

# DETECCIÓN DE *Phomopsis sojae* DURANTE EL CULTIVO DE SOJA

## Técnica de Campo

### INTRODUCCION

Desde comienzos de la década de 1970 la superficie sembrada con soja (*Glycine max* (L.) Merr.) ha crecido en forma sostenida en Argentina. Mientras en la primera campaña de esa década se sembraron 37.700 has, 25 años después, a mediados de la década de 1990 se sembraron más de 6.000.000 has, y en la campaña 2003/04 más de 13.000.000 has (SAGPyA de la Nación, 2003). El aumento del área sembrada, la producción y los rendimientos, han sido acompañados por el mejoramiento de las técnicas culturales y la introducción de nuevas variedades.

La superficie sojera se distribuye en una amplia zona ecológica que va aproximadamente desde los 23° a los 39° de latitud sur, concentrándose principalmente en la región pampeana, con cerca del 94% de la superficie sembrada y el 85% de la producción total del país (Giorda, 1997).

Las enfermedades constituyen una de las principales limitantes de esta oleaginosa, afectando tanto el rendimiento como la calidad de las semillas. A nivel mundial se calcula que las pérdidas atribuibles a enfermedades oscilan entre 10 y 15% (Giorda, 1997). En la campaña 1997/98 en Argentina las enfermedades causaron pérdidas estimadas en aproximadamente el 7,5% de la producción, correspondiendo el 84% a hongos, entre los cuales se destaca el tizón de la vaina y tallo (Wrather *et al.*, 2001).

Esta enfermedad fue observada por primera vez en EE.UU. en 1920 y desde entonces ha sido reportada en todas las áreas productoras de soja, siendo actualmente considerada endémica en esas áreas (Sinclair y Backman, 1989; Wrather *et al.*, 1996). Los hongos causantes son *Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell.) Sacc. *f. sp. sojae* y *Phomopsis sojae* Lehman, formas teleomórficas y anamórficas respectivamente (Hobbs *et al.*, 1985).

El primer síntoma que se observa a campo es la podredumbre de la semilla contaminada o infectada por el/los hongos causales (Figura 1). También puede ocurrir damping-off de pre y postemergencia debido al inóculo presente en la semilla (Figura 2) y en el rastrojo (Sinclair y Backman, 1989).

Generalmente las plantas infectadas no muestran síntomas visibles durante todo el ciclo de crecimiento del cultivo; sin embargo, ante determinadas situaciones de alguno de los integrantes del triángulo de enfermedad (ambiente, hospedante o patógeno), estas infecciones latentes se ponen de manifiesto a través de síntomas y/o signos (Sinclair y Cerkauskas, 1997).

Si bien en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad pueden aparecer síntomas tempranos, como muerte de ramificaciones, caída de hojas y vainas poco desarrolladas (Athow, 1987); frecuentemente los síntomas no se observan hasta el comienzo de la senescencia de las plantas infectadas (McGee, 1983). Cuando el cultivo alcanza esta etapa y si hay condiciones de elevada humedad ambiental, se observan las fructificaciones asexuales del hongo (picnidios) dispuestas sobre los tallos a la altura de los nudos y formando hileras (Figura 3). Los picnidios también pueden aparecer sobre las vainas, pero dispersos y en menor cantidad. Estas estructuras de fructificación son las que permiten identificar y señalar la presencia de la enfermedad. Esta particularidad según la cual las infecciones endofíticas recién se ponen de manifiesto a la madurez fisiológica del cultivo, dificulta el manejo de la enfermedad (TeKrony *et al.*, 1984 a).



**Figura 1. Semilla con signo de la enfermedad.**



**Figura 2. Semillas infectadas.**



**Figura 3. Picnidios de *Phomopsis sojae* sobre tallos y vainas.**

Numerosas especies de hongos patógenos incluyendo *P. sojae*, han sido citadas en soja como causantes de infecciones endofíticas (Kmetz *et al.*, 1979; McGee, 1983; Rupe y Ferris, 1987; Sinclair y Cerkauskas, 1997). En Argentina se han identificado en laboratorio varias especies causando infecciones endofíticas en folíolos en estadíos fenológicos reproductivos de la soja, incluyendo *P. sojae* con una frecuencia inferior al 6% (Larran *et al.*, 2002).

La semilla contaminada es la fuente primaria de inóculo para la diseminación de la enfermedad a largas distancias y nuevas áreas de cultivo, mientras que los restos infectados de plantas de soja constituyen la fuente local de inóculo (Ellis *et al.*, 1974 *a*; Garzonio y McGee, 1983; Milos, 2004).

Temperaturas superiores a 20°C y tiempo con alta humedad relativa, principalmente entre madurez fisiológica y madurez de cosecha (R7 a R8) favorecen la infección de las semillas a partir de las paredes de las vainas (Ploper *et al.*, 1992). Las semillas se presentan arrugadas y con rajaduras y pueden presentar una coloración blanquecina.

La infección de plantas, de vainas y de semillas de soja por estos hongos, puede evitarse a través del uso de fungicidas aplicados al follaje (Ellis *et al.*, 1974 *b*; Prasartsee *et al.*, 1975; Ross, 1975). Sin embargo, para que los tratamientos sean eficientes deben ser realizados antes de la aparición de los síntomas (TeKrony *et al.*, 1984 *a*).

Considerando lo expresado anteriormente, poder diagnosticar infecciones endofíticas antes que los síntomas de la enfermedad sean visibles, permitiría determinar el momento preciso para realizar los tratamientos fungicidas. A este respecto, es interesante señalar que varios herbicidas han demostrado ser una valiosa herramienta para evaluar infecciones endofíticas por *P. sojae* (Cerkauskas y Sinclair, 1980; Cerkauskas *et al.*, 1983), por lo que su aplicación en estadíos fenológicos tempranos de la soja puede constituir una técnica práctica para determinar a campo el momento o la necesidad de realización de los tratamientos fungicidas.

Uno de los herbicidas usados para detectar infecciones endofíticas por hongos es el paraquat (1,1'-dimethyl- 4,4' bipyridinium dichloride) (p.a. 27,6%); el cual es utilizado en precosecha en muchos cultivos como desecante y defoliante. Este herbicida actúa sobre los tejidos verdes provocando el colapso de la estructura celular y además, incrementa la tasa de pérdida de humedad de las semillas, permitiendo de esta forma una cosecha anticipada (Casefe, 1997).

Considerando lo anterior se planteó como hipótesis que:

**“Es posible determinar a campo infecciones endofíticas de *Phomopsis sojae* en soja en estadíos fenológicos en que los síntomas no son visibles y el signo está ausente”**,

por lo que en este trabajo se planteó como objetivo **“detectar a campo plantas de soja infectadas por *P. sojae* mediante la aplicación de paraquat como desecante en distintos estadíos fenológicos”**.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para el logro del objetivo planteado se sembró un ensayo en el Campo Experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto, ubicado sobre la Ruta Nacional N° 36, Km. 601, Las Higueras, Córdoba (33° 07' Latitud Sur, 64° 14' Longitud Oeste y a 421 msnm). El suelo del campo es Hapludol típico, franco arenoso muy fino.

La siembra del ensayo se realizó el 5 de diciembre del 2002 en una macroparcela en que no se había sembrado soja en los dos ciclos anteriores. Se utilizó semilla de soja del cultivar Don Mario 4800 de tres orígenes: a) semilla certificada de primera multiplicación, b) semilla de productor 1, y c) semilla de productor 2; sembrándose cada una de ellas en parcelas de 10 surcos de ancho por 40 m de longitud.

En cada parcela se efectuaron cuatro tratamientos de secado de las plantas en diferentes estadíos fenológicos (2° nudo-V2, 5° nudo-V5, plena floración-R2 e inicio de llenado de granos-R5), considerando además como quinto tratamiento el secado producido por senescencia natural (R7) (madurez fisiológica) El secado artificial se realizó mediante el uso de paraquat (1,1'-dimethyl- 4,4' bipyridinium dichloride) (p.a. 27,6%) a una dosis de 2,5% v/v.

El diseño estadístico utilizado fue en bloques al azar con 5 repeticiones. Cada una de ellas estuvo distribuida al azar y comprendió 1 m sobre el surco, en el que se recolectaron en promedio 30 plantas. Efectuada la aplicación del desecante se realizó el monitoreo periódico de las plantas tratadas para detectar infecciones endofíticas por *P. sojae* a través de la aparición del signo de la enfermedad (picnidios). En todas las plantas muestreadas se confirmó el diagnóstico

en laboratorio a través de la observación bajo lupa y microscopio de los picnidios y conidios del patógeno.

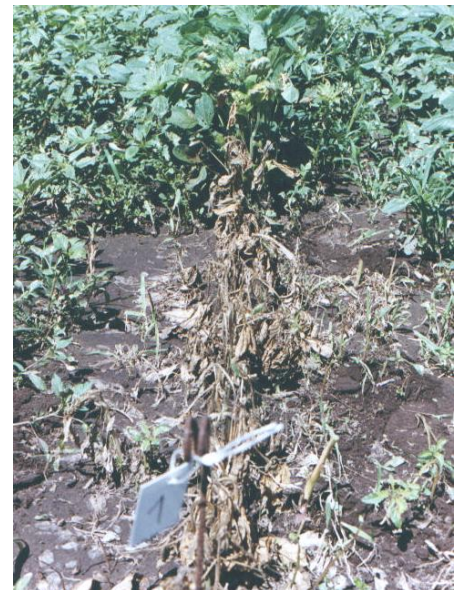
Los datos generados fueron sometidos a ANOVA y la correspondiente separación de medias se llevó a cabo mediante Diferencia Significativa Mínima y test de Duncan usando SAS.



**Figura 4. Imagen del ensayo.**



**Figura 5. Tratamiento de secado en al estadio V2.**



**Figura 6. Tratamiento de secado en al estadio V5.**

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se lograron detectar a campo plantas de soja infectadas endofíticamente con *P. sojae* mediante la aplicación de paraquat en distintos estadios fenológicos del cultivo. Además de esta especie se observaron esporas de los géneros *Alternaria* y *Colletotrichum*. El paraquat ha sido señalado por inducir la formación de lesiones y estructuras de fructificación de varios hongos patógenos en soja (Cerkaskas y Sinclair, 1980; Sinclair y Cerkaskas, 1997).

Cuando se pulverizó con paraquat para producir el secado de las plantas en los estadios fenológicos V2, V5 y R2, e inducir la aparición del signo del patógeno, los picnidios se observaron formando hileras en pequeños grupos sobre los tallos, generalmente próximos a los nudos. Por su parte en R7, en que las plantas tuvieron senescencia natural, los picnidios también formaron hileras sobre los tallos, pero en menor número.

En todos los casos la observación de los picnidios a campo se corroboró bajo lupa en el laboratorio. Además, al microscopio se detectó la presencia de conidios tipo  $\alpha$  (alfa) y  $\beta$  (beta) en los picnidios. Los primeros se observaron en todos los preparados, a diferencia de los conidios tipo  $\beta$  que se observaron sólo en algunos.

Cuando se aplicó paraquat en R5 (23 de febrero) no se produjo el desecado de las plantas de soja. Esto podría deberse a la baja humedad relativa registrada como consecuencia de las escasas lluvias anteriores y posteriores al tratamiento y a la elevada temperatura (Cuadro 1), que habrían conformado una situación ambiental desfavorable a la acción herbicida (Calderbank *et al.*, 1978).

**Cuadro 1. Temperatura media y precipitaciones diarias entre el 20 de Febrero y el 10 de Marzo del 2003 \*.**

Fecha	Temperatura media (°C)	Precipitaciones (mm)
20 de febrero	15.2	0.0
21 de febrero	18.0	0.0
22 de febrero	19.6	0.0
23 de febrero**	19.9	0.0
24 de febrero	22.8	0.0
25 de febrero	23.7	0.0
26 de febrero	29.5	0.0
27 de febrero	22.7	0.0
28 de febrero	20.2	4.2
01 de marzo	22.8	0.0
02 de marzo	23.7	0.0
03 de marzo	24.5	0.0
04 de marzo	23.9	0.0
05 de marzo	21.9	1.2
06 de marzo	23.1	0.0
07 de marzo	24.2	0.0
08 de marzo	24.2	0.0
09 de marzo	21.8	12.2
10 de marzo	22.3	8.4

\* Información proporcionada por la Cátedra de Climatología Agrícola de la UNRC.

\*\* Tratamiento con paraquat en soja en estadio R5.

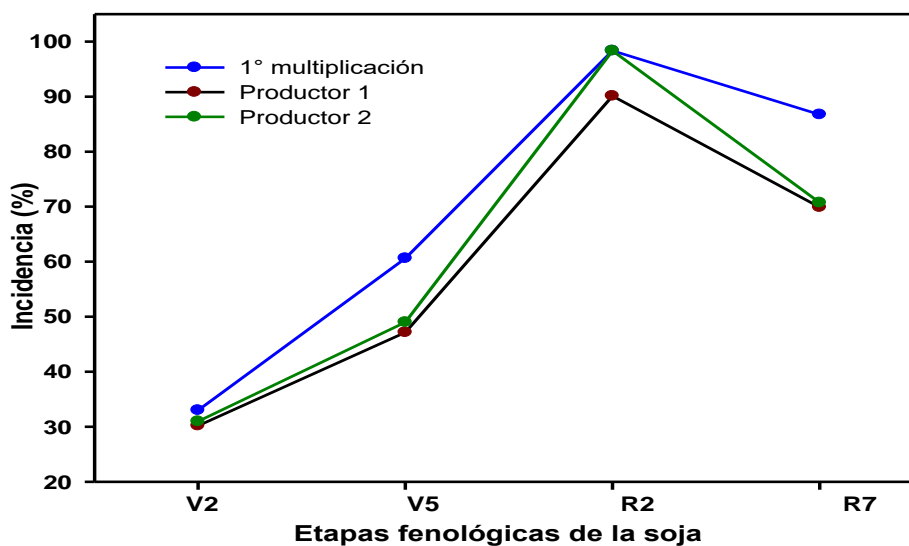
Según se observa en el cuadro 2 y figura 7, cuando las plantas de soja se encontraban en el estadio vegetativo de 2° nudo (V2) el porcentaje medio de incidencia del tizón de tallo y vainas fue del 31.38% como promedio de los tres orígenes de la semilla, no comprobándose diferencias significativas entre ellos. Si bien en los estadios fenológicos de 5° nudo (V5) y plena floración (R2) se registraron incrementos en la incidencia del tizón, los valores de enfermedad tampoco tuvieron diferencias significativas entre los orígenes de la semilla, siendo el promedio de 52.25% y 95.69% respectivamente. A madurez fisiológica (R7) los valores de intensidad de enfermedad disminuyeron respecto a R2, pero fueron mayores que en los estadios vegetativos en los tres orígenes de la semilla, no comprobándose diferencias significativas entre ellos.

No obstante no comprobarse diferencias significativas entre los tres orígenes de las semillas para la intensidad del tizón en los cuatro estadios fenológicos, si se comprobaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores promedio correspondientes a cada estadio fenológico (Cuadro 2).



**Cuadro 2. Incidencia del tizón de vainas y tallos de la soja (*Phomopsis sojae*) según tres orígenes de la semilla en cuatro estadios fenológicos del cultivo. Comparación de medias-DSM y test de Duncan.**

Origen semilla / Estadio Fenológico	1° Multiplicación	Productor 1	Productor 2	Estadio Fenológico
V2	32.98 a	30.18 a	30.98 a	31.38 1
V5	60.60 a	47.14 a	49.00 a	52.25 2
R2	98.34 a	90.12 a	98.34 a	95.60 3
R7	86.74 a	69.90 a	70.72 a	75.79 4



**Figura 7. Incidencia del tizón de vainas y tallos de la soja (*Phomopsis sojae*) según tres orígenes de la semilla en cuatro estadios fenológicos del cultivo.**

Los valores similares de intensidad de enfermedad en el estadio fenológico V2 (aprox. 30%), estarían señalando una infección similar en la semilla de las tres procedencias (fuente primaria de inóculo). La semilla es un vehículo de introducción de *P. sojae* en lotes en monocultivo, en rotación anual, o incluso en lotes donde nunca se sembró soja (Cerkauskas *et.*



*al.*, 1983; Ellis *et al.*, 1974 *a*; Garzonio y McGee, 1983); lo cual señala claramente la importancia de realizar análisis fitosanitarios de la semilla a utilizar (Marinelli *et al.*, 2005).

El incremento de las plantas afectadas con tizón desde el estadio vegetativo V2 al estadio reproductivo R2 (plena floración), estaría indicando que el origen de las infecciones durante el cultivo podría ser el rastrojo de plantas afectadas por la enfermedad el año anterior y en el cual se desarrollaron picnidios y/o peritecios (Garzonio y McGee, 1983; Kmetz *et al.*, 1974, 1979; Milos, 2004). Sin embargo, como el ensayo se sembró en una parcela donde no había sido sembrada soja y como la distancia de dispersión de conidios y ascosporas no superaría los 25m (Milos, 2004; Milos *et al.*, 2005), la infección de las plantas del ensayo sería sólo la debida al inóculo presente en la semilla (Ellis *et al.*, 1974 *a*; Garzonio y McGee, 1983; Milos, 2004); por lo que las infecciones registradas en los distintos estadios provienen de la semilla utilizada, manteniéndose el micelio de *P. sojae* en latencia en las plantas hasta que el estrés por paraquat o la senescencia natural favorecen su expresión. Incluso, al evaluar March *et al.* (2005) el efecto de fungicidas curasemillas sobre infecciones por *P. sojae*, comprobaron que en algunos casos no se producía el incremento de las infecciones, lo que demuestra que éstas provenían exclusivamente de la semilla.

Por otro lado, es interesante señalar que la incidencia de la enfermedad a senescencia natural (R7), fue menor que la correspondiente a plena floración (R2) en la cual se había aplicado paraquat, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Cerkauskas *et al.* (1983). Esto también señala que el tratamiento herbicida favorece la expresión de la enfermedad, más que la producción de nuevas infecciones.

Este herbicida causa estrés oxidativo en el sistema celular (Calderbank *et al.*, 1978; Ware, 1989), lo que favorecería la expresión de las infecciones latentes ya existentes. Específicamente en soja se ha demostrado que el paraquat produce incremento del malondialdehído, que es un producto de la peroxidación de lípidos de membrana, indicativo ello de un fuerte estrés oxidativo (Curetti *et al.*, 2005).

Considerando los resultados obtenidos, el uso de paraquat como desecante para favorecer la cosecha anticipada, podría significar la producción de rastrojo con mayor concentración de inóculo que el que eventualmente puede causar el estrés natural por senescencia.

Al desarrollar un sistema de Pronóstico de Puntos para la aplicación de fungicidas en el control de enfermedades de la soja, TeKrony *et al.* (1984 *b*) señalan las dificultades que suponen las infecciones endofíticas por *P. sojae*, pues esta característica dificulta establecer con precisión el momento de infección para aplicar entonces fungicidas sistémicos; por lo que la aplicación de

paraquat en estaciones de muestreo en un cultivo para detectar infecciones endofíticas a campo, podría usarse como herramienta de monitoreo de esta enfermedad. Además, esta posibilidad de uso del paraquat permitiría evaluar tratamientos químicos a la semilla o la reacción de variedades en distintos estadios del cultivo (Cerakauskas y Sinclair, 1980; March *et al.*, 2005)

### CONCLUSIONES

I- Paraquat permite detectar infecciones endofíticas por *P. sojae* en soja en estadios vegetativos y reproductivos.

II- La aplicación de paraquat en diferentes estadios vegetativos permitiría evaluar la acción de curasemillas, prácticas de manejo cultural (rotaciones) y el comportamiento de variedades frente a infecciones naturales *P. sojae*.

III- La semilla de soja es un importante vehículo de dispersión de *Phomopsis sojae*.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ATHOW, K.L. 1987. Fungal diseases. Pags. 687-727 en: Soybeans: improvement, production and uses (Caldwell, B E., ed.). Agronomy Monograph N°16. American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin. EE.UU. 681pp.
- CALDERBANK, A.; R.C. BRIAN; M.P. ALLEN; G. DOUGLAS; A.W.R. HEADFERD; R.S.L. JEATER; R.M. SPRINGETT and A.F.J. WHEELER. 1978. Bipyrilidium herbicides. Pags. 67-86, *In: Jealott's Mill, Fifty years of Agricultural Research* Peacock, F.C., ed. ICI, Inglaterra.
- CASAFE, 1997. Paraquat. Pag 804, *In: Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina*. (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, eds.). 8va Edición.
- CERAKAUSKAS, R. F. and J.B. SINCLAIR. 1980. Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean tissues. *Phytopathology* 70: 1036-1038.
- CERAKAUKAS, R.F.; O.D. DHINGRA and J.B. SINCLAIR. 1983. Effect of three desiccant-type herbicides on fruiting structures of *Colletotrichum truncatum* and *Phomopsis* spp. on soybean stems. *Plant Dis.* 67: 620-622.
- CURETTI, M.; C. LUNA; D. DUCASSE; G. BENITEZ; S. VARGAS GIL y G. MARCH. 2005. Importancia de la micorrización en la capacidad para soportar estrés oxidativo por paraquat. Pag. 521, *In: Libro de Resúmenes XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología*, Carlos Paz. 19-22 de Abril, 2005.
- (a)ELLIS, M.A.; C.C. MACHADO; C. PRASARTSEE and J.B. SINCLAIR. 1974. Occurrence of *Diaporthe Phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis* sp.) in various soybean seedlots. *Plant Dis.* 58: 173-176.
- (b)ELLIS, M.A.; M.B. ILYAS; F.D. TENNE; J.B. SINCLAIR and H.L. PALM. 1974. Effect of foliar applications of benomyl on internally seedborne fungi and pod and stem blight in soybean. *Plant Dis.* 58: 760-763.
- GARZONIO, D.M. and D.C. MCGEE. 1983. Comparison of seeds and crop residues as sources of inoculum for pod and stem blight of soybeans. *Plant Dis.* 67: 1374-1376.
- GIORDA, L.M. 1997. La soja en la Argentina. Pags. 13-26, *In: El cultivo de la soja en la Argentina*. Giorda, L. M. y H. E. J. Baigorri (Eds.). INTA C. R. Córdoba. editar. San Juan.
- HOBBS, T.W.; A.F. SCHMITTHENNER and G.A. KUTER. 1985. A new *Phomopsis* species from soybean. *Mycologia* 77: 535-544.

- KMETZ, K.T.; C.W. ELLET and A.F. SCHMITTHENNER. 1974. Isolation of seed-borne *Diaphorte phaseolorum* and *Phomopsis* from immature soybean plants. *Plant Dis. Rep.*: 68: 978-982.
- KMETZ, K.T.; C.W. ELLET and A.F. SCHMITTHENNER. 1979. Soybean seed decay: sources of inoculum and nature of infection. *Phytopathology* 69: 798-801.
- LARRAN, S.; C. ROLLÁN; H. BRUNO ANGELES; H.E. ALIPPI y M.I. URRUTIA. 2002. Endophytic fungi soybean leaves. *Invest. Arg.: Prod. Prot. Veg.* 17 (1): 173-178.
- MARCH, G.; A. MARINELLI; C. ODDINO; J. CANAL y C. CRENNNA. 2005. Efecto de curasemillas sobre infecciones endofíticas por *Phomopsis sojae*. Pag. 291, *In: Libro de Resúmenes, XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, 19-22 de abril de 2005, Carlos Paz, Argentina.*
- MARINELLI, A.; C. ODDINO; D. MCCARGO; J. MERILES; G. BENITEZ y S. VARGAS GIL. 2005. Enfermedades de la soja en el sur de Córdoba, Argentina. Pag. 293, *In: Libro de Resúmenes, XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, 19-22 de abril de 2005, Carlos Paz, Argentina.*
- McGEE, D.C. 1983. Epidemiology of soybean seed decay by *Phomopsis* and *Diaporthe* spp. *Seed Science and Technology* 11: 719-729.
- MILOS, M. 2004. El rastrojo como fuente de inóculo de *Phomopsis sojae* causante del tizón del tallo y de la vaina de la soja. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Río Cuarto.
- MILOS, M.; A. MARINELLI; C. ODDINO y G. MARCH. 2005. Distribución espacial del Tizón de la vaina y del tallo de la soja (*Phomopsis sojae*). Libro de Resúmenes del XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Pag. 369.
- PLOPER, L.D.; T.S. ABNEY and K.W. ROY. 1992. Influence of soybean genotype on rate of seed maturation and its impact on seedborne fungi. *Plant Dis.* 76: 287-292.
- PRASARTSEE, C.; F.D. TENNE; M.B. ILYAS; M.A. ELLIS and J.B. SINCLAIR. 1975. Reduction of internally seedborne *Diaporthe Phaseolorum* var. *sojae* by fungicide sprays. *Plant Dis.* 59: 20-23.
- ROSS, J.P. 1975. Effect of overhead irrigation and benomyl sprays on late-season foliar diseases, seed infection, and yields of soybean. *Plant Dis.* 59: 809-813.
- RUPE, J.C. and S. FERRIS. 1987. A model for predicting the effects of microclimate on infection of soybean by *Phomopsis longicolla*. *Phytopathology* 77: 1162-1166.
- SAGPYA. 2003. Estimaciones agrícolas – Oleaginosas – Soja. En: [www.sagpya.gov.ar/0-0/index/agricultura/index\\_agricultura.htm](http://www.sagpya.gov.ar/0-0/index/agricultura/index_agricultura.htm). Consultado: 10-2003.

- SINCLAIR, J.B. and P.A. BACKMAN (eds.). 1989. Compendium of Soybean Diseases. 3<sup>rd</sup> ed. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul. MN. EE.UU. 106 pp.
- SINCLAIR, J.B. and R.F. CERAUKASKAS. 1997. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. Pags.3-29, *In*: Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants (S.,C. Redlin, and L.M. Carris, eds.). The American Phytopathological Society. St. Paul. MN. EE.UU. 223 pp.
- (a)TEKRONY, D.M.; D.B. EGLI; D.B. BALLEES; L. TOMES and R.E. STUCKEY. 1984. Effect of date of harvest maturity on soybean seed quality and *Phomopsis* sp. Seed infection. *Crop Science* 24: 189-193.
- (b)TEKRONY, D.M.; R.E. STUCKEY; D.B. EGLI and L. TOMES. 1984. Effectiveness of a point system for scheduling foliar fungicides in soybean seed fields. *Plant Dis.* 69: 962-965.
- WARE, G.W. 1989. *The Pesticide Book*. Thomson Publications. California. EE.UU. 336 pp.
- WRATHER, J.A.; S.R. KENDIG; W.J. WIEBOLD and R.D. RIGGS. 1996. Cultivar and planting date effects on soybean stand, yield, and *Phomopsis* sp. seed infection. *Plant Dis.* 80: 622-624.
- WRATHER, J.A.; T.R. ANDERSON; D.M. ARSYAD; Y. TAN; L.D. PLOPPER; A. PORTA-PUGLIA; H.H. RAM and J.T. YORINORI. 2001. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998.