th international Reinhardtsbrunn symposium 2010, pp 195–198.
- Stammler G, Rehfuß A, Prochnow J, Bryson R, Strobel D (2014) New findings on the development of insensitive isolates of *Pyrenophora teres* towards SDHI fungicides. Julius-Kühn-Archiv 447: 568.
- Stammler G, Wolf A, Glaettli A, Klappach K (2015) Respiration Inhibitors: Complex II. pp. 105-117. In: Ishii H, Hollomon DW (Eds.) Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management. Springer Japan, ISBN: 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online).
- Stanhope SA, Daida JM (1997) An individually variable mutation-rate strategy for genetic algorithms. In: Angeline PJ, Reynolds RG, McDonnell JR, Eberhart R (eds) Evolutionary Programming VI. EP 1997. Lecture Notes in Computer Science, vol 1213. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/BFb0014815>
- Staub T (1991) Fungicide resistance: practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. Annual Review of Phytopathology 29: 421-42. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.002225>
- Steffens JJ, Pell EJ, Tien M (1996) Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. Current Opinion in biotechnology 7: 348-355. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80043-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80043-7)
- Steinfeld U, Sierotzki H, Parisi S, Poirey S and Gisi U (2001) Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. Pest Management Science 57: 787-796. <https://doi.org/10.1002/ps.356>
- Steinfeld U, Sierotzki H, Parisi S, Gisi U (2002) Comparison of resistance mechanisms to strobilurin fungicides in *Venturia inaequalis*. In: Dehne HW, Gisi U, Kuck KH, Russel PE, Lyr H (eds) Modern fungicides and antifungal compounds III. AgroConcept, Bonn, pp 167–176

- Steinhauer D, Salat M, Frey R, et al. (2019) A dispensable paralog of succinate dehydrogenase subunit C mediates standing resistance towards a subclass of SDHI fungicides in *Zyoseptoria tritici*. *PLoS Pathog* 15(12): e1007780. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007780>
- Stergiopoulos I, van Nistelrooy JGM, Kema GHJ, De Waard MA (2003) Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 59: 1333–1343. <https://doi.org/10.1002/ps.766>
- Stergiopoulos I, de Wit PJ (2009) Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology* 47: 233–263. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.112408.132637>
- Stergiopoulos I, van den Burg HA, Okmen B, Beenen HG, van Lieere S, Kema GH, de Wit PJ (2010) Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *PNAS* 107(16): 7610-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002910107>
- Stuckey RE, Moore WF, Wrather JA (1984) Predictive systems for scheduling foliar fungicides on soybeans. *Plant Disease* 68(8): 743-744.
- Sun X, Xu Q, Ruan R, Zhang T, Zhu C, Li H (2013) PdMLE1, a specific and active transposon acts as a promoter and confers *Penicillium digitatum* with DMI resistance. *Environmental Microbiology Reports* 5: 135-142. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12012>
- Suzuki K (1921) Studies on the cause of "Shihan" of soybean. *Chosen Nokaiho* 16: 24-28.
- Świdarska-Burek U, Daub ME, Thomas E, Jaszek M, Pawlik A, Janusz G (2020) Phytopathogenic Cercosporoid Fungi—From Taxonomy to Modern Biochemistry and Molecular Biology. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 8555. <https://doi.org/10.3390/ijms21228555>
- Swoboda C, Pedersen P (2009) Effect of Fungicide on Soybean Growth and Yield. *Agronomy Journal* 101: 352-356. <https://doi.org/10.2134/agronj2008.0150>
- Talas F, McDonald BA (2015) Significant variation in sensitivity to a DMI fungicide in field populations of *Fusarium graminearum*. *Plant Pathology* 64: 664-670. <https://doi.org/10.1111/ppa.12280>
- Tarailo-Graovac M, Chen N (2004) Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences. *Current Protocols in Bioinformatics* 25: 4.10.1-4.10.14. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0410s25>
- Taylor JW, Fisher MC (2003) Fungal multilocus sequence typing — it's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology*: 6: 351–356. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00088-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00088-2)
- Tekrony DM, Stuckey R, Egli DB, Tomes L (1985) Effectiveness of a point system for scheduling foliar fungicides in soybean seed fields. *Plant Disease* 69: 962-965. doi: 10.1094/PD-69-962
- ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ (2014) Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology* 143(4): 419–435. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411164>
- Thind TS, Hollomon DW (2018) Thiocarbamate fungicides: reliable tools in resistance management and future outlook. *Pest Management Science* 74: 1547-1551. <https://doi.org/10.1002/ps.4844>
- Thomas E, Herrero S, Eng H, Goma N, Gillikin J, Noar R, et al. (2020) Engineering *Cercospora* disease resistance via expression of *Cercospora nicotianae* cercosporin-resistance genes and silencing of cercosporin production in tobacco. *PLoS ONE* 15(3): e0230362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230362>
- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T (2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 3: 877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>

- Torriani SF, Brunner PC, McDonald BA, Sierotzki H (2009) QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 65(2): 155-162. <https://doi.org/10.1002/ps.1662>
- Torriani SFF, Penselin D, Knogge W, et al. (2014) Comparative analysis of mitochondrial genomes from closely related *Rhynchosporium* species reveals extensive intron invasion. *Fungal Genetics and Biology* 62: 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.11.001>
- Trumpower BL (1990) Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. *Microbiological Reviews* 54: 101–129.
- Turgeon BG, Bohlmann H, Ciuffetti LM, Christiansen SK, Yang G, Schafer W, Yoder OC (1993) Cloning and analysis of the mating type genes from *Cochliobolus heterostrophus*. *Molecular and General Genetics* 238: 270-284. <https://doi.org/10.1007/BF00279556>
- Turgeon BG (1998) Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology* 36: 115-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.115>
- Turgeon BG, Yoder OC (2000) Proposed Nomenclature for Mating Type Genes of Filamentous Ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 31: 1–5. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1227>
- Turner RE, Ebelhar MW, Wilkerson T, Bellaloui N, Golden BR, Irby JT, Martin S (2020) Effects of Purple Seed Stain on Seed Quality and Composition in Soybean. *Plants* 9: 993. <https://doi.org/10.3390/plants9080993>
- Upchurch RG, Walker DC, Rollins JA, Ehrenshaft M, Daub ME (1991a) Mutants of *Cercospora kikuchii* altered in cercosporin synthesis and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology* 57(10): 2940-2945. <https://doi.org/10.1128/aem.57.10.2940-2945.1991>
- Upchurch RG, Ehrenshaft M, Walker LDC, Sanders LA (1991b) Genetic transformation system for the fungal soybean pathogen *Cercospora kikuchii*. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2935-2939. <https://doi.org/10.1128/aem.57.10.2935-2939.1991>
- Upchurch RG, Rose MS, Eweida M, Callahan TM (2002) Transgenic assessment of CFP-mediated cercosporin export and resistance in a cercosporin-sensitive fungus. *Current Genetics* 41: 25–30. <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0280-4>
- Upchurch RG, Ramirez ME (2010) Defense-related gene expression in soybean leaves and seeds inoculated with *Cercospora kikuchii* and *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 75: 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2010.08.007>
- U.S. Food and Drug Administration (2001) Bacteriological analytical manual, online. AOAC International, Gaithersburg, Md. Available at: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam> [Accessed 20 May 2020].
- USDA (2016) Oilseeds: World Markets and Trade. Disposition en: <http://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>
- Vaghefi N, Hay FS, Kikkert JR, Pethybridge SJ (2016) Genotypic Diversity and Resistance to Azoxystrobin of *Cercospora beticola* on Processing Table Beet in New York. *Plant Disease* 100: 1466-1473. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1014-RE>
- Vaghefi, N., Shivas, R.G., Sharma, S. et al. (2021) Phylogeny of cercosporoid fungi (Mycosphaerellaceae, Mycosphaerellales) from Hawaii and New York reveals novel species within the *Cercospora beticola* complex. *Mycological Progress* 20: 261–287. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01666-z>

- Vale PAS, de Resende MLV, dos Santos Botelho DM, et al. (2021) Epitypification of *Cercospora coffeicola* and its involvement with two different symptoms on coffee leaves in Brazil. *Eur J Plant Pathol* 159: 399–408. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02170-y>
- van den Berg F, van den Bosch F, Paveley ND (2013) Optimal fungicide application timings for disease control are also an effective anti-resistance strategy: A case study for *Zymoseptoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) on wheat. *Phytopathology* 103: 1209-1219. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-13-0061-R>
- van den Bosch F, Paveley N, Shaw M, Hobbelen P, Oliver R (2011) The dose rate debate: does the risk of fungicide resistance increase or decrease with dose? *Plant Pathology* 60: 597–606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02439.x>
- van den Bosch F, Oliver R, van den Berg F, Paveley N (2014a) Governing Principles Can Guide Fungicide-Resistance Management Tactics. *Annual Review of Phytopathology* 52: 175–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050158>
- van den Bosch F, Paveley N, van den Berg F, Hobbelen P, Oliver R (2014b) Mixtures as a fungicide resistance management tactic. *Phytopathology* 104: 1264-1273. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-14-0121-RVW>
- van den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MH, Vervoort J, de Wit PJ (2006) *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 19(12):1420-30. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1420>
- Van de Wouw AP, Howlett BJ (2012) Estimating frequencies of virulent isolates in field populations of a plant pathogenic fungus, *Leptosphaeria maculans*, using high-throughput pyrosequencing. *Journal of Applied Microbiology* 113: 1145-1153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05413.x>
- Van der Auwera GA, O'Connor BD (2020) *Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra* (1st Edition). O'Reilly Media. ISBN-13 : 978-1491975190
- van Esse HP, Bolton MD, Stergiopoulos I, de Wit PJ, Thomma BP (2007) The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(9): 1092-101. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-9-1092>
- Vanderplank JE (1968) *Disease Resistance in Plants*. New York: Academic Press.
- Vanlerberghe GC (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 703–734. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.703>
- Vanlerberghe GC (2013) Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 6805-6847. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>
- Vasconcelos IM, Morais JKS, Siebra EA, Carlini CR, Sousa DOB, Beltramini LM, Melo VMM, Oliveira JTA (2008) SBTX, a new toxic protein distinct from soyatoxin and other toxic soybean [*Glycine max*] proteins, and its inhibitory effect on *Cercospora sojina* growth. *Toxicon* 51, Issue 6: 952-963. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.10.005>
- Vathakos MG, Walters HJ (1979) Production of conidia by *Cercospora kikuchii* culture. *Phytopathology* 69: 832-833. doi: 10.1094/Phyto-69-832
- Velicheti RK, Sinclair JB (1994) Production of cercosporin and colonization of soybean seed coats by *Cercospora kikuchii*. *Plant Disease* 78: 342-346. doi: 10.1094/PD-78-0342

- Veloukas T, Leroch M, Hahn M, Karaoglanidis GS (2011) Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease* 95: 1302–1307. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0317>
- Veloukas T, Markoglou AN, Karaoglanidis GS (2013) Differential effect of SdhB gene mutations on the sensitivity to SDHI fungicides in *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 97: 118–122. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0322-RE>
- Veloukas T, Kalogeropoulou P, Markoglou A, Karaoglanidis G (2014) Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field-isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several *sdhB* and the *cytb* G143A mutations. *Phytopathology* 104: 347–356. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0208-R>
- Vielba-Fernández A, Bellón-Gómez D, Torés JA, de Vicente A, Pérez-García A, Fernández-Ortuño D (2018) Heteroplasmy for the Cytochrome b Gene in *Podosphaera xanthii* and its Role in Resistance to QoI Fungicides in Spain. *Plant Disease* 102: 1599-1605. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-17-1987-RE>
- Vieira BS, da Silva NA, Firmino AL, et al. (2019) *Cercospora brachiata* on slender amaranth (*Amaranthus viridis*) in Brazil. *Australasian Plant Dis. Notes* 14: 6. <https://doi.org/10.1007/s13314-019-0339-4>
- Vishnoi VK, Kumar K, Kumar B (2020) Plant disease detection using computational intelligence and image processing. *Journal of Plant Diseases and Protection*. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00368-0>
- Waalwijk C, Mendes O, Verstappen ECP, de Waard MA, Kema GHJ (2002) Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat septoria leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* 35: 277–286. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1322>
- Walters HJ (1980) Soybean leaf blight caused by *Cercospora kikuchii*. *Plant Disease* 64: 961-962. <https://doi.org/10.1094/PD-64-961>
- Wang B, Dukarevich M, Sun EL, Yen MR, Saier Jr. MH (2009) Membrane Porters of ATP-Binding Cassette Transport Systems Are Polyphyletic. *Journal of Membrane Biology* 231: 1. <https://doi.org/10.1007/s00232-009-9200-6>
- Ward BM, Robertson C, Schneider R, Silva E, Albu S (2013) Effects of minor elements on *Cercospora* leaf blight of soybean and production of cercosporin. APS Annual Meeting, August 10-14, 2013, Austin, Texas, USA. 246-P. Disponible: http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2013_Meeting_Abstracts/aps2013abP246.htm
- Ward BM (2015) Effects of minor elements on *Cercospora kikuchii*, *Cercospora* leaf blight and rust on soybeans. MSc. Thesis, Louisiana State University. 83pp.
- Ward NA, Schneider RW, Chanda A, Silva EC, Price PP, Cai G (2015) *Cercospora* leaf blight and purple seed stain. In *Compendium of Soybean Diseases and Pests*. 5th Edition. Eds. Hartman GL, Rupe JC, Sikora EJ, Domier LL, Davis JA and Steffey KL. pp 37-41.
- Ward BM, Shrestha BK, Allen TW, Buckley B, Chen P, Clubb M, Mozzoni LA, Orazaly M, Florez L, Moseley D, Rupe JC, Gentimis T, Price III PP (2021) Evaluating *Cercospora* leaf blight resistance in soybean accessions using an improved categorical disease-evaluation scale. *Journal of Crop Improvement*. <https://doi.org/10.1080/15427528.2020.1865226>
- Weiland JJ, Chung K-R, Suttle JC (2010) The role of cercosporin in the virulence of *Cercospora* spp. to plant hosts. In: *Cercospora Leaf Spot of Sugar Beet and Related Species* (Lartey RT, Weiland JJ, Panella L, Crous PW, Windels CE, eds). APS Press, Minnesota USA: 39–53.

- Wheeler MH, Bell AA (1988) Melanins and Their Importance in Pathogenic Fungi. In: McGinnis M.R. (eds) Current Topics in Medical Mycology. Current Topics in Medical Mycology, vol 2. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3730-3_10
- White TJ (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications.
- Wieczorek TM, Berg G, Semaškienė R, Mehl A, Sierotzki H, Stammer G, Justesen AF, Jørgensen LN (2015) Impact of DMI and SDHI fungicides on disease control and CYP51 mutations in populations of *Zymoseptoria tritici* from Northern Europe. European Journal of Plant Pathology 143: 861–871. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0737-1>
- Wilcox JR, Abney TS (1973) Effects of *Cercospora kikuchii* on soybeans. Phytopathology 63: 796-797. doi: 10.1094/Phyto-63-796
- Wilcox JR, Laviolette FA, Martin RJ (1975) Heritability of purple seed stain resistance in soybean. Crop Science 15: 525–526. <https://doi.org/10.2135/cropsci1975.0011183X001500040022x>
- Wilken PM, Aylward J, Chand R, et al. (2020) IMA Genome - F13: Draft genome sequences of *Ambrosiella cleistominuta*, *Cercospora brassicicola*, *C. citrullina*, *Phyrcia stellaris*, and *Teratosphaeria pseudoecalypti*. IMA Fungus. 11:19. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00039-7>
- Wilson AM, Gabriel R, Singer SW, Schuerg T, Wilken PM, van der Nest MA, Wingfield MJ, Wingfield BD (2021) Doing it alone: Unisexual reproduction in filamentous ascomycete fungi. Fungal Biology Reviews 35: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.12.003>
- Wingfield BD, Berger DK, Steenkamp ET, Lim HJ, Duong TA, Bluhm BH, De Beer ZW, De Vos L, Fourie G, Naidoo K, Olivier N (2017) IMA genome-F 8. Draft genome of *Cercospora zeina*, *Fusarium pininemorale*, *Hawksworthiomyces lignivorus*, *Huntia decipiens*, and *Ophiostoma ips*. IMA Fungus 8: 385–396. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.10>
- Wise KA, Bradley CA, Pasche JS, Gudmestad NC, Dugan FM, Chen W (2008) Baseline sensitivity of *Ascochyta rabiei* to azoxystrobin, pyraclostrobin, and boscalid. Plant Disease 92: 295-300. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-2-0295>
- Wise KA, Bradley CA, Pasche JS, Gudmestad NC (2009) Resistance to QoI fungicides in *Ascochyta rabiei* from chickpea in the northern Great Plains. Plant Disease 93: 528-536. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-5-0528>
- Wood HM, Dickinson MJ, Lucas JA, Dyer PS (2001) Cloning of the CYP51 gene from the eyespot pathogen *Tapesia yallundae* indicates that resistance to the DMI fungicide prochloraz is not related to sequence changes in the gene encoding the target site enzyme. FEMS Microbiology Letters 196: 183–187. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10562.x>
- Wood PM, Hollomon DW (2003) A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of Complex III. Pest Management Science 59: 499-511. <https://doi.org/10.1002/ps.655>
- Wrather JA, Sweets L (2000) Point system to determine the advisability of spraying soybeans with a foliar fungicide. Soybean disease Management. Agricultural UM Guide. University of Missouri-Columbia. Available at <http://muextension.missouri.edu/xplor> (verified Sept. 2012).
- Wrather JA, Anderson TR, Arsyad DM, Gai J, Ploper LD, Porta-Puglia A, Ram HH, Yorinori JT (1997) Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. Plant Disease 81: 107-110. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.1.107>

- Wrather JA, Anderson TR, Arsyad DM, Tan Y, Ploper LD, Porta-Puglia A, Ram HH, Yorinori JT (2001) Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 115-121. <https://doi.org/10.1080/07060660109506918>
- Wrather JA, Shannon G, Balardin R, Carregal L, Escobar R, Gupta GK, Ma Z, Morel W, Ploper D, Tenuta A (2010) Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries in 2006. *Plant Health Progress* (Online). <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-0125-01-RS>
- Wu MY, Mead ME, Lee MK, Ostrem Loss EM, Kim SC, Rokas A, Yu JH (2018) Systematic dissection of the evolutionarily conserved WetA developmental regulator across a genus of filamentous fungi. *mBio* 9(4): e01130-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.01130-18>
- Wyand RA, Brown JKM (2005) Sequence variation in the *CYP51* gene of *Blumeria graminis* with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. *Fungal Genetics and Biology* 42: 726-735. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.04.007>
- Xavier SA, Canteri MG, Barros DCM, Godoy CV (2013) Sensitivity of *Corynespora cassiicola* from soybean to carbendazim and prothioconazole. *Tropical Plant Pathology* 38(5): 431-435. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013005000020>
- Xavier SA, Koga LJ, Barros DCM, Canteri MG, Lopes ION, Godoy CV (2015) Variação da sensibilidade de populações de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas inibidores da desmetilação no Brasil. *Summa Phytopathologica* 41(3): 191-196. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2068>
- Yarden O, Katan T (1993) Mutation leading to substitutions at aminoacids 198 and 200 of beta-tubulin that correlated with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83: 1478–1483. doi: 10.1094/Phyto-83-1478
- Yamazaki S, Ogawa T (1972) The chemistry and stereochemistry of cercosporin. *Agricultural and Biological Chemistry* 36: 1707–1718. <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860458>
- Yamazaki S, Okube A, Akiyama Y, Fuwa K (1975) Cercosporin, a novel photodynamic pigment isolated from *Cercospora kikuchii*. *Agricultural and Biological Chemistry* 39: 287–288. <https://doi.org/10.1080/00021369.1975.10861593>
- Yan L, Yang Q, Zhou Y, Duan X, Ma Z (2009) A real-time PCR assay for quantification of the Y136F allele in the *CYP51* gene associated with *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* resistance to sterol demethylase inhibitors. *Crop Protection* 28: 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.12.011>
- Yan X, Ma W-B, Wang H, Que Y-W, Ma Z-H, Talbot NJ, Wang Z-Y (2011) A sterol 14 α -demethylase is required for conidiation and for mediating sensitivity to sterol demethylation inhibitors by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 48: 144-153. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.09.005>
- Yang H, Tong J, Lee C, et al. (2015) Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2. *Nature Communications* 6: 6129. <https://doi.org/10.1038/ncomms7129>
- Yang L, He M, Ouyang H, et al. (2019) Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiol* 19: 205. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>
- Yeh CC, Sinclair JB (1980) Sporulation and variation in size of conidia and conidiophores among five isolates of *Cercospora kikuchii*. *Plant Disease* 64: 373-374. doi: 10.1094/PD-64-373
- Yorinori JT (2011) Dfc e Mancha alvo. 5° Congreso de la Soja del Mercosur, Mercosoja 2011 pp 1- 4.
- Yoshino K, Irieda H, Sugimoto F, Yoshioka H, Okuno T, Takano Y (2012) Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by

- a homologue of CgDN3. *Mol Plant Microbe Interact.* 2012 May;25(5):625-36. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-11-0316>
- You BJ, Lee MH, Chung KR (2008) Production of cercosporin toxin by the phytopathogenic *Cercospora* fungi is affected by diverse environmental signals. *Canadian Journal of Microbiology* 54(4): 259-269. <https://doi.org/10.1139/W08-002>
- Young JR, Tomaso-Peterson M, Tredway LP, de la Cerda K (2010) Occurrence and Molecular Identification of Azoxystrobin-Resistant *Colletotrichum cereale* Isolates from Golf Course Putting Greens in the Southern United States. *Plant Disease* 94: 751-757. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0751>
- Young DH (2015) Anti-tubulin agents. pp. 93-103. In: Ishii H, Hollomon DW (Eds.) *Fungicide resistance in plant pathogens. Principles and a guide to practical management.* Springer Japan, ISBN: 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online).
- Yun S-H, Berbee ML, Yoder Oc, Turgeon BG (1999) Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *PNAS* 96: 5592–5597. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5592>
- Yun Y, Yin D, Dawood DH, Liu X, Chen Y, Ma Z (2014) Functional characterization of FgERG3 and FgERG5 associated with ergosterol biosynthesis, vegetative differentiation and virulence of *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 68: 60-70. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.04.010>
- Yuan S, Zhou M (2005) A major gene for resistance to carbendazim, in field strains of *Gibberella zeae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27: 58–63. <https://doi.org/10.1080/07060660509507194>
- Zaccaron AZ, Ridenour J, Smith J, Sharma S, Lawson N, Zaccaron ML, Fakhoury A, Bluhm BH (2015) Molecular mechanisms of *Cercospora* pathogenicity revealed through comparative genomics. APS Annual Meeting, August 1-5, Pasadena, California, USA. 772-P. Disponible en: http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015_meeting_abstracts/aps2015abP756.htm
- Zamora-Sequeira R, Alvarado-Hidalgo F, Robles-Chaves D, Sáenz-Arce G, Avendano-Soto ED, Sánchez-Kopper A, Starbird-Perez R (2019) Electrochemical Characterization of Mancozeb Degradation for Wastewater Treatment Using a Sensor Based on Poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) Modified with Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles. *Polymers* 11(9): 1449. <https://doi.org/10.3390/polym11091449>
- Zähringer U, Schaller E, Grisebach H (1980) Induction of phytoalexin synthesis in soybean. Structure and reactions of naturally occurring and enzymatically prepared prenylated pterocarpan from elicitor-treated cotyledons and cell cultures of soybean. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* 36: 234-241.
- Zeng F, Arnao E, Zhang G, Olaya G, Wullschleger J, Sierotzki H, Ming R, Bluhm BH, Bond JP, Fakhoury AM, Bradley CA (2015) Characterization of quinone outside inhibitor fungicide resistance in *Cercospora sojina* and development of diagnostic tools for its identification. *Plant Disease* 99(4): 544-550. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0460-RE>
- Zhan J, Kema GHJ, Waalwijk C, McDonald BA (2002) Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to continents. *Fungal Genetics and Biology* 31: 7-20. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00013-0](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00013-0)
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7(1-2): 203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>
- Zhang GR (2012) *Cercospora sojina*: over-winter survival and fungicide resistance. PhD Thesis, University of Illinois. 117pp.

- Zhang GR, Newman MA, Bradley CA (2012a) First report of the soybean frog-eye leaf spot fungus (*Cercospora sojina*) resistant to quinone outside inhibitor fungicides in North America. *Plant Disease* 96(5): 767. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-11-0915-PDN>
- Zhang GR, Pedersen DK, Phillips DV, Bradley CA (2012b) Sensitivity of *Cercospora sojina* isolates to quinone outside inhibitor fungicides. *Crop Protection* 40: 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.04.025>
- Zhang Y, Lu J, Wang J, Zhou M, Chen C (2015) Baseline sensitivity and resistance risk assessment of *Rhizoctonia cerealis* to thifluzamide, a succinate dehydrogenase inhibitor. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 124: 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.05.004>
- Zheng W, Zhao X, Xie Q, Huang Q, Zhang C, Zhai H, et al. (2012) A conserved homeobox transcription factor htfl is required for phialide development and conidiogenesis in *Fusarium* species. *PLoS ONE* 7(9): e45432. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045432>
- Zhu Y, Liang X, Li Y, Duan Y, Zheng Z, Wang J, Zhou M (2018) F240 of β 2-tubulin explains why *Fusarium graminearum* is less sensitive to carbendazim than *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 108(3): 352-361. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0295-R>
- Zhu J, Zhang L, Li T, Ma D, Gao Y, Mu W, Liu F (2020) Baseline sensitivity of *Corynespora cassiicola* to metconazole and efficacy of this fungicide. *Crop Protection* 130: 105056. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105056>
- Ziogas BN, Baldwin BC, Young JE (1997) Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science* 50: 28-34. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199705\)50:1<28::AID-PS555>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199705)50:1<28::AID-PS555>3.0.CO;2-1)
- Ziogas BN, Malandrakis AA (2015) Sterol biosynthesis inhibitors: C14 demethylation (DMIs). pp. 199-216. In: Ishii H, Hollomon DW (Eds.) *Fungicide resistance in plant pathogens. Principles and a guide to practical management*. Springer Japan, ISBN: 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online). https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_13
- Zwiers LH, Stergiopoulos I, Van Nistelrooy JGM, De Waard MA (2002) ABC transporters and azole susceptibility in laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 3900–3906. <https://doi.org/10.1128/aac.46.12.3900-3906.2002>

ANEXO I

Tabla 42. Información del año, origen botánico y geográfico para el total de aislados de *Cercospora* spp. realizados en la presente tesis.

| N° | Año | N° ID | Variedad | Origen botánico | Region | Localidad | Provincia | País | Latitud | Longitud |
|----|------|-------|-----------------|-----------------|--------|--------------|-----------|-----------|----------|----------|
| 1 | 2012 | 1 | LAE06900101noRR | S | C | Parana | E Rios | Argentina | -31.8519 | -60.5271 |
| 2 | 2014 | 1 | S/D | S | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9501 | -60.5688 |
| 3 | 2015 | 181 | ACA4550RR | S | C | Parana | E Rios | Argentina | -31.8529 | -60.5274 |
| 4 | 2015 | 214 | LAE0686901noRR | S | C | Parana | E Rios | Argentina | -31.8538 | -60.5279 |
| 5 | 2015 | 230 | J1011082019 RR | S | C | Parana | E Rios | Argentina | -31.8534 | -60.5259 |
| 6 | 2015 | 233 | S/D | S | C | Parana | E Rios | Argentina | -31.8544 | -60.5263 |
| 7 | 2015 | 166 | S/D | S | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9532 | -60.5687 |
| 8 | 2015 | 168 | S/D | S | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9532 | -60.0514 |
| 9 | 2015 | 171 | S/D | S | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9365 | -60.5515 |
| 10 | 2015 | 173 | S/D | S | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9426 | -60.5533 |
| 11 | 2015 | 176 | S/D | S | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9441 | -60.5526 |
| 12 | 2015 | 177 | S/D | S | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -34.0500 | -60.5000 |
| 13 | 2015 | 243 | NS 5009 | S | C | Santa Regina | Bs As | Argentina | -34.4546 | -63.3294 |
| 14 | 2015 | 245 | NS 5009 | S | C | Bell Ville | Cordoba | Argentina | -32.4671 | -62.5018 |
| 15 | 2015 | 248 | NS 4313 | S | C | Bell Ville | Cordoba | Argentina | -32.5280 | -62.5523 |
| 16 | 2015 | 250 | DM 5351 | S | C | La Carlota | Cordoba | Argentina | -33.4550 | -63.3631 |
| 17 | 2015 | 251 | NS 5009 | S | C | La Carlota | Cordoba | Argentina | -33.5903 | -63.1831 |
| 18 | 2015 | 252 | NS 4413 | S | C | Laboulaye | Cordoba | Argentina | -33.8836 | -63.3568 |
| 19 | 2015 | 255 | NS 5009 | S | C | Arias | Cordoba | Argentina | -33.5792 | -62.4137 |
| 20 | 2015 | 257 | LDC 5.3 | S | C | Canals | Cordoba | Argentina | -33.5203 | -62.9541 |
| 21 | 2015 | 261 | NS 5509 | S | C | Canals | Cordoba | Argentina | -33.5177 | -62.9672 |
| 22 | 2015 | 265 | DS 1505 | S | C | Laboulaye | Cordoba | Argentina | -34.2053 | -63.4844 |

| | | | | | | | | | | |
|----|------|----|---------------|---|----|---------------|----------|-----------|----------|----------|
| 23 | 2016 | 1 | LT 4914 ipro | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4197 | -61.1900 |
| 24 | 2016 | 1 | LT 4914 ipro | P | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4197 | -61.1900 |
| 25 | 2016 | 2 | LT 4914 ipro | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4189 | -61.1908 |
| 26 | 2016 | 3 | LT 4914 ipro | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4183 | -61.1913 |
| 27 | 2016 | 4 | NS 4619 ipro | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4201 | -61.1849 |
| 28 | 2016 | 5 | NS 4619 ipro | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4199 | -61.1845 |
| 29 | 2016 | 6 | FN 4.5 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4198 | -61.1845 |
| 30 | 2016 | 7 | FN 4.5 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4200 | -61.1851 |
| 31 | 2016 | 8 | LT 4914 ipro | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4222 | -61.1836 |
| 32 | 2016 | 9 | LT 4914 ipro | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4225 | -61.1837 |
| 33 | 2016 | 10 | DM 3810 | H | C | America | Bs As | Argentina | -35.4136 | -63.0394 |
| 34 | 2016 | 12 | DM 3810 | H | C | America | Bs As | Argentina | -35.5963 | -62.9838 |
| 35 | 2016 | 13 | DM 3810 | H | C | America | Bs As | Argentina | -35.5979 | -62.9996 |
| 36 | 2016 | 14 | LDC 3.7 RR1 | H | C | Herrera Vegas | Bs As | Argentina | -36.1356 | -61.5171 |
| 37 | 2016 | 15 | LDC 3.7 RR1 | H | C | Herrera Vegas | Bs As | Argentina | -36.1357 | -61.5170 |
| 38 | 2016 | 16 | LDC 3.7 RR1 | H | C | Herrera Vegas | Bs As | Argentina | -36.1357 | -61.5172 |
| 39 | 2016 | 17 | LDC 3.7 RR1 | H | C | Herrera Vegas | Bs As | Argentina | -36.1358 | -61.5171 |
| 40 | 2016 | 19 | DM 2200 | H | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.3403 | -59.2946 |
| 41 | 2016 | 20 | DM 2200 | H | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.3403 | -59.2922 |
| 42 | 2016 | 23 | DM 2200 | H | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.3118 | -59.2481 |
| 43 | 2016 | 24 | DM 2200 | H | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.3153 | -59.2433 |
| 44 | 2016 | 37 | S/D | H | SE | Necochea | Bs As | Argentina | -38.3674 | -58.6669 |
| 45 | 2016 | 44 | S/D | H | SE | Necochea | Bs As | Argentina | -38.5850 | -59.0511 |
| 46 | 2016 | 47 | S/D | H | SE | Necochea | Bs As | Argentina | -38.4691 | -58.5680 |
| 47 | 2016 | 49 | LDC 6.3 PREBA | H | C | Gualeguaychu | E Rios | Argentina | -32.9411 | -58.2528 |
| 48 | 2016 | 50 | S/D | H | C | FAUBA | Bs As | Argentina | -34.5923 | -58.4801 |
| 49 | 2016 | 51 | S/D | H | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9516 | -60.5648 |
| 50 | 2016 | 52 | DM 4612 RR | H | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.7775 | -60.7092 |
| 51 | 2016 | 53 | DM 4612 RR | H | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.7760 | -60.7087 |

| | | | | | | | | | | |
|----|------|----|------------|---|----|----------------|----------|-----------|----------|----------|
| 52 | 2016 | 54 | DM 4612 RR | H | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.7752 | -60.7058 |
| 53 | 2016 | 55 | DM 4612 RR | H | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.7756 | -60.7035 |
| 54 | 2016 | 56 | DM 4612 RR | H | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.7776 | -60.7027 |
| 55 | 2016 | 57 | DM 4612 | H | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.8973 | -60.4088 |
| 56 | 2016 | 58 | DM 4612 | H | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9131 | -60.4109 |
| 57 | 2016 | 59 | DM 4612 | H | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9319 | -60.4695 |
| 58 | 2016 | 60 | DM 4612 | H | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9310 | -60.4634 |
| 59 | 2016 | 61 | NA 5009 | H | C | Nogoyá | E Rios | Argentina | -33.4988 | -60.9198 |
| 60 | 2016 | 62 | NS 2632 | H | SE | Chapadmalal | Bs As | Argentina | -38.1314 | -57.6583 |
| 61 | 2016 | 64 | NS 2632 | H | SE | Chapadmalal | Bs As | Argentina | -38.1302 | -57.6596 |
| 62 | 2016 | 65 | NS 2632 | H | SE | Chapadmalal | Bs As | Argentina | -38.1311 | -57.6557 |
| 63 | 2016 | 66 | NS 2632 | H | SE | Chapadmalal | Bs As | Argentina | -38.1267 | -57.6569 |
| 64 | 2016 | 67 | NA 5009 | S | C | Nogoyá | Bs As | Argentina | -32.5073 | -59.9343 |
| 65 | 2016 | 68 | DM 2200 | H | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0834 | -59.5836 |
| 66 | 2016 | 69 | DM 2200 | H | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0827 | -59.5829 |
| 67 | 2016 | 70 | DM 2200 | H | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0820 | -59.5824 |
| 68 | 2016 | 70 | DM 2200 | P | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0820 | -59.5824 |
| 69 | 2016 | 71 | DM 3312 | H | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0827 | -59.5861 |
| 70 | 2016 | 72 | DM 3312 | H | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0840 | -59.5839 |
| 71 | 2016 | 73 | DM 2200 | H | SE | Balcarce | Bs As | Argentina | -37.7644 | -58.3122 |
| 72 | 2016 | 74 | DM 3312 | H | SE | Balcarce | Bs As | Argentina | -37.7646 | -58.3130 |
| 73 | 2016 | 75 | DM 3810 | H | SE | Balcarce | Bs As | Argentina | -37.7635 | -58.3113 |
| 74 | 2016 | 76 | NS 4009 | H | C | Chacabuco | Bs As | Argentina | -34.5463 | -60.3418 |
| 75 | 2016 | 77 | S/D | V | C | Las Flores | Bs As | Argentina | -36.1096 | -59.5064 |
| 76 | 2016 | 78 | DM 4614 | H | C | America | Bs As | Argentina | -35.5293 | -63.0091 |
| 77 | 2016 | 79 | DM 4614 | H | C | America | Bs As | Argentina | -35.5308 | -63.0075 |
| 78 | 2016 | 80 | DM 3810 | H | C | America | Bs As | Argentina | -35.6324 | -62.8193 |
| 79 | 2016 | 81 | DM 3810 | H | C | America | Bs As | Argentina | -35.6292 | -62.8155 |
| 80 | 2016 | 82 | NS 5009 | S | W | Villa Mercedes | San Luis | Argentina | -33.6639 | -65.4103 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|------------------|---|-----|-------------------------|----------|-----------|----------|----------|
| 81 | 2016 | 84 | A 6448 | S | C | Diamante | E Rios | Argentina | -32.1987 | -60.2924 |
| 82 | 2016 | 85 | A 6448 | S | C | Diamante | E Rios | Argentina | -31.9933 | -60.5415 |
| 83 | 2016 | 86 | S/D | S | C | Diamante | E Rios | Argentina | -32.1921 | -60.2944 |
| 84 | 2016 | 87 | S/D | S | C | Diamante | E Rios | Argentina | -32.1509 | -60.5306 |
| 85 | 2016 | 88 | NA 5909 | S | C | Oro Verde, Parana | E Rios | Argentina | -31.8519 | -60.5363 |
| 86 | 2016 | 89 | DM 6.2 | S | C | Oro Verde, Parana | E Rios | Argentina | -31.8477 | -60.5355 |
| 87 | 2016 | 90 | DM 8277 IPRO STS | S | NEA | San Francisco de Laishy | Formosa | Argentina | -26.1504 | -58.7510 |
| 88 | 2016 | 91 | DM 8277 IPRO STS | S | NEA | San Francisco de Laishy | Formosa | Argentina | -26.1225 | -58.8045 |
| 89 | 2016 | 92 | LT 4914 ipro | S | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4189 | -61.1908 |
| 90 | 2016 | 93 | NS 4619 ipro | S | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.4201 | -61.1849 |
| 91 | 2016 | 94 | S/D | S | C | Herrera Vegas | Bs As | Argentina | -36.1395 | -61.5353 |
| 92 | 2016 | 95 | S/D | S | C | Herrera Vegas | Bs As | Argentina | -36.1406 | -61.5359 |
| 93 | 2016 | 96 | S/D | S | C | Herrera Vegas | Bs As | Argentina | -36.1414 | -61.5367 |
| 94 | 2016 | 97 | S/D | S | C | Herrera Vegas | Bs As | Argentina | -36.1433 | -61.5388 |
| 95 | 2016 | 98 | S/D | S | C | Herrera Vegas | Bs As | Argentina | -36.1436 | -61.5391 |
| 96 | 2016 | 99 | S/D | S | C | Carmen de Areco | Bs As | Argentina | -34.4447 | -59.9241 |
| 97 | 2016 | 100 | S/D | S | NOA | Tolloche | Salta | Argentina | -25.4576 | -63.8108 |
| 98 | 2016 | 101 | NS 7209 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7370 |
| 99 | 2016 | 102 | NS 6909 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7352 |
| 100 | 2016 | 103 | HO 7510 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7364 |
| 101 | 2016 | 104 | NS 7273 RG | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7364 |
| 102 | 2016 | 105 | DM 6161 IPRO STS | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7350 |
| 103 | 2016 | 107 | CZ 5905 IPRO STS | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7348 |
| 104 | 2016 | 108 | DM 6262 IPRO RSF | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7353 |
| 105 | 2016 | 109 | DM 6563 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7357 |
| 106 | 2016 | 110 | NS 6700 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7359 |
| 107 | 2016 | 111 | NS 8282 RG | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7363 |
| 108 | 2016 | 112 | DM 5958 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7348 |
| 109 | 2016 | 113 | DM 7976 IPRO RSF | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7367 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|------------------|---|-----|--------------|-------|-----------|----------|----------|
| 110 | 2016 | 114 | Waynasoy | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7355 |
| 111 | 2016 | 115 | DM 6263 RR1 STS | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7356 |
| 112 | 2016 | 116 | NS 5909 RG | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7346 |
| 113 | 2016 | 117 | LDC 8.5 RR | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7373 |
| 114 | 2016 | 118 | DM 8277 IPRO STS | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7372 |
| 115 | 2016 | 119 | RA 659 | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7362 |
| 116 | 2016 | 120 | NS 6248 RG | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7351 |
| 117 | 2016 | 121 | NS 7709 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7367 |
| 118 | 2016 | 122 | MS 6.3 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7355 |
| 119 | 2016 | 123 | RA 844 RR | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7371 |
| 120 | 2016 | 124 | SPS 6x8 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7360 |
| 121 | 2016 | 125 | MS 6.9 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7361 |
| 122 | 2016 | 126 | CZ 7905 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7369 |
| 123 | 2016 | 127 | Yanasu | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7369 |
| 124 | 2016 | 128 | CZ 6505 | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7357 |
| 125 | 2016 | 129 | RA 5715 IPRO | S | NOA | Lajitas este | Salta | Argentina | -24.7823 | -63.7347 |
| 126 | 2016 | 130 | NS 6483 RG | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9998 | -64.2633 |
| 127 | 2016 | 131 | HO 6110 IPRO | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9999 | -64.2624 |
| 128 | 2016 | 132 | MS 6.3 IPRO | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9998 | -64.2630 |
| 129 | 2016 | 133 | NS 5909 RG | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9999 | -64.2622 |
| 130 | 2016 | 134 | SPS 6x8 IPRO | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9997 | -64.2634 |
| 131 | 2016 | 135 | CZ 6505 | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9998 | -64.2631 |
| 132 | 2016 | 136 | RA 659 | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9997 | -64.2636 |
| 133 | 2016 | 137 | DM 8277 IPRO STS | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9996 | -64.2645 |
| 134 | 2016 | 138 | DM 5958 IPRO | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9999 | -64.2623 |
| 135 | 2016 | 139 | RA 844 RR | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9996 | -64.2644 |
| 136 | 2016 | 141 | NS 7273 RG | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9996 | -64.2639 |
| 137 | 2016 | 143 | DM 7976 IPRO RSF | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9996 | -64.2641 |
| 138 | 2016 | 145 | NS 6909 IPRO | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9998 | -64.2627 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|---------------------|---|-----|---------------|-------|-----------|----------|----------|
| 139 | 2016 | 146 | MS 6.9 IPRO | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9997 | -64.2635 |
| 140 | 2016 | 147 | DM 6563 IPRO | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9998 | -64.2632 |
| 141 | 2016 | 148 | NS 5909 RG | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9999 | -64.2625 |
| 142 | 2016 | 149 | DM 6262 IPRO RSF | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9998 | -64.2628 |
| 143 | 2016 | 150 | HO 7510 IPRO | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9997 | -64.2638 |
| 144 | 2016 | 151 | NS 6248 RGC | S | NOA | Olleros | Salta | Argentina | -24.9999 | -64.2625 |
| 145 | 2016 | 152 | NS 6248 RGC | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7755 | -64.1641 |
| 146 | 2016 | 153 | MS 6.9 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7744 | -64.1639 |
| 147 | 2016 | 154 | SPS 6x1 RR | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7756 | -64.1641 |
| 148 | 2016 | 155 | DM 8277 IPRO STS | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7733 | -64.1637 |
| 149 | 2016 | 156 | HO 7510 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7742 | -64.1639 |
| 150 | 2016 | 157 | SPS 6x8 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7745 | -64.1639 |
| 151 | 2016 | 158 | RA 744 | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7741 | -64.1638 |
| 152 | 2016 | 159 | NS 6909 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7754 | -64.1640 |
| 153 | 2016 | 160 | DM 7976 IPRO RSF | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7738 | -64.1638 |
| 154 | 2016 | 161 | MS 6.3 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7751 | -64.1640 |
| 155 | 2016 | 162 | RA 844 | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7734 | -64.1637 |
| 156 | 2016 | 163 | CZ 7905 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7735 | -64.1638 |
| 157 | 2016 | 164 | RA 659 | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7744 | -64.1639 |
| 158 | 2016 | 165 | DM 5958 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7760 | -64.1641 |
| 159 | 2016 | 166 | NS 6483 RG | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7745 | -64.1639 |
| 160 | 2016 | 167 | DM 6262 IPRO RSF | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7753 | -64.1640 |
| 161 | 2016 | 168 | DM 62R63 RR1 STS | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7750 | -64.1640 |
| 162 | 2016 | 169 | DM 61 I 61 IPRO STS | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7758 | -64.1641 |
| 163 | 2016 | 170 | Waynasoy | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7752 | -64.1640 |
| 164 | 2016 | 171 | HO 6110 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7758 | -64.1641 |
| 165 | 2016 | 172 | CZ 5905 IPRO STS | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7759 | -64.1641 |
| 166 | 2016 | 173 | NS 7209 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7735 | -64.1637 |
| 167 | 2016 | 174 | AW 6211 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7756 | -64.1641 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|------------------|---|-----|---------------|-------------|-----------|----------|----------|
| 168 | 2016 | 175 | M 6410 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7748 | -64.1640 |
| 169 | 2016 | 176 | NA 7273 RG | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7740 | -64.1638 |
| 170 | 2016 | 177 | NS 6700 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7746 | -64.1639 |
| 171 | 2016 | 178 | M 6210 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7747 | -64.1639 |
| 172 | 2016 | 179 | LDC 8.5 | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7733 | -64.1637 |
| 173 | 2016 | 180 | NS 7709 IPRO STS | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7739 | -64.1638 |
| 174 | 2016 | 181 | NS 8282 RG | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7742 | -64.1639 |
| 175 | 2016 | 182 | RA 5715 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7760 | -64.1641 |
| 176 | 2016 | 183 | CZ 6505 | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7749 | -64.1640 |
| 177 | 2016 | 184 | Yanasu | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7736 | -64.1638 |
| 178 | 2016 | 185 | NS 5909 RG | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7761 | -64.1641 |
| 179 | 2016 | 186 | DM 6563 IPRO | S | NOA | Lajitas Oeste | Salta | Argentina | -24.7749 | -64.1640 |
| 180 | 2016 | 187 | LDC 8.5 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8529 | -64.7023 |
| 181 | 2016 | 188 | AW 6211 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8547 | -64.6883 |
| 182 | 2016 | 189 | NS 5909 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8553 | -64.6849 |
| 183 | 2016 | 190 | MS 6.9 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8530 | -64.6946 |
| 184 | 2016 | 191 | NS 6700 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8533 | -64.6930 |
| 185 | 2016 | 192 | SPS 6x8 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8531 | -64.6941 |
| 186 | 2016 | 193 | DM 6563 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8535 | -64.6915 |
| 187 | 2016 | 194 | CZ 6505 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8543 | -64.6909 |
| 188 | 2016 | 195 | SPS 7x1 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8527 | -64.6968 |
| 189 | 2016 | 196 | DM 6161 IPRO STS | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8548 | -64.6873 |
| 190 | 2016 | 197 | NS 7209 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8523 | -64.7002 |
| 191 | 2016 | 198 | NS 6909 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8546 | -64.6889 |
| 192 | 2016 | 199 | Yanasu | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8524 | -64.6991 |
| 193 | 2016 | 200 | M 6410 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8534 | -64.6919 |
| 194 | 2016 | 201 | DM 6262 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8545 | -64.6893 |
| 195 | 2016 | 202 | RA 5715 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8554 | -64.6842 |
| 196 | 2016 | 203 | SPS 6x1 RR | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8548 | -64.6878 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|------------------|---|-----|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
| 197 | 2016 | 204 | CZ 5905 ipro STS | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8551 | -64.6860 |
| 198 | 2016 | 205 | DM 5958 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8552 | -64.6854 |
| 199 | 2016 | 206 | RA 659 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8530 | -64.6952 |
| 200 | 2016 | 207 | M 6210 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8533 | -64.6925 |
| 201 | 2016 | 208 | NS 6248 RG | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8546 | -64.6886 |
| 202 | 2016 | 209 | DM 8277 IPRO STS | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8525 | -64.7016 |
| 203 | 2016 | 210 | DM 62r63 RR1 STS | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8544 | -64.6903 |
| 204 | 2016 | 211 | NS 6483 RG | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8532 | -64.6936 |
| 205 | 2016 | 212 | Ho 7510 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8529 | -64.6962 |
| 206 | 2016 | 213 | Waynasoy | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8545 | -64.6897 |
| 207 | 2016 | 214 | NS 7709 IPRO STS | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8526 | -64.6979 |
| 208 | 2016 | 215 | DM 7976 IPRO RSF | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8525 | -64.6984 |
| 209 | 2016 | 216 | MS 6.3 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8544 | -64.6900 |
| 210 | 2016 | 217 | Ho 6110 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8549 | -64.6866 |
| 211 | 2016 | 218 | NS 7273 RG | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8526 | -64.6975 |
| 212 | 2016 | 219 | CZ 7905 IPRO | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8523 | -64.6996 |
| 213 | 2016 | 220 | RA 844 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8522 | -64.7008 |
| 214 | 2016 | 221 | NS 8282 | S | NOA | Palomar | Sgo. Estero | Argentina | -26.8529 | -64.6958 |
| 215 | 2016 | 222 | AW 6211 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8357 | -64.8582 |
| 216 | 2016 | 223 | LDC 8.5 RR | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8362 | -64.8585 |
| 217 | 2016 | 224 | CZ 7.55 s | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8360 | -64.8593 |
| 218 | 2016 | 225 | MS 6.3 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8356 | -64.8588 |
| 219 | 2016 | 226 | NS 6700 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8356 | -64.8590 |
| 220 | 2016 | 227 | CZ 6505 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8356 | -64.8588 |
| 221 | 2016 | 228 | Yanasu | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8361 | -64.8589 |
| 222 | 2016 | 229 | CZ 5905 iproSTS | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8358 | -64.8579 |
| 223 | 2016 | 230 | NS 7273 RG | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8361 | -64.8592 |
| 224 | 2016 | 231 | DM 8277 IPRO STS | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8362 | -64.8586 |
| 225 | 2016 | 232 | NS 8282 RG | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8360 | -64.8593 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|------------------|---|-----|-------------|---------|-----------|----------|----------|
| 226 | 2016 | 233 | RA 659 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8356 | -64.8592 |
| 227 | 2016 | 234 | DM 6262 IPRO RSF | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8357 | -64.8585 |
| 228 | 2016 | 235 | Ho 7510 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8360 | -64.8594 |
| 229 | 2016 | 236 | SPS 6x8 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8356 | -64.8591 |
| 230 | 2016 | 237 | NS 6483 RG | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8356 | -64.8590 |
| 231 | 2016 | 238 | DM 6161 IPRO STS | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8358 | -64.8581 |
| 232 | 2016 | 239 | Tarpusqa 500 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8361 | -64.8592 |
| 233 | 2016 | 240 | M 6410 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8356 | -64.8589 |
| 234 | 2016 | 241 | SPS 7x1 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8360 | -64.8594 |
| 235 | 2016 | 243 | NS 7209 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8361 | -64.8588 |
| 236 | 2016 | 244 | DM 7976 IPRO RSF | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8361 | -64.8590 |
| 237 | 2016 | 245 | NS 7709 IPRO STS | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8361 | -64.8591 |
| 238 | 2016 | 246 | SPS 6x1 RR | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8357 | -64.8582 |
| 239 | 2016 | 247 | DM 5958 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8358 | -64.8580 |
| 240 | 2016 | 248 | RA 750 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8360 | -64.8595 |
| 241 | 2016 | 249 | Ho 6110 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8358 | -64.8580 |
| 242 | 2016 | 250 | RA 5715 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8358 | -64.8579 |
| 243 | 2016 | 251 | DM 6563 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8357 | -64.8586 |
| 244 | 2016 | 252 | A 8000 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8361 | -64.8589 |
| 245 | 2016 | 253 | NS 6248 RG | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8357 | -64.8584 |
| 246 | 2016 | 254 | M 6210 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8357 | -64.8583 |
| 247 | 2016 | 255 | RA 844 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8362 | -64.8587 |
| 248 | 2016 | 256 | NS 8282 (T3) | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8361 | -64.8590 |
| 249 | 2016 | 257 | NS 5909 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8356 | -64.8589 |
| 250 | 2016 | 258 | Waynasoy | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8357 | -64.8587 |
| 251 | 2016 | 259 | CZ 7905 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8361 | -64.8588 |
| 252 | 2016 | 260 | MS 6.9 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8356 | -64.8591 |
| 253 | 2016 | 262 | DM 6.2 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8357 | -64.8587 |
| 254 | 2016 | 263 | NS 6909 IPRO | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8357 | -64.8584 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|------------------|---|-----|-------------|-------------|-----------|----------|----------|
| 255 | 2016 | 264 | NS 5909 | S | NOA | San Agustin | Tucuman | Argentina | -26.8357 | -64.8585 |
| 256 | 2016 | 265 | RA 844 | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5010 |
| 257 | 2016 | 266 | CZ 7905 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5009 |
| 258 | 2016 | 267 | SPS 6x1 RR | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4991 |
| 259 | 2016 | 268 | NS 8282 | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5004 |
| 260 | 2016 | 270 | DM 5958 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4988 |
| 261 | 2016 | 271 | SPS 6x8 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5001 |
| 262 | 2016 | 272 | DM 8277 IPRO STS | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5011 |
| 263 | 2016 | 273 | DM 62r63 RR1 STS | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4996 |
| 264 | 2016 | 274 | NS 6248 | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4993 |
| 265 | 2016 | 275 | LDC 8.5 | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5012 |
| 266 | 2016 | 276 | M 6210 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.4999 |
| 267 | 2016 | 277 | RA 5715 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4988 |
| 268 | 2016 | 278 | DM 6262 IPRO RSF | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4993 |
| 269 | 2016 | 279 | HO 6110 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4989 |
| 270 | 2016 | 280 | RA 659 | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5003 |
| 271 | 2016 | 281 | NS 5909 RG | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4987 |
| 272 | 2016 | 282 | NS 6700 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5000 |
| 273 | 2016 | 283 | MS 6.9 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5002 |
| 274 | 2016 | 285 | SPS 7x1 | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5005 |
| 275 | 2016 | 286 | Waynasoy | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4994 |
| 276 | 2016 | 287 | NS 7273 RG | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5006 |
| 277 | 2016 | 288 | Yanasu | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5008 |
| 278 | 2016 | 289 | NS 5909 RG | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4991 |
| 279 | 2016 | 290 | NS 7209 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5009 |
| 280 | 2016 | 291 | Ho 7510 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5004 |
| 281 | 2016 | 292 | MS 6.3 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4995 |
| 282 | 2016 | 293 | DM 7976 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5007 |
| 283 | 2016 | 294 | NS 6483 RG | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5001 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|--------------------|---|-----|---------------------|-------------|-----------|----------|----------|
| 284 | 2016 | 295 | NS 5909 RG | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4994 |
| 285 | 2016 | 296 | CZ 6505 | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4997 |
| 286 | 2016 | 297 | M 6410 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.4998 |
| 287 | 2016 | 298 | NS 7709 IPRO STS | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.5007 |
| 288 | 2016 | 299 | AW 6211 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4992 |
| 289 | 2016 | 300 | DM 6563 IPRO | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5117 | -64.4997 |
| 290 | 2016 | 301 | DM 6161 IPRO STS | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4990 |
| 291 | 2016 | 302 | CZ 5905 IPRO STS | S | NOA | Garmendia | Sgo. Estero | Argentina | -26.5116 | -64.4989 |
| 292 | 2016 | 303 | DM 3810 | S | C | Alberti | Bs As | Argentina | -34.9315 | -60.2922 |
| 293 | 2016 | 304 | DM 4612 | S | C | Alberti | Bs As | Argentina | -34.9917 | -60.1966 |
| 294 | 2016 | 305 | NS 3809 | S | C | Alberti | Bs As | Argentina | -35.0578 | -59.9764 |
| 295 | 2016 | 306 | NS 4955 | S | C | Alberti | Bs As | Argentina | -35.0871 | -60.2046 |
| 296 | 2016 | 307 | NS 3215 | S | C | Alberti | Bs As | Argentina | -34.8584 | -60.4065 |
| 297 | 2016 | 308 | DM 5351 | S | C | Gral. Rojo | Bs As | Argentina | -33.4849 | -60.2771 |
| 298 | 2016 | 309 | DM 3312 | S | C | Marcos Juares | Cordoba | Argentina | -32.6789 | -62.0662 |
| 299 | 2016 | 310 | NS 5258 | S | C | Marcos Juares | Cordoba | Argentina | -32.6775 | -62.2000 |
| 300 | 2016 | 311 | DM 5351 | S | C | La Carlota | Cordoba | Argentina | -33.4682 | -63.3056 |
| 301 | 2016 | 312 | FN 4.5 | S | C | La Carlota | Cordoba | Argentina | -33.4682 | -63.3056 |
| 302 | 2016 | 313 | SP 4x4 | S | C | Gral. Roca | Cordoba | Argentina | -32.7449 | -61.9304 |
| 303 | 2016 | 314 | DM 4612 | S | C | Marcos Juares | Cordoba | Argentina | -32.7024 | -62.0706 |
| 304 | 2016 | 315 | SRM 3938 | S | C | Marcos Juares | Cordoba | Argentina | -32.6501 | -62.0966 |
| 305 | 2016 | 316 | DM 4214 | S | C | Marcos Juares | Cordoba | Argentina | -32.6658 | -62.1433 |
| 306 | 2016 | 317 | NS 5009 | S | C | Armstrong | Santa Fe | Argentina | -32.7788 | -61.6414 |
| 307 | 2016 | 319 | LDC 5.9 IPRO PREBA | S | C | Gualeguaychu | E Rios | Argentina | -32.9406 | -58.2543 |
| 308 | 2016 | 320 | S/D | S | C | Pergamino | Bs As | Argentina | -33.9516 | -60.5648 |
| 309 | 2016 | 321 | DM 3312 | S | SE | La Pastora / Tandil | Bs As | Argentina | -37.1724 | -59.4312 |
| 310 | 2016 | 322 | DM 3810 | S | SE | La Pastora / Tandil | Bs As | Argentina | -37.1963 | -59.4180 |
| 311 | 2016 | 323 | DM 4214 STS | S | SE | La Pastora / Tandil | Bs As | Argentina | -37.1970 | -59.4043 |
| 312 | 2016 | 324 | DM 4214 STS | S | SE | La Pastora / Tandil | Bs As | Argentina | -37.1893 | -59.4009 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|---------|---|----|---------------------|-------|-----------|----------|----------|
| 313 | 2016 | 325 | DM 4612 | S | SE | La Pastora / Tandil | Bs As | Argentina | -37.2016 | -59.4091 |
| 314 | 2016 | 326 | DM 4612 | S | SE | La Pastora / Tandil | Bs As | Argentina | -37.1907 | -59.4176 |
| 315 | 2016 | 327 | DM 3810 | S | C | Guanaco / Pehuajo | Bs As | Argentina | -35.6606 | -61.6073 |
| 316 | 2016 | 328 | DM 4214 | S | C | Guanaco / Pehuajo | Bs As | Argentina | -35.6633 | -61.6036 |
| 317 | 2016 | 329 | DM 4612 | S | C | Guanaco / Pehuajo | Bs As | Argentina | -35.6624 | -61.6338 |
| 318 | 2016 | 331 | DM 3070 | S | SE | Energia | Bs As | Argentina | -38.6175 | -59.0289 |
| 319 | 2016 | 332 | DM 3070 | S | SE | Energia | Bs As | Argentina | -38.6175 | -59.0289 |
| 320 | 2016 | 334 | DM 3070 | S | SE | Energia | Bs As | Argentina | -38.6175 | -59.0290 |
| 321 | 2016 | 337 | DM 3070 | S | SE | Energia | Bs As | Argentina | -38.6176 | -59.0291 |
| 322 | 2016 | 339 | DM 3070 | S | SE | Energia | Bs As | Argentina | -38.6177 | -59.0292 |
| 323 | 2016 | 340 | DM 3070 | S | SE | Energia | Bs As | Argentina | -38.6177 | -59.0292 |
| 324 | 2016 | 342 | DM 3070 | S | SE | Energia | Bs As | Argentina | -38.6174 | -59.0288 |
| 325 | 2016 | 345 | DM 3070 | S | SE | Energia | Bs As | Argentina | -38.6173 | -59.0286 |
| 326 | 2016 | 347 | DM 3070 | S | SE | Energia | Bs As | Argentina | -38.6173 | -59.0286 |
| 327 | 2016 | 348 | DM 3070 | S | SE | Energia | Bs As | Argentina | -38.6173 | -59.0285 |
| 328 | 2016 | 349 | DM 4210 | S | SE | Pierres | Bs As | Argentina | -38.3698 | -58.6278 |
| 329 | 2016 | 350 | DM 4210 | S | SE | Pierres | Bs As | Argentina | -38.3700 | -58.6278 |
| 330 | 2016 | 351 | DM 4210 | S | SE | Pierres | Bs As | Argentina | -38.3698 | -58.6276 |
| 331 | 2016 | 352 | DM 4210 | S | SE | Pierres | Bs As | Argentina | -38.3696 | -58.6277 |
| 332 | 2016 | 353 | DM 4210 | S | SE | Pierres | Bs As | Argentina | -38.3699 | -58.6280 |
| 333 | 2016 | 355 | LDC 3.7 | S | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.5003 | -59.0477 |
| 334 | 2016 | 356 | LDC 3.7 | S | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.5011 | -59.0470 |
| 335 | 2016 | 357 | LDC 3.7 | S | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.5004 | -59.0461 |
| 336 | 2016 | 358 | LDC 3.7 | S | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.5003 | -59.0488 |
| 337 | 2016 | 360 | LDC 3.7 | S | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.5018 | -59.0469 |
| 338 | 2016 | 366 | LDC 3.7 | S | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.5008 | -59.0508 |
| 339 | 2016 | 367 | LDC 3.7 | S | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.5029 | -59.0477 |
| 340 | 2016 | 369 | LDC 3.7 | S | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.5019 | -59.0493 |
| 341 | 2016 | 371 | LDC 3.7 | S | SE | Tandil | Bs As | Argentina | -37.5015 | -59.0519 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|-----------|---|----|-----------------|----------|-----------|----------|----------|
| 342 | 2016 | 372 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0683 | -59.5828 |
| 343 | 2016 | 376 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0699 | -59.5815 |
| 344 | 2016 | 378 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0706 | -59.5799 |
| 345 | 2016 | 381 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0726 | -59.5780 |
| 346 | 2016 | 382 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0727 | -59.5762 |
| 347 | 2016 | 383 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0699 | -59.5746 |
| 348 | 2016 | 384 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0703 | -59.5723 |
| 349 | 2016 | 385 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0691 | -59.5770 |
| 350 | 2016 | 386 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0672 | -59.5772 |
| 351 | 2016 | 387 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0674 | -59.5793 |
| 352 | 2016 | 388 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0649 | -59.5777 |
| 353 | 2016 | 389 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0656 | -59.5798 |
| 354 | 2016 | 390 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0641 | -59.5789 |
| 355 | 2016 | 391 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0647 | -59.5800 |
| 356 | 2016 | 392 | DM 4214 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -37.0662 | -59.5815 |
| 357 | 2016 | 393 | ASP 4201 | S | SE | C. N. Otamendi | Bs As | Argentina | -38.0149 | -58.0105 |
| 358 | 2016 | 394 | DM 4712 | S | SE | CN. Otamendi | Bs As | Argentina | -38.0329 | -57.8798 |
| 359 | 2016 | 395 | NS 3302 | S | SE | Miramar | Bs As | Argentina | -38.1905 | -57.9268 |
| 360 | 2016 | 396 | DM 3810 | S | SE | Gral. Madariaga | Bs As | Argentina | -37.0059 | -57.0181 |
| 361 | 2016 | 397 | DM 3810 | S | SE | Gral Madariaga | Bs As | Argentina | -37.0128 | -57.0400 |
| 362 | 2016 | 398 | DM 4712 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -36.8470 | -59.0893 |
| 363 | 2016 | 399 | DM 3312 | S | SE | Azul | Bs As | Argentina | -36.8513 | -59.0960 |
| 364 | 2016 | 401 | A 4413 RG | S | SE | Balcarce | Bs As | Argentina | -38.0050 | -58.0626 |
| 365 | 2016 | 402 | NS 4619 | S | SE | Chapadmalal | Bs As | Argentina | -38.1332 | -57.6651 |
| 366 | 2016 | 403 | S/D | S | C | Luis Palacios | Santa Fe | Argentina | -32.7571 | -60.8954 |
| 367 | 2016 | 404 | NA 5009 | S | C | Rio IV | Cordoba | Argentina | -33.0652 | -64.3113 |
| 368 | 2016 | 405 | NA 5009 | S | C | Rio IV | Cordoba | Argentina | -33.0170 | -64.1835 |
| 369 | 2016 | 406 | DM 5351 | S | C | Rio IV | Cordoba | Argentina | -33.7245 | -64.3802 |
| 370 | 2016 | 407 | DM 3312 | S | C | Chañar Ladeado | Santa Fe | Argentina | -33.3453 | -62.0825 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|---------------|---|-----|----------------|----------|-----------|----------|----------|
| 371 | 2016 | 408 | DM 4612 | S | C | Laboulaye | Cordoba | Argentina | -34.2098 | -63.8004 |
| 372 | 2016 | 409 | DM 5351 RSF | S | W | Villa Valeria | Cordoba | Argentina | -34.1928 | -65.0922 |
| 373 | 2016 | 410 | DM 5351 RSF | S | W | Villa Valeria | Cordoba | Argentina | -34.5508 | -65.0988 |
| 374 | 2016 | 411 | DM 4612 | S | C | Arequito | Cordoba | Argentina | -33.2356 | -61.7683 |
| 375 | 2016 | 412 | SRM 5951 | S | C | Manfredi | Cordoba | Argentina | -31.0906 | -63.7381 |
| 376 | 2016 | 413 | BIOSOJA 5.40 | S | C | Casilda | Santa Fe | Argentina | -33.1294 | -61.3219 |
| 377 | 2016 | 414 | ACA 4990 | S | NOA | La Cocha | Tucuman | Argentina | -27.7701 | -65.6038 |
| 378 | 2016 | 415 | BIO 4.60 | S | C | Yuquerí | E Rios | Argentina | -31.6352 | -58.1894 |
| 379 | 2016 | 416 | DM 53i53 ipro | S | C | Gral Villegas | Bs As | Argentina | -35.0188 | -63.0383 |
| 380 | 2016 | 417 | NS 5419 IPRO | S | C | Arrecifes | Bs As | Argentina | -34.5881 | -60.9381 |
| 381 | 2016 | 418 | NS 7273 RG | S | C | Rafaela | Santa Fe | Argentina | -31.3194 | -61.8467 |
| 382 | 2016 | 419 | NS 5258 | S | C | Villa Trinidad | Santa Fe | Argentina | -30.2258 | -61.8928 |
| 383 | 2016 | 420 | SUR 6256 | S | C | Villa Mantero | E Rios | Argentina | -32.6525 | -59.2364 |
| 384 | 2016 | 421 | NS 7709 | S | C | La Paz | E Rios | Argentina | -30.7611 | -59.4828 |
| 385 | 2016 | 422 | LDC 6.0 | S | C | Parana | E Rios | Argentina | -31.8497 | -60.5397 |
| 386 | 2016 | 423 | DS 1505 | S | C | Venado Tuerto | Santa Fe | Argentina | -33.7562 | -61.9875 |
| 387 | 2017 | 1 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 388 | 2017 | 2 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 389 | 2017 | 3 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 390 | 2017 | 4 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 391 | 2017 | 5 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 392 | 2017 | 6 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 393 | 2017 | 7 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 394 | 2017 | 8 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 395 | 2017 | 9 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 396 | 2017 | 10 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 397 | 2017 | 11 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 398 | 2017 | 12 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 399 | 2017 | 13 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|----|---------|---|---|--------|----------|-----------|----------|----------|
| 400 | 2017 | 14 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 401 | 2017 | 15 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 402 | 2017 | 16 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 403 | 2017 | 17 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 404 | 2017 | 18 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 405 | 2017 | 19 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 406 | 2017 | 20 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 407 | 2017 | 21 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 408 | 2017 | 22 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 409 | 2017 | 23 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 410 | 2017 | 24 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 411 | 2017 | 25 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 412 | 2017 | 26 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 413 | 2017 | 27 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 414 | 2017 | 28 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 415 | 2017 | 29 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 416 | 2017 | 30 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 417 | 2017 | 31 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 418 | 2017 | 32 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 419 | 2017 | 33 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 420 | 2017 | 34 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 421 | 2017 | 35 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 422 | 2017 | 36 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 423 | 2017 | 37 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 424 | 2017 | 38 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 425 | 2017 | 39 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 426 | 2017 | 40 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 427 | 2017 | 41 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 428 | 2017 | 42 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|----|----------|---|---|-----------|----------|-----------|----------|----------|
| 429 | 2017 | 43 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 430 | 2017 | 44 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 431 | 2017 | 45 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 432 | 2017 | 46 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 433 | 2017 | 47 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 434 | 2017 | 48 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 435 | 2017 | 49 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 436 | 2017 | 50 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 437 | 2017 | 51 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 438 | 2017 | 52 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 439 | 2017 | 53 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 440 | 2017 | 54 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 441 | 2017 | 55 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 442 | 2017 | 56 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 443 | 2017 | 57 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 444 | 2017 | 58 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 445 | 2017 | 59 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 446 | 2017 | 60 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 447 | 2017 | 61 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 448 | 2017 | 62 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 449 | 2017 | 63 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 450 | 2017 | 64 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 451 | 2017 | 65 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 452 | 2017 | 66 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 453 | 2017 | 67 | DM 4915 | H | C | Roldán | Santa Fe | Argentina | -32.9233 | -60.9138 |
| 454 | 2018 | 1 | DM 62R63 | S | C | San Pedro | Bs As | Argentina | -33.6573 | -59.8267 |
| 455 | 2018 | 2 | DM 62R63 | S | C | San Pedro | Bs As | Argentina | -33.6573 | -59.8267 |
| 456 | 2018 | 3 | DM 62R63 | S | C | San Pedro | Bs As | Argentina | -33.6573 | -59.8267 |
| 457 | 2018 | 4 | DM 62R63 | S | C | San Pedro | Bs As | Argentina | -33.6573 | -59.8267 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|----|------------|---|---|-----------|----------|-----------|----------|----------|
| 458 | 2018 | 5 | DM 62R63 | S | C | San Pedro | Bs As | Argentina | -33.6573 | -59.8267 |
| 459 | 2018 | 6 | DM 62R63 | S | C | San Pedro | Bs As | Argentina | -33.6573 | -59.8267 |
| 460 | 2019 | 1 | Amaranthus | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 461 | 2019 | 2 | Amaranthus | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 462 | 2019 | 3 | Amaranthus | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 463 | 2019 | 4 | Amaranthus | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 464 | 2019 | 5 | Amaranthus | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 465 | 2019 | 6 | Amaranthus | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 466 | 2019 | 7 | Amaranthus | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 467 | 2019 | 8 | Amaranthus | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 468 | 2019 | 9 | Amaranthus | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 469 | 2019 | 10 | Amaranthus | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 470 | 2019 | 11 | DM 40R16 | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 471 | 2019 | 12 | DM 40R16 | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 472 | 2019 | 13 | DM 40R16 | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 473 | 2019 | 14 | DM 40R16 | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 474 | 2019 | 15 | DM 40R16 | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 475 | 2019 | 16 | DM 40R16 | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 476 | 2019 | 17 | DM 40R16 | H | C | Bragado | Bs As | Argentina | -35.0883 | -60.3896 |
| 477 | 2019 | 18 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 478 | 2019 | 19 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 479 | 2019 | 20 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 480 | 2019 | 21 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 481 | 2019 | 22 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 482 | 2019 | 23 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 483 | 2019 | 24 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 484 | 2019 | 25 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 485 | 2019 | 26 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 486 | 2019 | 27 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|----|------------------|---|---|---------------------|----------|-----------|----------|----------|
| 487 | 2019 | 28 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 488 | 2019 | 29 | Bioceres 4.91 | H | C | Alejo Ledesma | Cordoba | Argentina | -33.6967 | -62.7050 |
| 489 | 2019 | 30 | Bioceres 4.91 | H | C | Alejo Ledesma | Cordoba | Argentina | -33.6967 | -62.7050 |
| 490 | 2019 | 31 | Bioceres 4.91 | H | C | Alejo Ledesma | Cordoba | Argentina | -33.6967 | -62.7050 |
| 491 | 2019 | 32 | Bioceres 4.91 | H | C | Alejo Ledesma | Cordoba | Argentina | -33.6967 | -62.7050 |
| 492 | 2019 | 33 | Bioceres 4.91 | H | C | Alejo Ledesma | Cordoba | Argentina | -33.6967 | -62.7050 |
| 493 | 2019 | 34 | Bioceres 4.91 | H | C | Alejo Ledesma | Cordoba | Argentina | -33.6967 | -62.7050 |
| 494 | 2019 | 35 | Bioceres 4.91 | H | C | Alejo Ledesma | Cordoba | Argentina | -33.6967 | -62.7050 |
| 495 | 2019 | 36 | Bioceres 4.91 | H | C | Alejo Ledesma | Cordoba | Argentina | -33.6967 | -62.7050 |
| 496 | 2019 | 37 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 497 | 2019 | 38 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 498 | 2019 | 39 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 499 | 2019 | 40 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 500 | 2019 | 41 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 501 | 2019 | 42 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 502 | 2019 | 43 | DM 4014 | H | C | Bigand | Santa Fe | Argentina | -33.2452 | -61.1116 |
| 503 | 2019 | 44 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 504 | 2019 | 45 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 505 | 2019 | 46 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 506 | 2019 | 47 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 507 | 2019 | 48 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 508 | 2019 | 49 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 509 | 2019 | 50 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 510 | 2019 | 51 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 511 | 2019 | 52 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 512 | 2019 | 53 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 513 | 2019 | 54 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 514 | 2019 | 55 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 515 | 2019 | 56 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|------------------|---|---|---------------------|------------|-----------|----------|----------|
| 516 | 2019 | 57 | Araujia hortorum | H | C | San Andrés de Giles | Bs As | Argentina | -34.4617 | -59.4429 |
| 517 | 2017 | 01B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 518 | 2017 | 02B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 519 | 2017 | 03B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 520 | 2017 | 04B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 521 | 2017 | 05B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 522 | 2017 | 06B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 523 | 2017 | 07B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 524 | 2017 | 08B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 525 | 2017 | 09B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 526 | 2017 | 10B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 527 | 2017 | 11B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 528 | 2017 | 12B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 529 | 2017 | 13B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 530 | 2017 | 14B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 531 | 2017 | 15B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 532 | 2017 | 16B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 533 | 2017 | 17B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 534 | 2017 | 18B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 535 | 2017 | 19B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 536 | 2017 | 20B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 537 | 2017 | 21B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 538 | 2017 | 22B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 539 | 2017 | 23B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 540 | 2017 | 24B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 541 | 2017 | 25B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 542 | 2017 | 26B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 543 | 2017 | 27B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 544 | 2017 | 28B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|---------------|---|---|------------|------------|---------|----------|----------|
| 545 | 2017 | 29B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 546 | 2017 | 30B | Milagrosa | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.8494 | -63.4394 |
| 547 | 2017 | 31B | NA 8009 | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.4696 | -63.4443 |
| 548 | 2017 | 32B | NA 8009 | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.4696 | -63.4443 |
| 549 | 2017 | 33B | NA 8009 | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.4696 | -63.4443 |
| 550 | 2017 | 34B | NA 8009 | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.4696 | -63.4443 |
| 551 | 2017 | 35B | SEM WEST 4863 | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.4770 | -63.4246 |
| 552 | 2017 | 36B | SEM WEST 4863 | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.4770 | -63.4246 |
| 553 | 2017 | 37B | SEM WEST 4863 | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.4770 | -63.4246 |
| 554 | 2017 | 38B | SEM WEST 4863 | H | - | Santa Cruz | Santa Cruz | Bolivia | -16.4770 | -63.4246 |

S = semilla, H = hoja, V = vaina, P = pedúnculo, NOA = noroeste, NEA = noreste, C = centro, W = oeste, SE = sureste

ANEXO II

Tabla 43. Información de recolección y números de acceso de GenBank para aislados de Groenewald et al. (2013) y Bakhshi et al. (2018) utilizados en los análisis filogenéticos moleculares.

| Especie | Identificación de aislado | Hospedante | Origen | Números de acceso de GenBank | | | | | | Referencia |
|---|---------------------------|---|--------------|------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|------------------------|
| | | | | <i>actA</i> | <i>cmdA</i> | <i>tef1</i> | <i>his3</i> | <i>gapdh</i> | <i>nrITS</i> | |
| <i>Cercospora alchemillicola</i> | CPC 5259 (TYPE) | <i>Alchemilla mollis</i> | New Zealand | JX143033 | JX142787 | JX143279 | JX142541 | | JX143525 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 5126 | <i>Oenothera fruticosa</i> | New Zealand | JX143034 | JX142788 | JX143280 | JX142542 | | JX143526 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 5127 | <i>Gaura lindheimeri</i> | New Zealand | JX143035 | JX142789 | JX143281 | JX142543 | | JX143527 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>brunkii</i> | CBS 132657 | <i>Geranium thunbergii</i> | S. Korea | JX143067 | JX142821 | JX143313 | JX142575 | | JX143559 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 732 | <i>Datura stramonium</i> | Japan | JX143068 | JX142822 | JX143314 | JX142576 | | JX143560 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora campisilii</i> | CBS 132625 | <i>Impatiens noli-tangere</i> | S. Korea | JX143069 | JX142823 | JX143315 | JX142577 | | JX143561 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> aff. <i>canescens</i> | CBS 111133 | <i>Vigna</i> sp. | S. Africa | DQ835103 | DQ835130 | DQ835084 | DQ835157 | | AY260065 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 111134 | <i>Vigna</i> sp. | S. Africa | DQ835104 | DQ835131 | DQ835085 | DQ835158 | | AY260066 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132658 | <i>Dioscorea rotundata</i> | Ghana | JX143070 | JX142824 | JX143316 | JX142578 | | JX143562 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132659 | <i>Dioscorea alata</i> | Ghana | JX143071 | JX142825 | JX143317 | JX142579 | | JX143563 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 153.55 | <i>Phaseolus lunatus</i> (= <i>Ph. limensis</i>) | Georgia, USA | JX143072 | JX142826 | JX143318 | JX142580 | | JX143564 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 11628 | <i>Dioscorea rotundata</i> | Ghana | JX143073 | JX142827 | JX143319 | JX142581 | | JX143565 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 11640 | <i>Apium</i> sp. | USA | JX143074 | JX142828 | JX143320 | JX142582 | | JX143566 | Groenewald et al. 2013 |

| | | | | | | | | | |
|---|-------------------|--|------------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|
| | CPC 15871 | - | Mexico | JX143075 | JX142829 | JX143321 | JX142583 | JX143567 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 4408 | <i>Citrus maxima</i> | S. Africa | DQ835105 | DQ835132 | DQ835086 | DQ835159 | AY260067 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 4409 | <i>Citrus maxima</i> | S. Africa | DQ835106 | DQ835133 | DQ835087 | DQ835160 | AY260068 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora capsici</i> | CBS 118712 | Lesions on calyx attached to fruit | Fiji | | | JX143322 | JX142584 | GU214653 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132622 | <i>Capsicum annuum</i> | S. Korea | | | JX143323 | JX142585 | JX143568 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 12307 | <i>Capsicum annuum</i> | S. Korea | | | JX143324 | JX142586 | GU214654 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 574 | <i>Capsicum annuum</i> | Japan | | | JX143325 | JX142587 | JX143569 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora celosiae</i> | CBS 132600 | <i>Celosia argentea</i> var. <i>cristata</i> | S. Korea | | | JX143326 | JX142588 | JX143570 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora chenopodii</i> | CBS 132620 | <i>Chenopodium</i> cf. <i>album</i> | France | JX143081 | JX142835 | JX143327 | JX142589 | JX143571 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>chenopodii</i> | CBS 132594 (TYPE) | <i>Chenopodium ficifolium</i> | S. Korea | JX143082 | JX142836 | JX143328 | JX142590 | JX143572 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132677 | <i>Chenopodium</i> sp. | Mexico | JX143083 | JX142837 | JX143329 | JX142591 | JX143573 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 12450 | <i>Chenopodium ficifolium</i> | S. Korea | JX143084 | JX142838 | JX143330 | JX142592 | JX143574 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 15763 | <i>Chenopodium</i> sp. | Mexico | JX143085 | JX142839 | JX143331 | JX142593 | JX143575 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 15859 | <i>Chenopodium</i> sp. | Mexico | JX143086 | JX142840 | JX143332 | JX142594 | JX143576 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 15862 | <i>Chenopodium</i> sp. | Mexico | JX143087 | JX142841 | JX143333 | JX142595 | JX143577 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora chinensis</i> | CBS 132612 | <i>Polygonatum humile</i> | S. Korea | JX143088 | JX142842 | JX143334 | JX142596 | JX143578 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>citrulina</i> | CBS 119395 | <i>Musa</i> sp. | Bangladesh | JX143089 | JX142843 | JX143335 | JX142597 | EU514222 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132669 | <i>Musa</i> sp. | Bangladesh | JX143090 | JX142844 | JX143336 | JX142598 | EU514223 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 576 | <i>Citrullus lanatus</i> | Japan | JX143091 | JX142845 | JX143337 | JX142599 | JX143579 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 577 | <i>Momordica charantia</i> | Japan | JX143092 | JX142846 | JX143338 | JX142600 | JX143580 | Groenewald et al. 2013 |

| | | | | | | | | | |
|--|-------------------|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|
| | MUCC 584 | <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> | Japan | JX143093 | JX142847 | JX143339 | JX142601 | JX143581 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 588 | <i>Ipomoea pes-caprae</i> | Japan | JX143094 | JX142848 | JX143340 | JX142602 | JX143582 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora coniogrammes</i> | CBS 132634 (TYPE) | <i>Coniogramme japonica</i> var. <i>gracilis</i> | Australia | JX143095 | JX142849 | JX143341 | JX142603 | JX143583 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora corchori</i> | MUCC 585 (TYPE) | <i>Corchorus olitorius</i> | Japan | JX143096 | JX142850 | JX143342 | JX142604 | JX143584 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>coreopsisidis</i> | CBS 132598 | <i>Coreopsis lanceolata</i> | S. Korea | JX143097 | JX142851 | JX143343 | JX142605 | JX143585 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10122 | <i>Coreopsis lanceolata</i> | S. Korea | JX143098 | JX142852 | JX143344 | JX142606 | JX143586 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora delaireae</i> | CBS 132595 (TYPE) | <i>Delairea odorata</i> | S. Africa | JX143099 | JX142853 | JX143345 | JX142607 | JX143587 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10627 | <i>Delairea odorata</i> | S. Africa | JX143100 | JX142854 | JX143346 | JX142608 | JX143588 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10628 | <i>Delairea odorata</i> | S. Africa | JX143101 | JX142855 | JX143347 | JX142609 | JX143589 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10629 | <i>Delairea odorata</i> | S. Africa | JX143102 | JX142856 | JX143348 | JX142610 | JX143590 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora dispori</i> | CBS 132608 | <i>Disporum viridescens</i> | S. Korea | JX143103 | JX142857 | JX143349 | JX142611 | JX143591 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>erysimi</i> | CBS 115059 | <i>Erysimum mutabile</i> | New Zealand | JX143104 | JX142858 | JX143350 | JX142612 | JX143592 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora euphorbiae-sieboldiana</i> | CBS 113306 (TYPE) | <i>Euphorbia sieboldiana</i> | S. Korea | JX143105 | JX142859 | JX143351 | JX142613 | JX143593 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora fagopyri</i> | CBS 132623 (TYPE) | <i>Fagopyrum esculentum</i> | S. Korea | JX143106 | JX142860 | JX143352 | JX142614 | JX143594 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132640 | <i>Fallopia dumentorum</i> | S. Korea | JX143107 | JX142861 | JX143353 | JX142615 | JX143595 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132649 | <i>Viola mandshurica</i> | S. Korea | JX143108 | JX142862 | JX143354 | JX142616 | JX143596 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132671 | <i>Cercis chinensis</i> | S. Korea | JX143109 | JX142863 | JX143355 | JX142617 | JX143597 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 130 | <i>Cosmos bipinnata</i> | Japan | JX143110 | JX142864 | JX143356 | JX142618 | JX143598 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 866 | <i>Hibiscus syriacus</i> | Japan | JX143111 | JX142865 | JX143357 | JX142619 | JX143599 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i> | CBS 132637 | <i>Trachelium</i> sp. | Israel | | | | | JX143600 | Groenewald et al. 2013 |

| | | | | | | | | | |
|--|-------------------|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|
| <i>Cercospora</i> cf. <i>helianthicola</i> | MUCC 716 | <i>Helianthus tuberosus</i> | Japan | JX143128 | JX142882 | JX143374 | JX142636 | JX143615 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>ipomoeae</i> | CBS 132639 | <i>Persicaria thunbergii</i> | S. Korea | JX143129 | JX142883 | JX143375 | JX142637 | JX143616 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132652 | <i>Ipomoea nil</i> | S. Korea | JX143130 | JX142884 | JX143376 | JX142638 | JX143617 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 442 | <i>Ipomoea aquatica</i> | Japan | JX143131 | JX142885 | JX143377 | JX142639 | JX143618 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora kikuchii</i> | CBS 128.27 (TYPE) | <i>Glycine soja</i> | Japan | DQ835107 | DQ835134 | DQ835088 | DQ835161 | DQ835070 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132633 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143132 | JX142886 | JX143378 | JX142640 | JX143619 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 135.28 | <i>Glycine soja</i> | Japan | DQ835108 | DQ835135 | DQ835089 | DQ835162 | DQ835071 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 590 | <i>Glycine soja</i> | Japan | JX143133 | JX142887 | JX143379 | JX142641 | JX143620 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora lactucae-sativae</i> | CBS 132604 | <i>Ixeris chinensis</i> subsp. <i>strigosa</i> | S. Korea | JX143134 | JX142888 | JX143380 | JX142642 | JX143621 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10082 | <i>Ixeris chinensis</i> subsp. <i>strigosa</i> | S. Korea | JX143135 | JX142889 | JX143381 | JX142643 | JX143622 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 570 | <i>Lactuca sativa</i> | Japan | JX143136 | JX142890 | JX143382 | JX142644 | JX143623 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 571 | <i>Lactuca sativa</i> | Japan | JX143137 | JX142891 | JX143383 | JX142645 | JX143624 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>malloti</i> | MUCC 575 | <i>Cucumis melo</i> | Japan | JX143138 | JX142892 | JX143384 | JX142646 | JX143625 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 787 | <i>Mallotus japonicus</i> | Japan | JX143139 | JX142893 | JX143385 | JX142647 | JX143626 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora mercurialis</i> | CBS 549.71 | <i>Mercurialis annua</i> | Romania | JX143140 | JX142894 | JX143386 | JX142648 | JX143627 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 550.71 (TYPE) | <i>Mercurialis perennis</i> | Romania | JX143141 | JX142895 | JX143387 | JX142649 | JX143628 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 551.71 | <i>Mercurialis ovata</i> | Romania | JX143142 | JX142896 | JX143388 | JX142650 | JX143629 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>modiolae</i> | CPC 5115 | <i>Modiola caroliniana</i> | New Zealand | JX143143 | JX142897 | JX143389 | JX142651 | JX143630 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>nicotianae</i> | CBS 131.32 | <i>Nicotiana tabacum</i> | Indonesia | DQ835119 | DQ835146 | DQ835099 | DQ835173 | DQ835073 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132632 | <i>Glycine max</i> | Mexico | JX143144 | JX142898 | JX143390 | JX142652 | JX143631 | Groenewald et al. 2013 |

| | | | | | | | | | |
|--|-------------------|---------------------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|
| | CBS 570.69 | <i>Nicotiana tabacum</i> | Nigeria | DQ835120 | DQ835147 | DQ835100 | DQ835174 | DQ835074 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora olivascens</i> | CBS 253.67 (TYPE) | <i>Aristolochia clematidis</i> | Romania | JX143145 | JX142899 | JX143391 | JX142653 | JX143632 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>physalidis</i> | CBS 765.79 | <i>Solanum tuberosum</i> | Peru | JX143146 | JX142900 | JX143392 | JX142654 | JX143633 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora pileicola</i> | CBS 132607 (TYPE) | <i>Pilea pumila</i> | S. Korea | JX143147 | JX142901 | JX143393 | JX142655 | JX143634 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132647 | <i>Pilea hamaoi</i> | S. Korea | JX143148 | JX142902 | JX143394 | JX142656 | JX143635 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 11369 | <i>Pilea pumila</i> | S. Korea | JX143149 | JX142903 | JX143395 | JX142657 | JX143636 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora polygonacea</i> | CBS 132614 | <i>Persicaria longiseta</i> | S. Korea | JX143150 | JX142904 | JX143396 | JX142658 | JX143637 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora punctiformis</i> | CBS 132626 | <i>Cynanachum wilfordii</i> | S. Korea | JX143151 | JX142905 | JX143397 | JX142659 | JX143638 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>resedae</i> | CBS 118793 | <i>Reseda odorata</i> | New Zealand | JX143152 | JX142906 | JX143398 | DQ233421 | JX143639 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 257.67 | <i>Helianthemum</i> sp. | Romania | DQ233369 | DQ233395 | DQ233343 | JX142660 | DQ233319 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>richardiicola</i> | CBS 132627 | <i>Ajuga multiflora</i> | S. Korea | JX143153 | JX142907 | JX143399 | JX142661 | JX143640 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 128 | <i>Tagetes erecta</i> | Japan | JX143154 | JX142908 | JX143400 | JX142662 | JX143641 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 132 | <i>Osteospermum</i> sp. | Japan | JX143155 | JX142909 | JX143401 | JX142663 | JX143642 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 138 | <i>Fuchsia</i> × <i>hybrida</i> | Japan | JX143156 | JX142910 | JX143402 | JX142664 | JX143643 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 578 | <i>Zantedeschia</i> sp. | Japan | JX143157 | JX142911 | JX143403 | JX142665 | JX143644 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 582 | <i>Gerbera hybrida</i> | Japan | JX143158 | JX142912 | JX143404 | JX142666 | JX143645 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora ricinella</i> | CBS 132605 | <i>Ricinus communis</i> | S. Korea | JX143159 | JX142913 | JX143405 | JX142667 | JX143646 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10104 | <i>Ricinus communis</i> | S. Korea | JX143160 | JX142914 | JX143406 | JX142668 | JX143647 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora rodmanii</i> | CBS 113123 | <i>Eichhornia crassipes</i> | Brazil | DQ835122 | DQ835149 | AF146136 | DQ835176 | DQ835076 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 113124 | <i>Eichhornia crassipes</i> | Mexico | DQ835123 | DQ835150 | AF146137 | DQ835177 | DQ835077 | Groenewald et al. 2013 |

| | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|
| | CBS 113125 | <i>Eichhornia crassipes</i> | Zambia | DQ835124 | DQ835151 | AF146146 | DQ835178 | DQ835078 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 113126 | <i>Eichhornia crassipes</i> | Brazil | DQ835125 | DQ835152 | AF146138 | DQ835179 | DQ835079 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 113128 | <i>Eichhornia crassipes</i> | FL, USA | DQ835126 | DQ835153 | AF146142 | DQ835180 | DQ835080 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 113129 | <i>Eichhornia crassipes</i> | FL, USA | DQ835127 | DQ835154 | AF146143 | DQ835181 | DQ835081 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 113130 | <i>Eichhornia crassipes</i> | FL, USA | DQ835128 | DQ835155 | AF146144 | DQ835182 | DQ835082 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 113131 | <i>Eichhornia crassipes</i> | Venezuela | DQ835129 | DQ835156 | AF146148 | DQ835183 | DQ835083 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora rumicis</i> | CPC 5439 | <i>Rumex sanguineus</i> | New Zealand | JX143161 | JX142915 | JX143407 | JX142669 | JX143648 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora senecionis-walkeri</i> | CBS 132636 | <i>Senecio walkeri</i> | Laos | JX143162 | JX142916 | JX143408 | JX142670 | JX143649 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora cf. sigesbeckiae</i> | CBS 132601 | <i>Sigesbeckia glabrescens</i> | S. Korea | JX143163 | | JX143409 | JX142671 | JX143650 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132606 | <i>Paulownia coreana</i> | S. Korea | JX143164 | JX142918 | JX143410 | JX142672 | JX143651 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132621 | <i>Sigesbeckia pubescens</i> | S. Korea | JX143165 | JX142919 | JX143411 | JX142673 | JX143652 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132641 | <i>Persicaria orientalis</i> | S. Korea | JX143166 | JX142920 | JX143412 | JX142674 | JX143653 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132642 | <i>Pilea pumila</i> | S. Korea | JX143167 | JX142921 | JX143413 | JX142675 | JX143654 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132675 | <i>Malva verticillata</i> | S. Korea | JX143168 | JX142922 | JX143414 | JX142676 | JX143655 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 587 | <i>Begonia sp.</i> | Japan | JX143169 | JX142923 | JX143415 | JX142677 | JX143656 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 589 | <i>Glycine max</i> | Japan | JX143170 | JX142924 | JX143416 | JX142678 | JX143657 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 849 | <i>Dioscorea tokoro</i> | Japan | JX143171 | JX142925 | JX143417 | JX142679 | JX143658 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora sojina</i> | CBS 132018 | <i>Glycine soja</i> | S. Korea | JX143172 | JX142926 | JX143418 | JX142680 | GU214655 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132615 (TYPE) | <i>Glycine soja</i> | S. Korea | JX143173 | JX142927 | JX143419 | JX142681 | JX143659 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132684 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143174 | JX142928 | JX143420 | JX142682 | JX143660 | Groenewald et al. 2013 |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------|-------------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|
| | CPC 11420 | <i>Glycine soja</i> | S. Korea | JX143175 | JX142929 | JX143421 | JX142683 | JX143661 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17964 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143176 | JX142930 | JX143422 | JX142684 | JX143662 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17965 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143177 | JX142931 | JX143423 | JX142685 | JX143663 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17966 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143178 | JX142932 | JX143424 | JX142686 | JX143664 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17967 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143179 | JX142933 | JX143425 | JX142687 | JX143665 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17968 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143180 | JX142934 | JX143426 | JX142688 | JX143666 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17969 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143181 | JX142935 | JX143427 | JX142689 | JX143667 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17970 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143182 | JX142936 | JX143428 | JX142690 | JX143668 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17972 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143183 | JX142937 | JX143429 | JX142691 | JX143669 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17973 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143184 | JX142938 | JX143430 | JX142692 | JX143670 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17974 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143185 | JX142939 | JX143431 | JX142693 | JX143671 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17975 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143186 | JX142940 | JX143432 | JX142694 | JX143672 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17976 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143187 | JX142941 | JX143433 | JX142695 | JX143673 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 17977 | <i>Glycine max</i> | Argentina | JX143188 | JX142942 | JX143434 | JX142696 | JX143674 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. A | CBS 132631 | <i>Chenopodium</i> sp. | Mexico | JX143189 | JX142943 | JX143435 | JX142697 | JX143675 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. B | CBS 132602 | <i>Ipomoea purpurea</i> | South Korea | JX143190 | JX142944 | JX143436 | JX142698 | JX143676 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. C | CBS 132629 | - | Mexico | JX143191 | JX142945 | JX143437 | JX142699 | JX143677 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. D | CBS 132630 | - | Mexico | JX143192 | JX142946 | JX143438 | JX142700 | JX143678 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. E | CBS 132628 | Unidentified wild plant | Mexico | JX143193 | JX142947 | JX143439 | JX142701 | JX143679 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 15801 | Unidentified wild plant | Mexico | JX143194 | JX142948 | JX143440 | JX142702 | JX143680 | Groenewald et al. 2013 |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|
| <i>Cercospora</i> sp. F | CBS 132618 | <i>Zea mays</i> | S. Africa | DQ185095 | DQ185107 | DQ185083 | DQ185119 | DQ185071 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. G | CBS 115518 | <i>Bidens frondosa</i> | New Zealand | JX143195 | JX142949 | JX143441 | JX142703 | JX143681 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 5438 | <i>Salvia viscosa</i> | New Zealand | JX143196 | JX142950 | JX143442 | JX142704 | JX143682 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. H | CBS 115205 | <i>Dichondra repens</i> | New Zealand | JX143197 | JX142951 | JX143443 | JX142705 | JX143683 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 11620 | <i>Chamelaucium uncinatum</i> | Argentina | JX143198 | JX142952 | JX143444 | JX142706 | JX143684 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. I | CBS 114815 | <i>Deutzia purpurascens</i> | New Zealand | JX143199 | JX142953 | JX143445 | JX142707 | JX143685 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 114816 | <i>Deutzia</i> × <i>rosea</i> (= <i>D. gracilis</i> × <i>purpurascens</i>) | New Zealand | JX143200 | JX142954 | JX143446 | JX142708 | JX143686 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 114817 | <i>Fuchsia procumbens</i> | New Zealand | JX143201 | JX142955 | JX143447 | JX142709 | JX143687 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 114818 | <i>Deutzia crenata</i> | New Zealand | JX143202 | JX142956 | JX143448 | JX142710 | JX143688 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 115117 | <i>Archontophoenix cunninghamiana</i> | New Zealand | JX143203 | JX142957 | JX143449 | JX142711 | JX143689 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 115121 | <i>Gunnera tinctoria</i> | New Zealand | JX143204 | JX142958 | JX143450 | JX142712 | JX143690 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132597 | <i>Coreopsis verticillata</i> | New Zealand | JX143205 | JX142959 | JX143451 | JX142713 | JX143691 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132643 | <i>Ajuga multiflora</i> | South Korea | JX143206 | JX142960 | JX143452 | JX142714 | JX143692 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10616 | <i>Coreopsis verticillata</i> | New Zealand | JX143207 | JX142961 | JX143453 | JX142715 | JX143693 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 5440 | <i>Nicotiana</i> sp. | New Zealand | JX143208 | JX142962 | JX143454 | JX142716 | JX143694 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. J | MUCC 541 | <i>Antirrhinum majus</i> | Japan | JX143209 | JX142963 | JX143455 | JX142717 | JX143695 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. K | CBS 132603 | <i>Ipomoea coccinea</i> (≡ <i>Quamoclit coccinea</i>) | South Korea | JX143210 | JX142964 | JX143456 | JX142718 | JX143696 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10094 | <i>Ipomoea coccinea</i> (≡ <i>Quamoclit coccinea</i>) | South Korea | JX143211 | JX142965 | JX143457 | JX142719 | JX143697 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 12391 | <i>Ipomoea coccinea</i> (≡ <i>Quamoclit coccinea</i>) | South Korea | JX143212 | JX142966 | JX143458 | JX142720 | JX143698 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. L | CBS 115477 | <i>Crepis capillaris</i> | New Zealand | JX143213 | JX142967 | JX143459 | JX142721 | JX143699 | Groenewald et al. 2013 |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------------|--|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|
| <i>Cercospora</i> sp. M | CBS 132596 | <i>Acacia mangium</i> | Thailand | AY752203 | AY752234 | AY752175 | AY752265 | JX143700 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. N | CBS 132619 | <i>Musa</i> sp. | Bangladesh | JX143214 | JX142968 | JX143460 | JX142722 | EU514224 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. O | CBS 132635 | <i>Musa</i> sp. | Thailand | JX143215 | JX142969 | JX143461 | JX142723 | JX143701 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. P | CBS 112649 | <i>Citrus</i> sp., leaf spot | Swaziland | DQ835109 | DQ835136 | DQ835090 | DQ835163 | AY260072 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 112722 | <i>Citrus</i> sp., leaf spot | Swaziland | DQ835110 | DQ835137 | DQ835091 | DQ835164 | AY260073 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 112728 | <i>Citrus</i> × <i>sinensis</i> (≡ <i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i>) | S. Africa | DQ835111 | DQ835138 | DQ835092 | DQ835165 | AY260076 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 112730 | <i>Citrus</i> × <i>sinensis</i> (≡ <i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i>) | S. Africa | DQ835112 | DQ835139 | DQ835093 | DQ835166 | AY260075 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 112894 | <i>Citrus</i> × <i>sinensis</i> (≡ <i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i>) | S. Africa | DQ835113 | DQ835140 | DQ835094 | DQ835167 | AY260077 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 113996 | <i>Cajanus cajan</i> | S. Africa | JX143216 | JX142970 | JX143462 | JX142724 | JX143702 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 115413 | <i>Cajanus cajan</i> | S. Africa | JX143217 | JX142971 | JX143463 | JX142725 | JX143703 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 115609 | <i>Citrus</i> sp., leaf spot | Swaziland | DQ835115 | DQ835142 | DQ835096 | DQ835169 | AY260074 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10526 (TYPE) | <i>Acacia mangium</i> | Thailand | AY752204 | AY752235 | AY752176 | AY752266 | AY752141 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132645 | <i>Acacia mangium</i> | Thailand | AY752205 | AY752236 | AY752177 | AY752267 | AY752142 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132660 | <i>Dioscorea rotundata</i> | Ghana | JX143218 | JX142972 | JX143464 | JX142726 | JX143704 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132662 | <i>Dioscorea nummularia</i> | Papua New Guinea | JX143219 | JX142973 | JX143465 | JX142727 | JX143705 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132664 | <i>Dioscorea rotundata</i> | Papua New Guinea | JX143220 | JX142974 | JX143466 | JX142728 | JX143706 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132665 | <i>Dioscorea bulbifera</i> | Papua New Guinea | JX143221 | JX142975 | JX143467 | JX142729 | JX143707 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132680 | <i>Ricinus communis</i> | Mexico | JX143222 | JX142976 | JX143468 | JX142730 | JX143708 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10552 | <i>Acacia mangium</i> | Thailand | AY752202 | AY752233 | AY752174 | AY752264 | JX143709 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 11630 | <i>Dioscorea rotundata</i> | Ghana | JX143223 | JX142977 | JX143469 | JX142731 | JX143710 | Groenewald et al. 2013 |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------|---|---|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|
| | CPC 11631 | <i>Dioscorea rotundata</i> | Ghana | JX143224 | JX142978 | JX143470 | JX142732 | JX143711 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 11632 | <i>Dioscorea rotundata</i> | Ghana | JX143225 | JX142979 | JX143471 | JX142733 | JX143712 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 11633 | <i>Dioscorea rotundata</i> | Ghana | JX143226 | JX142980 | JX143472 | JX142734 | JX143713 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 4001 | <i>Citrus × sinensis</i> (≡ <i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i>) | Swaziland | DQ835116 | DQ835143 | AY343335 | DQ835170 | AY343372 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 4002 | <i>Citrus × sinensis</i> (≡ <i>C. aurantium</i> var. <i>sinensis</i>) | Swaziland | DQ835117 | DQ835144 | DQ835097 | DQ835171 | DQ835072 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 5262 | <i>Hibiscus sabdariffa</i> | New Zealand: Auckland (imported from Fiji) | JX143227 | JX142981 | JX143473 | JX142735 | JX143714 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 5327 | <i>Cajanus cajan</i> | S. Africa | JX143228 | JX142982 | JX143474 | JX142736 | JX143715 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 771 | <i>Coffea arabica</i> | Japan | JX143229 | JX142983 | JX143475 | JX142737 | JX143716 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. Q | CBS 113997 | <i>Cajanus cajan</i> | S. Africa | JX143230 | JX142984 | JX143476 | JX142738 | JX143717 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 115410 | <i>Cajanus cajan</i> | S. Africa | JX143231 | JX142985 | JX143477 | JX142739 | JX143718 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 115411 | <i>Cajanus cajan</i> | S. Africa | JX143232 | JX142986 | JX143478 | JX142740 | JX143719 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 115412 | <i>Cajanus cajan</i> | S. Africa | JX143233 | JX142987 | JX143479 | JX142741 | JX143720 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 115536 | <i>Cajanus cajan</i> | S. Africa | JX143234 | JX142988 | JX143480 | JX142742 | JX143721 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 115537 | <i>Cajanus cajan</i> | S. Africa | JX143235 | JX142989 | JX143481 | JX142743 | JX143722 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132656 | <i>Acacia mangium</i> | Thailand | JX143236 | JX142990 | JX143482 | JX142744 | JX143723 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132661 | <i>Dioscorea rotundata</i> | Papua New Guinea | JX143237 | JX142991 | JX143483 | JX142745 | JX143724 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132663 | <i>Dioscorea esculenta</i> | Papua New Guinea | JX143238 | JX142992 | JX143484 | JX142746 | JX143725 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132679 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Mexico | JX143239 | JX142993 | JX143485 | JX142747 | JX143726 | Groenewald et al. 2013 |
| | CBS 132681 | <i>Euphorbia</i> sp. | Mexico | JX143240 | JX142994 | JX143486 | JX142748 | JX143727 | Groenewald et al. 2013 |

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------------|--|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|
| | CBS 132682 | <i>Taraxacum</i> sp. | Mexico | JX143241 | JX142995 | JX143487 | JX142749 | | JX143728 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10550 | <i>Acacia mangium</i> | Thailand | AY752200 | AY752231 | AY752172 | AY752262 | | AY752139 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 10551 | <i>Acacia mangium</i> | Thailand | AY752201 | AY752232 | AY752173 | AY752263 | | AY752140 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 11539 | <i>Acacia mangium</i> | Thailand | JX143242 | JX142996 | JX143488 | JX142750 | | JX143729 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 11639 | <i>Dioscorea rotundata</i> | Papua New Guinea | JX143243 | JX142997 | JX143489 | JX142751 | | JX143730 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 15875 | <i>Euphorbia</i> sp. | Mexico | JX143244 | JX142998 | JX143490 | JX142752 | | JX143731 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. R | CBS 114644 | <i>Myoporum laetum</i> | New Zealand | JX143245 | JX142999 | JX143491 | JX142753 | | JX143732 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora</i> sp. S | CBS 132599 | <i>Crepidiastrum denticulatum</i> (= <i>Youngia denticulata</i>) | South Korea | JX143246 | JX143000 | JX143492 | JX142754 | | JX143733 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora vignigena</i> T | CBS 132611 (TYPE) | <i>Vigna unguiculata</i> | S. Korea | JX143247 | JX143001 | JX143493 | JX142755 | | JX143734 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 1134 | <i>Vigna unguiculata</i> | S. Africa | JX143248 | JX143002 | JX143494 | JX142756 | | JX143735 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 579 | <i>Vigna unguiculata</i> | Japan | JX143249 | JX143003 | JX143495 | JX142757 | | JX143736 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora violae</i> | CBS 251.67 (TYPE) | <i>Viola tricolor</i> | Romania | JX143250 | JX143004 | JX143496 | JX142758 | | JX143737 | Groenewald et al. 2013 |
| | CPC 5368 | <i>Viola odorata</i> | New Zealand | JX143251 | JX143005 | JX143497 | JX142759 | | JX143738 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 129 | <i>Viola</i> sp. | Japan | JX143252 | JX143006 | JX143498 | JX142760 | | JX143739 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 133 | <i>Viola tricolor</i> | Japan | JX143253 | JX143007 | JX143499 | JX142761 | | JX143740 | Groenewald et al. 2013 |
| | MUCC 136 | <i>Viola tricolor</i> | Japan | JX143254 | JX143008 | JX143500 | JX142762 | | JX143741 | Groenewald et al. 2013 |
| <i>Cercospora althaeina</i> | CCTU 1028 | <i>Althaea rosea</i> | Iran | KJ886233 | KJ885911 | KJ885750 | KJ886072 | MH496166 | | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1001 | <i>Althaea rosea</i> | Iran | KJ886231 | KJ885909 | KJ885748 | KJ886070 | MH496167 | | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1026 | <i>Althaea rosea</i> | Iran | KJ886232 | KJ885910 | KJ885749 | KJ886071 | MH496168 | | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1152 | <i>Althaea rosea</i> | Iran | KJ886235 | KJ885913 | KJ885752 | KJ886074 | MH496169 | | Bakhshi et al. 2018 |

| | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|--|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|
| | CBS 248.67; CPC 5117 (TYPE) | <i>Althaea rosea</i> | Romania | JX143284 | JX143038 | JX142792 | JX142546 | MH496170 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1194; IRAN 2674C | <i>Malva sylvestris</i> | Iran | KJ886236 | KJ885914 | KJ885753 | KJ886075 | MH496171 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1071 | <i>Malva sylvestris</i> | Iran | KJ886234 | KJ885912 | KJ885751 | KJ886073 | MH496172 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora apii</i> | CBS 116455; CPC 11556 (TYPE) | <i>Apium graveolens</i> | Germany | AY840486 | AY840450 | AY840417 | AY840384 | MH496173 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 536.71; CPC 5087 | <i>Apium graveolens</i> | Romania | AY752166 | AY752194 | AY752225 | AY752256 | MH496174 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1069 | <i>Cynanchum acutum</i> | Iran | KJ886249 | KJ885927 | KJ885766 | KJ886088 | MH496175 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1086; CBS 136037; IRAN 2655C | <i>Cynanchum acutum</i> | Iran | KJ886250 | KJ885928 | KJ885767 | KJ886089 | MH496176 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1215 | <i>Cynanchum acutum</i> | Iran | KJ886251 | KJ885929 | KJ885768 | KJ886090 | MH496177 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1219; CBS 136155 | <i>Cynanchum acutum</i> | Iran | KJ886252 | KJ885930 | KJ885769 | KJ886091 | MH496178 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CPC 5112 | <i>Molucella laevis</i> | New zealand | DQ233347 | DQ233373 | DQ233399 | DQ233425 | MH496179 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 110813; CPC 5110;01-3 | <i>Molucella laevis</i> | U.S.A., California | DQ233345 | DQ233371 | DQ233397 | DQ233423 | MH496180 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora armoraciae</i> | CBS 250.67; CPC 5088 (TYPE) | <i>Armoracia rusticana</i> (= <i>A. lapathifolia</i>) | Romania | JX143299 | JX143053 | JX142807 | JX142561 | MH496181 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora beticola</i> | CPC 12028 | <i>Beta vulgaris</i> | Egypt | DQ233362 | DQ233388 | DQ233414 | DQ233437 | MH496182 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CPC 12029 | <i>Beta vulgaris</i> | Egypt | DQ233363 | DQ233389 | DQ233415 | DQ233438 | MH496183 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1135 | <i>Beta vulgaris</i> | Iran | KJ886271 | KJ885949 | KJ885788 | KJ886110 | MH496184 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 116456; CPC 11557 (TYPE) | <i>Beta vulgaris</i> | Italy | AY840494 | AY840458 | AY840425 | AY840392 | MH496185 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1057; IRAN 2651C | <i>Chenopodium</i> sp. | Iran | KJ886263 | KJ885941 | KJ885780 | KJ886102 | MH496186 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1065 | <i>Chenopodium</i> sp. | Iran | KJ886264 | KJ885942 | KJ885781 | KJ886103 | MH496187 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1087 | <i>Chenopodium</i> sp. | Iran | KJ886266 | KJ885944 | KJ885783 | KJ886105 | MH496188 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1089; CPC 24911 | <i>Plantago lanceolata</i> | Iran | KJ886268 | KJ885946 | KJ885785 | KJ886107 | MH496189 | Bakhshi et al. 2018 |

| | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|
| | CCTU 1108 | <i>Plantago lanceolata</i> | Iran | KJ886269 | KJ885947 | KJ885786 | KJ886108 | MH496190 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora bizzoeriana</i> | CCTU 1088; CBS 138582 | <i>Sonchus asper</i> | Iran | KJ886267 | KJ885945 | KJ885784 | KJ886106 | MH496191 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1013 | ? | Iran | KJ886253 | KJ885931 | KJ885770 | KJ886092 | MH496192 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1022; CBS 136028 | ? | Iran | KJ886254 | KJ885932 | KJ885771 | KJ886093 | MH496193 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1127; CBS 136133 | <i>Capparis spinosa</i> | Iran | KJ886259 | KJ885937 | KJ885776 | KJ886098 | MH496194 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1117; CBS 136132 | <i>Cardaria draba</i> | Iran | KJ886257 | KJ885935 | KJ885774 | KJ886096 | MH496195 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1234 | <i>Cardaria draba</i> | Iran | KJ886258 | KJ885936 | KJ885775 | KJ886097 | MH496196 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1107 | ? | Iran | KJ886256 | KJ885934 | KJ885773 | KJ886095 | MH496197 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 258.67; CPC 5061 (TYPE) | <i>Cardaria draba</i> | Romania | JX143300 | JX143054 | JX142808 | JX142562 | MH496198 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 540.71; IMI 161110; CPC 5060 | <i>Cardaria draba</i> | Romania | JX143302 | JX143056 | JX142810 | JX142564 | MH496199 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora chenopodii</i> | CCTU 1040; CBS 136131 | <i>Tanacetum balsamita</i> | Iran | KJ886255 | KJ885933 | KJ885772 | KJ886094 | MH496200 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1060; IRAN 2652C | <i>Chenopodium album</i> | Iran | KJ886277 | KJ885955 | KJ885794 | KJ886116 | MH496201 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1163 | <i>Chenopodium album</i> | Iran | KJ886279 | KJ885957 | KJ885796 | KJ886118 | MH496202 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1033 | <i>Chenopodium album</i> | Iran | KJ886276 | KJ885954 | KJ885793 | KJ886115 | MH496203 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora convolvulicola</i> | CCTU 1083; CBS 136126 (TYPE) | <i>Convolvulus arvensis</i> | Iran | KJ886280 | KJ885958 | KJ885797 | KJ886119 | MH496204 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1083.2 | <i>Convolvulus arvensis</i> | Iran | KJ886281 | KJ885959 | KJ885798 | KJ886120 | MH496205 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora conyzae-canadensis</i> | CCTU 1008 | <i>Conyza canadensis</i> | Iran | KJ886282 | KJ885960 | KJ885799 | KJ886121 | MH496206 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1119; CBS 135978 (TYPE) | <i>Conyza canadensis</i> | Iran | KJ886284 | KJ885962 | KJ885801 | KJ886123 | MH496207 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1105; IRAN 2657C | <i>Conyza canadensis</i> | Iran | KJ886283 | KJ885961 | KJ885800 | KJ886122 | MH496208 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora cylindracea</i> | CCTU 1016 | <i>Cichorium intybus</i> | Iran | KJ886285 | KJ885963 | KJ885802 | KJ886124 | MH496209 | Bakhshi et al. 2018 |

| | | | | | | | | | |
|---|--|--|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|
| | CCTU 1114 | <i>Cichorium intybus</i> | Iran | KJ886289 | KJ885967 | KJ885806 | KJ886128 | MH496210 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1081; CBS 138580; IRAN 2654C (TYPE) | <i>Lactuca serriola</i> | Iran | KJ886288 | KJ885966 | KJ885805 | KJ886127 | MH496211 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1207 | <i>Lactuca serriola</i> | Iran | KJ886292 | KJ885970 | KJ885809 | KJ886131 | MH496212 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1044; CBS 136021 | <i>Lactuca serriola</i> | Iran | KJ886286 | KJ885964 | KJ885803 | KJ886125 | MH496213 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1183 | <i>Lactuca serriola</i> | Iran | KJ886290 | KJ885968 | KJ885807 | KJ886129 | MH496214 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1189 | <i>Lactuca serriola</i> | Iran | KJ886291 | KJ885969 | KJ885808 | KJ886130 | MH496215 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1049 | <i>Lactuca serriola</i> | Iran | KJ886287 | KJ885965 | KJ885804 | KJ886126 | MH496216 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora cf. flagellaris</i> clade 1 | CPC 5441 | <i>Amaranthus sp.</i> | Fiji | JX143370 | JX143124 | JX142878 | JX142632 | MH496217 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1159; CBS 136148 | <i>Arachis hypogaea</i> | Iran | KJ886332 | KJ886010 | KJ885849 | KJ886171 | MH496218 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1162; IRAN 2670C | <i>Citrullus lanatus</i> | Iran | KJ886335 | KJ886013 | KJ885852 | KJ886174 | MH496219 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 132653; CPC 10884 | <i>Dysphania ambrosioides</i> (≡ <i>Chenopodium ambrosioides</i>) | South Korea | JX143361 | JX143115 | JX142869 | JX142623 | MH496220 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1007; CBS 136031 | <i>Hydrangea sp.</i> | Iran | KJ886295 | KJ885973 | KJ885812 | KJ886134 | MH496221 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1027; CBS 136034 | <i>Lepidium sativum</i> | Iran | KJ886298 | KJ885976 | KJ885815 | KJ886137 | MH496222 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1128; CBS 136141; IRAN 2661C | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Iran | KJ886315 | KJ885993 | KJ885832 | KJ886154 | MH496223 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1168; IRAN 2715C | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Iran | KJ886338 | KJ886016 | KJ885855 | KJ886177 | MH496224 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CPC 1051 | <i>Populus deltoides</i> | South Africa | JX143367 | JX143121 | JX142875 | JX142629 | MH496225 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1171 | <i>Raphanus sativus</i> | Iran | KJ886339 | KJ886017 | KJ885856 | KJ886178 | MH496226 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1120 | <i>Raphanus sativus</i> | Iran | KJ886314 | KJ885992 | KJ885831 | KJ886153 | MH496227 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1031; CBS 136036; IRAN 2648C | <i>Urtica dioica</i> | Iran | KJ886300 | KJ885978 | KJ885817 | KJ886139 | MH496228 | Bakhshi et al. 2018 |

| | | | | | | | | | |
|--|-----------------------------------|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|
| <i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i> clade 2 | CCTU 1204 | <i>Abutilon theophrasti</i> | Iran | KJ886344 | KJ886022 | KJ885861 | KJ886183 | MH496229 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1198; CBS 136151 | <i>Acer velutinum</i> | Iran | KJ886343 | KJ886021 | KJ885860 | KJ886182 | MH496230 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 132667; CPC 11643 | <i>Celosia argentea</i> var. <i>cristata</i> (≡ <i>C. cristata</i>) | South Korea | JX143362 | JX143116 | JX142870 | JX142624 | MH496231 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1115; CBS 136139; IRAN 2659C | <i>Cercis siliquastrum</i> | Iran | KJ886312 | KJ885990 | KJ885829 | KJ886151 | MH496232 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1195 | <i>Datura stramonium</i> | Iran | KJ886342 | KJ886020 | KJ885859 | KJ886181 | MH496233 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1059; CBS 136136 | <i>Ecballium elaterium</i> | Iran | KJ886303 | KJ885981 | KJ885820 | KJ886142 | MH496234 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1216; IRAN 2717C | <i>Ecballium elaterium</i> | Iran | KJ886349 | KJ886027 | KJ885866 | KJ886188 | MH496235 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1223; CBS 136154; IRAN 2683C | <i>Eclipta prostrata</i> | Iran | KJ886351 | KJ886029 | KJ885868 | KJ886190 | MH496236 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1068 | <i>Xanthium spinosum</i> | Iran | KJ886305 | KJ885983 | KJ885822 | KJ886144 | MH496237 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1085 | <i>Xanthium strumarium</i> | Iran | KJ886310 | KJ885988 | KJ885827 | KJ886149 | MH496238 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>flagellaris</i> clade 3 | CCTU 1172 | <i>Oenothera biennis</i> | Iran | KJ886340 | KJ886018 | KJ885857 | KJ886179 | MH496239 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1154; CBS 136147 | <i>Abutilon theophrasti</i> | Iran | KJ886328 | KJ886006 | KJ885845 | KJ886167 | MH496240 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1072; IRAN 2653C | <i>Amaranthus blitoides</i> | Iran | KJ886307 | KJ885985 | KJ885824 | KJ886146 | MH496241 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1064 | <i>Amaranthus retroflexus</i> | Iran | KJ886304 | KJ885982 | KJ885821 | KJ886143 | MH496242 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1021; CBS 136033 | <i>Amaranthus retroflexus</i> | Iran | KJ886297 | KJ885975 | KJ885814 | KJ886136 | MH496243 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1084; CBS 136156 | <i>Amaranthus</i> sp. | Iran | KJ886309 | KJ885987 | KJ885826 | KJ886148 | MH496244 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1167; CBS 136150 | <i>Anubias</i> sp. | Iran | KJ886337 | KJ886015 | KJ885854 | KJ886176 | MH496245 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 143.51; CPC 5055 | <i>Bromus</i> sp. | - | JX143365 | JX143119 | JX142873 | JX142627 | MH496246 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1150 | <i>Buxus microphylla</i> | Iran | KJ886327 | KJ886005 | KJ885844 | KJ886166 | MH496247 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1140; CBS 136143; IRAN 2666C | <i>Calendula officinalis</i> | Iran | KJ886320 | KJ885998 | KJ885837 | KJ886159 | MH496248 | Bakhshi et al. 2018 |

| | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|
| CBS 115482; A207 Bs+; CPC 4410 | <i>Citrus sp.</i> | South Africa | DQ835095 | DQ835114 | DQ835141 | DQ835168 | MH496249 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1029; CBS 136035; IRAN 2647C | <i>Cucurbita maxima</i> | Iran | KJ886299 | KJ885977 | KJ885816 | KJ886138 | MH496250 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1136 | <i>Cucurbita pepo</i> | Iran | KJ886317 | KJ885995 | KJ885834 | KJ886156 | MH496251 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1143; CBS 136145 | <i>Datura stramonium</i> | Iran | KJ886323 | KJ886001 | KJ885840 | KJ886162 | MH496252 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1209; CBS 136152 | <i>Glycine max</i> | Iran | KJ886345 | KJ886023 | KJ885862 | KJ886184 | MH496253 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1210; IRAN 2679C | <i>Glycine max</i> | Iran | KJ886346 | KJ886024 | KJ885863 | KJ886185 | MH496254 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1211 | <i>Glycine max</i> | Iran | KJ886347 | KJ886028 | KJ885864 | KJ886186 | MH496255 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1218; IRAN 2682C | <i>Hibiscus trionum</i> | Iran | KJ886350 | KJ886028 | KJ885867 | KJ886189 | MH496256 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1006; CBS 136030 | <i>Impatiens balsamina</i> | Iran | KJ886294 | KJ885972 | KJ885811 | KJ886133 | MH496257 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1130; CBS 136142 | <i>Olea europaea</i> | Iran | KJ886316 | KJ885994 | KJ885833 | KJ886155 | MH496258 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1010; CBS 136032 | <i>Pelargonium hortorum</i> | Iran | KJ886296 | KJ885974 | KJ885813 | KJ886135 | MH496259 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1138; IRAN 2664C | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Iran | KJ886318 | KJ885996 | KJ885835 | KJ886157 | MH496260 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1139; IRAN 2665C | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Iran | KJ886319 | KJ885997 | KJ885836 | KJ886158 | MH496261 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1155.11 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Iran | KJ886329 | KJ886007 | KJ885846 | KJ886168 | MH496262 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1161; IRAN 2669C | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Iran | KJ886334 | KJ886012 | KJ885851 | KJ886173 | MH496263 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1175; IRAN 2673C | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Iran | KJ886341 | KJ886019 | KJ885858 | KJ886180 | MH496264 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1142; IRAN 2667C | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Iran | KJ886322 | KJ886000 | KJ885839 | KJ886161 | MH496265 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1118; CBS 136140; IRAN 2660C | <i>Populus deltoides</i> | Iran | KJ886313 | KJ885991 | KJ885830 | KJ886152 | MH496266 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1075 | <i>Raphanus sativus</i> | Iran | KJ886308 | KJ885986 | KJ885825 | KJ886147 | MH496267 | Bakhshi et al. 2018 |
| CCTU 1212; CBS 136153; IRAN 2680C | <i>Silybum marianum</i> | Iran | KJ886348 | KJ886026 | KJ885865 | KJ886187 | MH496268 | Bakhshi et al. 2018 |

| | | | | | | | | | |
|--------------------------------|---|----------------------------|------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|
| | CCTU 1141; CBS 136144 | <i>Tagetes patula</i> | Iran | KJ886321 | KJ885999 | KJ885838 | KJ886160 | MH496269 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1147 | <i>Urtica dioica</i> | Iran | KJ886325 | KJ886003 | KJ885842 | KJ886164 | MH496270 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1160; CBS 136149 | <i>Vicia faba</i> | Iran | KJ886333 | KJ886011 | KJ885850 | KJ886172 | MH496271 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1158; IRAN 2668C | <i>Xanthium strumarium</i> | Iran | KJ886331 | KJ886009 | KJ885848 | KJ886170 | MH496272 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1156 | <i>Xanthium strumarium</i> | Iran | KJ886330 | KJ886008 | KJ885847 | KJ886169 | MH496273 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1005; IRAN 2644C | <i>Xanthium strumarium</i> | Iran | KJ886293 | KJ885971 | KJ885810 | KJ886132 | MH496274 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1048; CBS 136029 | <i>Xanthium strumarium</i> | Iran | KJ886301 | KJ885979 | KJ885818 | KJ886140 | MH496275 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora gamsiana</i> | CBS 144962; CCTU 1074; CPC 24909 (TYPE) | <i>Malva neglecta</i> | Iran | KJ886265 | KJ885943 | KJ885782 | KJ886104 | MH496276 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1035 | <i>Malva sylvestris</i> | Iran | KJ886262 | KJ885940 | KJ885779 | KJ886101 | MH496277 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1109 | <i>Malva sylvestris</i> | Iran | KJ886270 | KJ886270 | KJ885787 | KJ886109 | MH496278 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1199; CBS 136128; IRAN 2675C | <i>Rumex crispus</i> | Iran | KJ886272 | KJ885950 | KJ885789 | KJ886111 | MH496279 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1205; CBS 136127; IRAN 2677C | <i>Sesamum indicum</i> | Iran | KJ886274 | KJ885952 | KJ885791 | KJ886113 | MH496280 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1208; IRAN 2678C | <i>Sonchus</i> sp. | Iran | KJ886275 | KJ885953 | KJ885792 | KJ886114 | MH496281 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora cf. gossypii</i> | CCTU 1070; CBS 136137 | <i>Gossypium herbaceum</i> | Iran | KJ886306 | KJ885984 | KJ885823 | KJ886145 | MH496282 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1055; IRAN 2650C | <i>Gossypium herbaceum</i> | Iran | KJ886302 | KJ885980 | KJ885819 | KJ886141 | MH496283 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora iranica</i> | CCTU 1196; CBS 136123 | <i>Hydrangea</i> sp. | Iran | KJ886354 | KJ886032 | KJ885871 | KJ886193 | MH496284 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1137; CBS 136124 (TYPE) | <i>Vicia faba</i> | Iran | KJ886352 | KJ886030 | KJ885869 | KJ886191 | MH496285 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora plantaginis</i> | CCTU 1082; CBS 138728 | <i>Plantago lanceolata</i> | Iran | KJ886241 | KJ885919 | KJ885758 | KJ886080 | MH496286 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1095 | <i>Plantago lanceolata</i> | Iran | KJ886242 | KJ885920 | KJ885759 | KJ886081 | MH496287 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1041; CPC 24910 | <i>Plantago lanceolata</i> | Iran | KJ886239 | KJ885917 | KJ885756 | KJ886078 | MH496288 | Bakhshi et al. 2018 |

| | | | | | | | | | |
|--|--|---------------------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|
| | CCTU 1179; IRAN 2716C | <i>Plantago lanceolata</i> | Iran | KJ886243 | KJ885921 | KJ885760 | KJ886082 | MH496289 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1047 | <i>Plantago lanceolata</i> | Iran | KJ886240 | KJ885918 | KJ885757 | KJ886079 | MH496290 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora pseudochenopodii</i> | CBS 252.67; CPC 5084 (TYPE) | <i>Plantago lanceolata</i> | Romania | DQ233342 | DQ233368 | DQ233394 | DQ233420 | MH496291 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1176 | <i>Chenopodium album</i> | Iran | KJ886357 | KJ886035 | KJ885874 | KJ886196 | MH496292 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1045 | <i>Chenopodium</i> sp. | Iran | KJ886356 | KJ886034 | KJ885873 | KJ886195 | MH496293 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>richardiicola</i> | CCTU 1038; CBS 136022; IRAN 2649C (TYPE) | <i>Chenopodium</i> sp. | Iran | KJ886355 | KJ886033 | KJ885872 | KJ886194 | MH496294 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1004 | <i>Bidens tripartita</i> | Iran | KJ886358 | KJ886036 | KJ885875 | KJ886197 | MH496295 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora rumicis</i> | CCTU 1123 | <i>Rumex crispus</i> | Iran | KJ886360 | KJ886038 | KJ885877 | KJ886199 | MH496296 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1129; IRAN 2662C | <i>Rumex crispus</i> | Iran | KJ886361 | KJ886039 | KJ885878 | KJ886200 | MH496297 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1121 | <i>Urtica dioica</i> | Iran | KJ886359 | KJ886037 | KJ885876 | KJ886198 | MH496298 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora solani</i> | CCTU 1043; CBS 136038 | <i>Solanum nigrum</i> | Iran | KJ886362 | KJ886041 | KJ885879 | KJ886201 | MH496299 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1050 | <i>Solanum nigrum</i> | Iran | KJ886363 | KJ886041 | KJ885880 | KJ886202 | MH496300 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora sorghicola</i> | CCTU 1173; CBS 136448; IRAN 2672C (TYPE) | <i>Sorghum halepense</i> | Iran | KJ886364 | KJ886042 | KJ885881 | KJ886203 | MH496301 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora</i> sp. G clade 1 | CCTU 1197 | <i>Bidens tripartita</i> | Iran | KJ886379 | KJ886057 | KJ885896 | KJ886218 | MH496302 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1015; CBS 136024; IRAN 2645C | <i>Plantago major</i> | Iran | KJ886367 | KJ886045 | KJ885884 | KJ886206 | MH496303 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CPC 5438 | <i>Salvia viscosa</i> | New Zealand | JX143442 | JX143196 | JX142950 | JX142704 | MH496304 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora</i> sp. G clade 2 | CCTU 1058 | <i>Helminthotheca echioides</i> | Iran | KJ886373 | KJ886051 | KJ885890 | KJ886212 | MH496305 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1090 | <i>Abutilon theophrasti</i> | Iran | KJ886375 | KJ886053 | KJ885892 | KJ886214 | MH496306 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1079; CBS 136025 | <i>Amaranthus retroflexus</i> | Iran | KJ886374 | KJ886052 | KJ885891 | KJ886213 | MH496307 | Bakhshi et al. 2018 |

| | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------------------------------|---|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|
| | CCTU 1054 | <i>Amaranthus</i> sp. | Iran | KJ886372 | KJ886050 | KJ885889 | KJ886211 | MH496308 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1122 | <i>Amaranthus</i> sp. | Iran | KJ886377 | KJ886055 | KJ885894 | KJ886216 | MH496309 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 115518; CPC 5360 | <i>Bidens frondosa</i> | New Zealand | JX143441 | JX143195 | JX142949 | JX142703 | MH496310 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1030; CBS 136026 | <i>Bidens tripartita</i> | Iran | KJ886369 | KJ886047 | KJ885886 | KJ886208 | MH496311 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1002 | <i>Celosia cristata</i> | Iran | KJ886366 | KJ886044 | KJ885883 | KJ886205 | MH496312 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1053; CBS 136027 | <i>Cichorium intybus</i> | Iran | KJ886371 | KJ886049 | KJ885888 | KJ886210 | MH496313 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1144; CBS 136130 | <i>Cucurbita maxima</i> | Iran | KJ886378 | KJ886056 | KJ885895 | KJ886217 | MH496314 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1046 | <i>Plantago major</i> | Iran | KJ886370 | KJ886048 | KJ885887 | KJ886209 | MH496315 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1116 | <i>Plantago major</i> | Iran | KJ886376 | KJ886054 | KJ885893 | KJ886215 | MH496316 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1020; CBS 136023 | <i>Sorghum halepense</i> | Iran | KJ886368 | KJ886046 | KJ885885 | KJ886207 | MH496317 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora</i> sp. T | CCTU 1148; CBS 136125 | <i>Coreopsis</i> sp. | Iran | KJ886380 | KJ886058 | KJ885897 | KJ886219 | MH496318 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora uwebrauniana</i> | CCTU 1200; CBS 138581 (TYPE) | <i>Heliotropium europaeum</i> | Iran | KJ886247 | KJ885925 | KJ885764 | KJ886086 | MH496319 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1134 | <i>Heliotropium europaeum</i> | Iran | KJ886246 | KJ885924 | KJ885763 | KJ886085 | MH496320 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora violae</i> | CCTU 1025; IRAN 2646C | <i>Viola</i> sp. | Iran | KJ886382 | KJ886060 | KJ885899 | KJ886221 | MH496321 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 251.67; CPC 5079 (TYPE) | <i>Viola tricolor</i> | Romania | JX143496 | JX143250 | JX143004 | JX142758 | MH496322 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora zebrina</i> | CCTU 1039 | <i>Alhagi camelorum</i> | Iran | KJ886384 | KJ886062 | KJ885901 | KJ886223 | MH496323 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 108.22; CPC 5091 | <i>Medicago arabica</i> (= <i>M. maculata</i>) | - | JX143503 | JX143257 | JX143011 | JX142765 | MH496324 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1225 | <i>Medicago sativa</i> | Iran | KJ886389 | KJ886067 | KJ885903 | KJ886228 | MH496325 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1180 | <i>Medicago sativa</i> | Iran | KJ886386 | KJ886064 | KJ885903 | KJ886225 | MH496326 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1110; IRAN 2658C | <i>Medicago sativa</i> | Iran | KJ886385 | KJ886063 | KJ885902 | KJ886224 | MH496327 | Bakhshi et al. 2018 |

| | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|-------------------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------------|
| | CCTU 1012; CBS 136129 | <i>Medicago</i> sp. | Iran | KJ886383 | KJ886061 | KJ885900 | KJ886222 | MH496328 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1181 | <i>Trifolium repens</i> | Iran | KJ886387 | KJ886065 | KJ885904 | KJ886226 | MH496329 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 113070; CPC 5367 | <i>Trifolium repens</i> | New Zealand | JX143507 | JX143261 | JX143015 | JX142769 | MH496330 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 118790; IMI 262766; WA 2030; WAC 7973 | <i>Trifolium subterraneum</i> | Australia | JX143510 | JX143264 | JX143018 | JX142772 | MH496331 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CBS 129.39; CPC 5078 | <i>Trifolium subterraneum</i> | U.S.A., Wisconsin | JX143512 | JX143266 | JX143020 | JX142774 | MH496332 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1185 | <i>Vicia</i> sp. | Iran | KJ886388 | KJ886066 | KJ885905 | KJ886227 | MH496333 | Bakhshi et al. 2018 |
| | CCTU 1239; CBS 135977 | <i>Vitis vinifera</i> | Iran | KJ886390 | KJ886068 | KJ885907 | KJ886229 | MH496334 | Bakhshi et al. 2018 |
| <i>Cercospora</i> cf. <i>zinniae</i> | CCTU 1003 | <i>Zinnia elegans</i> | Iran | KJ886391 | KJ886069 | KJ885908 | KJ886230 | MH496335 | Bakhshi et al. 2018 |

ANEXO III

Figura 157. Fotos de síntomas del TH “tipo Septoria”.



