

Trabajo completo

Validación de un método de detección precoz de *Cercospora* en plantas de soja basado en una técnica de PCR

RECIBIDO: 18/08/2015
REVISION: 31/08/2015
ACEPTADO: 16/09/2015

Peretti Canale, M.V. • Mattio, M.C. • Lurá, M.C. •
Latorre Rapela, M.G.

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universidad. Paraje El Pozo s/n.(3000), Santa Fe (Santa Fe- Argentina). Teléfono: +54 342 4575249 (int. 154).
E-mail: latorrerapela@gmail.com

RESUMEN: En fitopatología, la validación de métodos de diagnóstico es limitada y poco actualizada. Es por ello, que el objetivo del presente trabajo fue validar una técnica de PCR para la detección precoz de *Cercospora* en plantas de soja. La técnica consiste en la amplificación de un fragmento de 264 pb del gen *cfp* que codifica para la proteína CFP. Para ello, se procesaron 45 muestras positivas y 44 muestras negativas. Con los resultados obtenidos se determinaron los parámetros de validación teniendo en cuenta una confianza deseada de 95% y un error permitido del 5%. La técnica presentó una sensibilidad diagnóstica de 93,3% y una especificidad diagnóstica de 88,5%. La eficacia fue de 91,0% y los valores predictivos positivos y negativos de 89,4% y 92,9%, respectivamente. Esta técnica validada resulta una

herramienta útil para la detección precoz del hongo en la planta de forma rápida, sensible y específica.

PALABRAS CLAVES: Método de detección, PCR, *Cercospora*, Validación

SUMMARY: *Validation of early detection method of Cercospora in soybean plants based on the PCR technique.*

In plant pathology, validation of diagnostic methods is limited and not up to date. Thus, the aim of this study was to validate a PCR technique for early detection of *Cercospora* in soybean plants. The technique involves the amplification of a 264 bp fragment *cfp* gene encoding the protein CFP. Forty five positive and forty four negative samples were processed. With the results obtained, validation parameters of the technique

were determined taking into account a 95% confidence desired and permissible error of 5%. The technique provided a diagnostic sensitivity of 93.3 % and a diagnostic specificity of 88.5 %. The efficiency was 91.0 % and positive and negative predictive

values of 89.4 % and 92.9 %, respectively. This validated technique is a useful tool for early detection of the fungus in the ground quickly, sensitive and specific.

KEYWORDS: detection method, PCR, *Cercospora*, Validation

Introducción

La soja (*Glycine max L. Merr.*) es una leguminosa conocida desde épocas milenarias por sus beneficios nutritivos y atributos medicinales (1). Actualmente es el principal producto de la agricultura nacional, posicionando al país, a nivel mundial, como el tercer proveedor de la oleaginosa, segundo productor de biodiesel en base a aceite de soja y primer productor de aceite y harinas (2).

Las enfermedades de fin de ciclo (EFC) constituyen uno de los principales factores limitantes de su cultivo ya que provocan madurez anticipada de la planta y reducción del rendimiento y/o calidad de las semillas, generando severos deterioros en las cosechas y pérdidas en la producción. En la actualidad la EFC de mayor prevalencia e incidencia en las principales áreas sojeras del país es el Tizón de la hoja y mancha púrpura de la semilla ocasionada por el hongo *Cercospora kikuchii* (3), cuya patogenicidad se asocia a la producción de la exotoxina *cercosporina*, responsable de muchos de los síntomas de la enfermedad (4-5). Su producción y exportación hacia el exterior del hongo están reguladas por la expresión del gen *cfp* (cercosporin facilitator protein) que codifica la proteína denominada CFP(6-9).

Debido a que este patógeno se encuentra presente en estadios tempranos del cultivo en forma latente y asintomática, resulta indispensable contar con métodos de diagnósticos precoces y certeros. La detección temprana del patógeno en plantas asintomáticas contribuiría a evitar una disminución en el rendimiento del cultivo, el uso desmedido o incorrecto de compuestos químicos, un aumento en los costos de producción y la diseminación a sembradíos sanos (10).

El diagnóstico molecular se impone como una nueva herramienta para la detección directa de patógenos mediante la identificación de una característica única del microorganismo como su material genético o una proteína, a través de técnicas serológicas (ELISA), de hibridación de ácidos nucleicos y de amplificación de ADN (PCR) (11). Entre ellas, la PCR es una de las técnicas moleculares de mayor eficiencia en el diagnóstico de enfermedades vegetales (10), debido no solo a su alta sensibilidad y especificidad sino también a su simplicidad, rapidez, reproducibilidad, fácil automatización y seguridad (12).

Esto constituye una ventaja con respecto a los métodos tradicionales (aislamiento, cultivo del hongo, observación de características macro y microscópicas) que requie-

ren de personal especializado y prolongados períodos de tiempo (semanas) para su desarrollo (13); además, presentan limitaciones en caso de plantas asintomáticas o con poca carga microbiana, resultando poco útiles a la hora de establecer un diagnóstico en etapas tempranas de infección y retardando, por lo tanto, la toma de decisiones ante un resultado positivo.

Teniendo presente estos aspectos, Latorre Rapela (13) desarrolló y optimizó un método de detección precoz para el género *Cercospora* basado en la técnica de PCR, que consiste en amplificar un fragmento del gen *cfp* de 264 pb.

Ahora bien, para una correcta aplicación de una técnica de diagnóstico/detección debe efectuarse su validación diagnóstica, para lo cual es necesario aplicar dicha metodología a un número considerable de muestras de plantas de soja enfermas y sanas, según el intervalo de confianza deseado y el error estimado, con el fin de garantizar los resultados obtenidos. Entre los principales indicadores estadísticos se debe determinar la sensibilidad y especificidad, eficacia y valores predictivos positivos y negativos para el método en cuestión (14).

El objetivo del presente trabajo fue validar un método de detección precoz del hongo *Cercospora* en plantas de soja, basado en la técnica de PCR desarrollada previamente en el laboratorio.

Materiales y métodos

Se trabajó con 45 muestras positivas [hojas de plantas infectadas experimentalmente con *Cercospora kikuchii* NBRC 6711, perteneciente a la colección japonesa NITE Biological Resource Center (NBRC)] y 44 muestras negativas (hojas de plantas sanas), acorde a lo establecido para una

Sensibilidad diagnóstica (DSe) y Especificidad diagnóstica (DSp) estimada del 97% con una confianza deseada del 95% y un error permitido del 5% (15).

Las muestras se obtuvieron a partir de plantas de soja cultivadas e inoculadas bajo condiciones de crecimiento controladas en incubadora modelo I-501PF (INGELAB, Argentina) en el laboratorio de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la UNL.

El cultivo de las plantas se llevó a cabo utilizando semillas RAS16 grupo de madurez 5 que no presentaban a simple vista daño mecánico por almacenamiento o enfermedad. Previo a la siembra se realizó el pre-germinado de las semillas, para lo cual se colocaron en bandejas plásticas previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5%, conteniendo papel de filtro embebido en agua sobre una capa de algodón para mantener las condiciones de humedad apropiadas. A continuación, se incubaron bajo condiciones de oscuridad continua a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 96 h, en incubadora modelo I-501PF (INGELAB, Argentina). Luego, las semillas pre-germinadas se dispusieron en macetas plásticas de 300 ml, conteniendo tierra-arena-vermiculita en proporción 2:1:1, a 1,5 cm de la superficie. Las plantas continuaron su desarrollo en la incubadora, bajo condiciones alternadas de luz (16 h luz/ 8 h oscuridad) a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Durante su crecimiento fueron fertilizadas con solución de Hoagland (16) o solución nutritiva de Jensen (17).

Una vez que las plantas alcanzaron el estado fenológico V3 se inocularon con una suspensión del hongo *C. kikuchii* NBRC 6711.

Para la preparación del inóculo, el hongo se sembró en 5 tubos conteniendo APD (agar papa dextrosa) y se incubó durante 4 días a $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$, bajo ciclos alternados de luz (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Transcurrido dicho tiempo, se agregaron 5 ml de agua destilada estéril a cada tubo y se procedió a desprender las estructuras fúngicas, mediante un raspado suave, con el ansa, de la superficie del cultivo. La suspensión se cuantificó mediante un recuento en placa en superficie y la concentración del inóculo se ajustó en 10^4 UFC/ml.

Para la inoculación se seleccionaron las hojas trifoliadas correspondientes al primer y segundo par de hojas completamente desplegadas. Se asperjaron con un volumen de 2,5 ml del inóculo por planta, humedeciendo ambas caras de las hojas. Luego, se cubrieron por 24 h con bolsas plásticas transparentes y perforadas, previamente humedecidas en su interior, para proveer las condiciones de humedad y mojado foliar adecuadas para estimular el proceso de infección (18).

Una vez inoculadas, las plantas se colocaron nuevamente en la incubadora manteniendo las condiciones de temperatura y ciclos de luz/oscuridad empleados para su crecimiento.

Transcurridas 24 h, se recolectaron las hojas trifoliadas y se lavaron 3 veces con agua estéril para eliminar restos de inóculo adheridos a la superficie foliar. Se observaron a simple vista en busca de lesiones macroscópicas y con lupa estereoscópica (BOECO Germany, BTB 3-C) en busca de lesiones no visibles a simple vista. Se cortaron con un bisturí las zonas de tejido lesionado y posteriormente los trozos de tejido se pulverizaron con nitrógeno líquido empleando un mortero. El tiempo de mues-

treo de 24 h se seleccionó según el modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de *Cercospora* descrito por Latorre Rapela y col. (19).

La extracción del ADN total fue realizada a partir de micelio fúngico y tejido vegetal según el protocolo de Lee y Taylor (1992) (20), modificado por Di Conza y col. (2007) (21). La calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis sumergida en gel de agarosa (22) al 0,8% en buffer TBE 0,5X y con *Gel-Red™NucleicAcid* (Biotium) como colorante de ADN. Las muestras sembradas se corrieron durante 1 h a un voltaje constante de 100 V. Para la visualización del gel, se empleó el equipo *Gel Doc XR System* (BIO-RAD-LifeScienceCat # 170-8170) y el software *QuantityOne*.

Para el desarrollo de la técnica de PCR, se utilizó una mezcla de reacción, con un volumen final de 25 μl , conteniendo 2,5 μl de buffer de reacción 10X (InbioHighway, Argentina), 1,25 μl de MgCl_2 25 mM (InbioHighway, Argentina), 2 μl de mezcla de dNTPs 10 mM (InbioHighway, Argentina), 2,5 μl del oligonucleótido CFP1 10 μM (Genbiotech SRL, Argentina), 2,5 μl del oligonucleótido CFP2 10 μM (Genbiotech SRL, Argentina), 0,25 μl de *Taq* polimerasa 500 U (InbioHighway, Argentina), 13 μl de agua milliq y finalmente 1 μl de ADN dil 1/10.

Como control positivo se utilizó el ADN de *C. kikuchii* NBRC 6711 y como control negativo agua milliq.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador IVEMA T18 (Argentina), bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización de 3 min a 95°C ; seguido de 35 ciclos comprendiendo 1 min a 95°C , 1 min a 58°C y 1 min a 72°C . La extensión final fue de 5 min a 72°C .

La evaluación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis sumergida horizontal en gel de agarosa al 1,5% en buffer TBE 0,5X (22), empleando como colorante de ADN *GelRed™ NucleicAcid*. Las muestras sembradas se corrieron durante 1h a un voltaje constante de 100 V. Se empleó el marcador de peso molecular

100-1000pb (InbioHighway, Argentina). Para la visualización del patrón de bandas obtenido se empleó el equipo *Gel Doc XR System* (BIORAD-LifeScienceCat # 170-8170) y el software *QuantityOne*.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la una tabla de contingencia (Tabla 1) (23).

Tabla 1. Contingencia de las variables enfermedad y técnica de detección/diagnóstico.

Enfermedad o presencia de síntomas típicos				
		Presencia Ausencia		
Técnica de detección /diagnóstico	Positivo	VP	FP	VP + FP
	Negativo	FN	VN	FN + VN
	Total	VP + FN	FP + VN	N

VP: verdaderos positivos identificados por la técnica; FP: falsos positivos identificados por la técnica; FN: falsos negativos identificados por la técnica; VN: verdaderos negativos identificados por la técnica; VP+FN: enfermos; VP+FP: total de resultados positivos; FP+VN: sanos; FN+VN: total de resultados negativos; N: tamaño de la muestra.

Se consideró positivo todo resultado en el que se observó un producto de PCR cuyo peso molecular se correspondía con el fragmento del gen *cfp* esperado, y negativo a todo resultado en el que no se observó amplificación para el mismo (24).

Los parámetros de validación evaluados se listan a continuación:

- a) Sensibilidad diagnóstica (DSe)=VP/(VP+FN)
- b) Especificidad diagnóstica (DSp)=VN/(VN+FP)
- c) Eficacia (E)=VP+VN/VP+VN+FP+FN
- d) Valor predictivo positivo (VPP)=VP/(VP+FP)
- e) Valor predictivo negativo (VPN)=VN/(VN+FN)

Donde VP corresponde a los verdaderos positivos, VN a los verdaderos negativos, FP a los falsos positivos y FN a los falsos negativos.

Se calcularon los intervalos de confianza para la DSe y DSp empleando las ecuaciones 1 y 2 y considerando una confianza del 95%:

Ecuación 1:

$$IC_{95\%}(DSe) = DSe \pm 1,96 \sqrt{\frac{DSe(1 - DSe)}{VP + FN}}$$

Ecuación 2:

$$IC_{95\%}(DSp) = DSp \pm 1,96 \sqrt{\frac{DSp(1 - DSp)}{FP + VN}}$$

Resultados y discusión

Como se mencionó con anterioridad, *Cercospora kikuchii* es un fitopatógeno que se encuentra en los cultivos de soja en forma asintomática desde etapas tempranas, apareciendo las lesiones características en estadios avanzados del cultivo. Por lo tanto, un diagnóstico oportuno que detecte el agente causal de manera precoz es fundamental para el manejo del problema, ya que contribuye a generar medidas de control efectivas, optimizar los recursos, reducir los efectos negativos sobre el medio ambiente y a la vez originar información respecto a la interacción patógeno hospedante (25-26).

La detección de los hongos responsables de las enfermedades de fin de ciclo en la soja, tales como los del género *Cercospora*, en la actualidad se lleva a cabo de manera tradicional, originando pérdidas considerables ya que los mismos son detectados tardíamente.

Es por ello, que el desarrollo de una técnica de PCR constituye una herramienta prometedora en este aspecto y, en la actualidad, está siendo ampliamente utilizada tanto para el diagnóstico de enfermedades

vegetales, en la detección de patógenos en semillas, y cultivo de tejidos, como así también en la detección de toxinas y residuos de pesticidas (26).

Por otro lado, la validación es un proceso que determina la idoneidad de una prueba desarrollada, optimizada y estandarizada adecuadamente para un fin concreto. En este proceso es importante determinar las características del método que se quiere validar para poder definir el tipo de validación a llevar a cabo (27).

En este trabajo, se llevó a cabo la validación primaria de un método cualitativo de detección de *Cercospora* en plantas de soja, utilizando el modelo propuesto por Latorre Rapela y col. (19). De la misma manera que lo reportado por los investigadores, las hojas inoculadas con *Cercospora kikuchii* NBRC 6711 luego de 24h post inoculación no presentaron la lesión macroscópica típica de este fitopatógeno. Sin embargo, al observarlas bajo lupa este-reoscópica, se pudo visualizar una pequeña lesión sobre la misma (19). En la Fig. 1 se observan hojas de plantas de soja sanas e infectadas con *C. kikuchii* NBRC 6711 empleadas para la validación de la técnica.

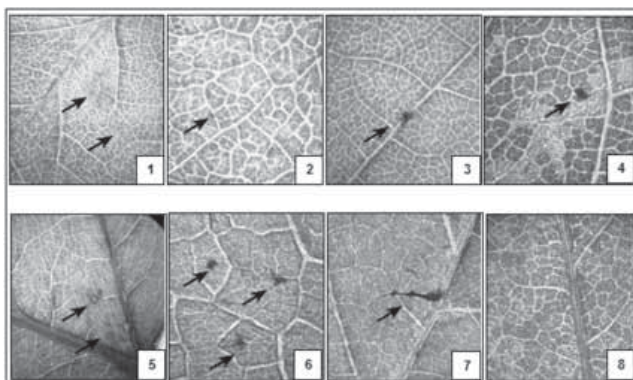


Fig.1. Observación del tejido foliar de las plantas de soja sanas y enfermas. (1-7) Plantas de soja recolectadas a las 24 h post-inoculación con el hongo *C. kikuchii* NBRC 6711 y (8) sana. Las fechas indican las lesiones producidas por el hongo.-

En la Fig. 2 se muestra el fragmento de 264 bp amplificado por PCR, en casi todas las plantas inoculadas con *C. kikuchii* NBRC 6711, excepto en la muestra 8 que se consideró como un falso negativo.

El fragmento amplificado corresponde al gen *cfp*, que se encuentra presente tanto en *C. kikuchii* como en *C. sojina* (datos no mos-

trados), ambos patógenos de soja. Chanda y col., en un trabajo publicado durante 2014, amplificaron, mediante qPCR, una región que pertenece al gen *CTB6*, que es específico de *C. kikuchii* y no de *C. sojina* (28).

En las plantas de soja sin inocular (sanas), no se detectó el gen *cfp* (Fig. 3).

Fig. 2. Ensayo de PCR para la detección del gen *cfp* en plantas de soja infectadas. Calle 1: marcador 100-1000bp *DNA Ladder* (InbioHighway, Argentina); Calle 2: blanco de reactivos (agua milliq); Calles 3-19: ADN plantas inoculadas con *C. kikuchii* NBRC 6711; Calle 20: ADN de *C. kikuchii* NBRC 6711 (control positivo).



Fig.3. Ensayo de PCR para la detección del gen *cfp* en plantas de soja sanas. Calle 1: Marcador de PM 100-1000bp *DNA Ladder* (InbioHighway, Argentina); Calle 2: blanco de reactivos (agua milliq); Calles 2-7 y 9-14: ADN plantas sanas; Calles 8 y 15: ADN de *C. kikuchii* NBRC 6711 (Control positivo).



Los resultados de la evaluación de las muestras positivas (n=45) y negativas (n=44) se detallan en la Tabla 2. Con dichos

Tabla 2. Tabla de contingencia

Enfermedad o presencia de síntomas típicos				
Presencia Ausencia				
PCR	Positivo	42	5	47
	Negativo	3	39	42
	Total	45	44	89

La presencia de falsos positivos podría estar relacionada a errores en la manipulación o ejecución de la técnica de PCR (agua y solución de extracción), o con señales de amplificación ocasionada por contaminaciones exógenas.

Las estimaciones de la DSe (proporción de plantas que se sabe que están infectadas y que dan positivo en una prueba) y de la DSp (proporción de plantas que se sabe que no están infectadas y que dan negativo en una prueba) son los indicadores principales del rendimiento establecido durante la validación de una prueba (29). La técnica de PCR empleada, presentó una DSe de 93,3% ($IC_{95\%}=86,1-100$) y una DSp de 88,6% ($IC_{95\%}=79,3-98$), valores inferiores al 97% estimado. Sin embargo, dichos valores están comprendidos dentro del intervalo de confianza seleccionado para la validación de la técnica.

Estas estimaciones son la base del cálculo de otros parámetros, como los valores predictivos de los resultados positivos (VPP) y negativos de la prueba (VPN), a partir de los cuales se realizan inferencias sobre los resultados de la misma (29). La técnica vali-

resultados se calcularon los parámetros de validación anteriormente mencionados que se expresan en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de la calidad de la detección o del diagnóstico que ofrece la técnica

Parámetros de validación	
Sensibilidad diagnóstica (DSe)	93,3%
Especificidad diagnóstica (DSp)	88,6%
Eficacia (E)	91,0%
Valor predictivo positivo (VPP)	89,4%
Valor predictivo negativo (VPN)	92,9%

dada presentó un VPP de 89,4% y un VPN de 92,9%, valores que indican que la probabilidad de que la planta esté realmente infectada (VPP) o sana (VPN) es muy alta.

La eficacia de la prueba fue del 91,0%, lo que revela que la probabilidad de que una planta sea detectada/diagnosticada correctamente por la prueba es también elevada (30).

Conclusiones

Los resultados alcanzados en el presente trabajo son los primeros de su tipo en Argentina para el diagnóstico de esta importante enfermedad de fin de ciclo de la soja, y brindan la posibilidad de contar con una valiosa herramienta para el perfeccionamiento de los procedimientos fitosanitarios actuales. No sólo brindan datos concretos sobre el comportamiento del método desarrollado para la detección específica de *Cercospora*, sino que además aportan elementos metodológicos que pueden ser empleados para otros trabajos de validación.

Finalmente, se concluye que el método de PCR validado provee una metodología rápida, precisa y segura para la detección de *Cercospora* en plantas de soja ya que ofrece

resultados positivos y negativos que permiten confirmar o descartar la presencia del patógeno *Cercospora* con un elevado nivel de confianza en etapas tempranas de infección.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco del Proyecto CAID 2011, financiado por Universidad Nacional del Litoral, Argentina y del Proyecto Federal de Innovación Productiva PFIP 2009-1 evaluado/financiado por COFECYT.

Se agradece a la Dra. Roxana Maumary por la desinteresada provisión de las semillas utilizadas.

Nota

1. Los resultados del presente trabajo fueron presentados en las XVI Jornadas Argentinas de Microbiología y III Congreso Bioquímico del Litoral, llevados a cabo en Santa Fe (Santa Fe, Argentina) desde el 5 al 7 de Agosto de 2015.

Referencias bibliográficas

1. Herrera Castillón, E. y Jiménez Fernández, R. 2007. "Componentes de la soja de interés en alimentación, nutrición y salud humana". En: La salud y la soja. EDIMSA. (Madrid, España). 61-92.
2. Calzada, J. 2014. *Argentina y su posicionamiento en el mercado mundial de granos, aceites y subproductos*. Bolsa de Comercio de Rosario. Rosario (Santa Fe), Argentina.
3. Distefano, S.G.; Gadban, L.C. y Lenzi, L.G. 2014. *Panorama fitopatológico del cultivo de soja. campaña 2013/14. Panorama fitopatológico del cultivo de soja*. Disponible en: http://m.agrositio.com/vertext.php?id=159081&area_id=2.
4. Kuyama, S. y Tamura, T. 1957. *Cercosporin. A pigment of Cercospora kikuchii* Matsumoto et

Tomoyasu. I. Cultivation of Fungus, Isolation and Purification of Pigment. J. Am. Chem. Soc. **79**, 21: 5725-5726.

5. Assante, G.; Locci, R.; Camarda, L.; Merlini, L. y Nasini, G. 1977. *Screening of the genus Cercospora for secondary metabolites*. Phytochem. **16**, 2: 243-247.

6. Upchurch, R.G.; Rose, M.S.; Eweida, M. y Callahan, T.M. 2002. *Transgenic assessment of CFP-mediated cercosporin export and resistance in a cercosporin-sensitive fungus*. Curr. Genet. **41**, 1: 25-30.

7. Kuykendall, L.D. y Upchurch, R.G. 2004. *Expression in sugar beet of the introduced cercosporin toxin export (CFP) gene from Cercospora kikuchii, the causative organism of purple seed stain in soybean*. Biotechnol. Lett. **26**, 9: 723-727.

8. Ehrenshaft, M. y Upchurch, R.G. 1991. *Isolation of Light-Enhanced cDNAs of Cercospora kikuchii*. Appl. Environ. Microbiol. **57**, 9: 2671-2676.

9. Callahan, T.M.; Rose, M.S.; Meade, M.J.; Ehrenshaft, M. y Upchurch, R.G. 1999. *CFP, the putative cercosporin transporter of Cercospora kikuchii, is required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean*. Mol. Plant Microbe Interact. **12**, 10: 901-910.

10. Macías Figueroa, O.L.; Delgado Calvo, Y.; Marrero, E.P.; Betancourt, R.L. y Barreto, R.E. 2006. *Técnicas para el diagnóstico y determinación de la variabilidad genética de fitopatógenos*. Biblioteca Virtual de las Ciencias en Cuba. La Habana (Cuba).

11. OIE. 2006. "Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas". En: Manual Acuático. OIE. (Francia). 25-32.

12. Filippone, M.P.; Perera, M.F.; Salgado, M.; García, M.G.; Vellicce, R. y Castagnaro, A.P. 2010. *Diagnóstico molecular de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en la Argentina: ajuste metodológico y aplicaciones*. Rev. Ind y Agric. de

Tucumán. 87, 2: 01-11.

13. Latorre Rapela, M.G. 2013. *Diversidad mofo-genética de Cercospora en soja. Detección precoz de la infección por C. kikuchii*. Tesis Doctoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
14. Iglesia, A.; Díaz, A. y Peralta, E.L. 2002. *Validación de métodos inmunoquímicos para el diagnóstico de Leifsonia xyli subsp. xyli, agente causal del raquitismo de los retoños de la caña de azúcar*. Rev. Protección Veg. 17, 1: 20-24.
15. Jacobson, R.H. 1998. *Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases*. Rev Sci Tech. 17, 2: 469-526.
16. Arnon, D.I. y Hoagland, D.R. 1940. *Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of nutrients*. Soil Sci. 50, 463-483.
17. Jensen, M.H. y Collins, W.L. 1985. "Hydroponic Vegetable Production". En: Horticultural Reviews. John Wiley & Sons Inc. 483-558.
18. Layrisse, D.A. y Borges, F.O. 1984. *Evaluación de la resistencia de Cercospora arachidicola Hori en cultivares de maní en condiciones de campo e invernadero*. Rev. Fac. Agron. (Maracay). 13, 143-149.
19. Latorre Rapela, M.G.; Maumary, R.; Marcipar, I. y Lurá, M.C. 2013. *Modelo experimental de infección de plantas de soja por especies de Cercospora*. Revista FABICIB. 17, 66-73.
20. Lee, S.B. y Taylor, J.W. 1992. *Phylogeny of five fungus-like protist-like Phytophthora species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA*. Mol. Biol. Evol. 9, 4: 636-653.
21. Di Conza, J.A.; Nepote, A.F.; Gonzalez, A.M. y Lura, M.C. 2007. *(GTG)5 microsatellite regions in citrinin-producing Penicillium*. Rev. Iberoam. Micol. 24, 1: 34-37.
22. Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Laboratory Press. (New York, USA).
23. Olmos Castelló, A.; Bertolini, E. y Cambra Álvarez, M. 2008. *Validación de métodos de detección y diagnóstico de patógenos y costes de la especificidad y sensibilidad*. Boletín Informativo de la Sociedad Española de Fitopatología. 63, 7-11.
24. Leotta, G.A.; Chinen, I.; Epszteyn, S.; Miliwbsky, E.; Melamed, I.C.; Motter, M.; Ferrer, M.; Marey, E. y Rivas, M. 2005. *Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de Escherichia coli productor de toxina Shiga*. Rev. Argent. Microbiol. 37, 1-10.
25. Vázquez Moreno, L.L. 2003. *Manejo integrado de plagas. Preguntas y Respuestas para extensionistas y agricultores*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Ministerio de la Agricultura. (Habana, Cuba).
26. Flores-Olivas, A.; Martínez-Soriano, J.P. y Martínez-Espinoza, A.D. 1997. *Nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos*. Fitopatol. 32, 2: 24-43.
27. Cercenado, E. y Cantón, R. 2013. *Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos*. En: Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
28. Chanda, A.K.; Ward, N.A.; Robertson, C.L.; Chen, Z.Y. y Schneider, R.W. 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, 10: 1118-1124.
29. OIE. 2006. *Principios de validación de las pruebas de diagnóstico para las enfermedades infecciosas*. En: Manual acuático OIE. (Francia). 11-24.
30. Ruiz de Adana Pérez, R. 2009. *Eficacia de una prueba diagnóstica: parámetros utilizados en el estudio de un test*. JANO. 1736, 30-32.