

**IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIOSIS DE LA SOJA
EN DOS ZONAS AGRÍCOLAS Y CÁLCULO DE LA
FUNCIÓN DE DAÑO PARA EL TIZÓN BACTERIANO**

MARIANO FEDERICO CRACOGNA

Tesis presentada como requisito parcial para optar por el grado académico de
MAGÍSTER SCIENTIAE

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de
Mar del Plata

Balcarce, 18 de diciembre de 2007
Buenos Aires – Argentina

**IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIOSIS DE LA SOJA
EN DOS ZONAS AGRÍCOLAS Y CÁLCULO DE LA
FUNCIÓN DE DAÑO PARA EL TIZÓN BACTERIANO**

MARIANO FEDERICO CRACOGNA

Comité consejero

.....
Dra. Azucena del Carmen Ridao
(Directora de Tesis)

.....
Ing. Agr. Alicia L. Melegari, M. Sc.
(Asesor)

.....
Ing. Agr. Jose Luis Bodega, M. Sc.
(Asesor)

.....
Lic. Mat. María Gabriela Cendoya, M.Sc.
(Asesor)

**IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIOSIS DE LA SOJA
EN DOS ZONAS AGRÍCOLAS Y CÁLCULO DE LA
FUNCIÓN DE DAÑO PARA EL TIZÓN BACTERIANO**

MARIANO FEDERICO CRACOGNA

Aprobada por:

.....
Dra. Azucena del Carmen Ridao
(Directora de Tesis)

.....
Dr. Pedro A. Balatti
(Evaluador Externo)

DEDICATORIA

A Mariana, por estar siempre presente en estos dos largos años.

A Maria C. Iglesias, con quien di mis primeros pasos en investigación.

A mis padres y hermanos por el apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A Azucena, por la paciencia, apoyo y dedicación para lograr lo mejor de mí.

A mis compañeros *Alberto Gochez, Juan de Souza, Carla Maringolo, Agustina Ressa, Maria Agostini, Gabriela Martinoia* por todos los momentos vividos y compartidos.

A *Graciela Chiarinoti* por cuidar de nosotros en el casino dormitorio.

Y a todos aquellos que de alguna u otra forma han contribuido en la realización de esta tesis y en mi formación profesional.

ÍNDICE

	pag
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis:	3
Objetivos:	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1. Cultivo hospedante	4
1.1. Sanidad del cultivo	5
1.2. Resistencia genética de la soja a las bacterias	5
2. Las bacterias como microorganismos fitopatógenos	6
2.1. Mecanismo de entrada al tejido vegetal	7
3. Bacteriosis de la soja	8
3.1. Tizón bacteriano causado <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv <i>glycinea</i> (Coercer) Gardan, Bollet, Abu Ghorrah, Grimont & Grimont	8
3.1.1. Síntomas que ocasiona	9
3.1.2. Dispersión y persistencia	10
3.1.3. Razas fisiológicas	11
3.1.4. Pérdidas de rendimiento	12
3.1.5. Pústula bacteriana causada por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>glycines</i> (Nakano) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings	12
3.1.6. Síntomas que ocasiona	13
3.1.7. Dispersión y persistencia	14
3.1.8. Razas fisiológicas	15
3.1.9. Pérdidas de rendimiento	16
3.1.10. “Quemazón” o “wildfire” causado por <i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv <i>tabaci</i> (Wolf & Foster) Young, Dye & Wilkie.	16

3.1.11. Síntomas que ocasiona	16
3.1.12. Dispersión y persistencia	17
3.1.13. Razas fisiológicas	18
3.1.14. Pérdidas de rendimiento	18
3.2. Otras bacteriosis de la soja	18
4. Cuantificación de enfermedades	19
MATERIALES Y MÉTODOS	22
1. Identificación del organismo causal de las enfermedades	22
1.1. Recolección y acondicionamiento de las muestras	22
1.2. Aislamiento y pruebas de patogenicidad	22
1.3. Identificación y caracterización de aislamientos	23
2. Escala diagramática para cuantificación del tizón bacteriano.	24
2.1. Elaboración de la escala	24
2.2. Validación de la escala diagramática	25
3. Ensayo de campo para evaluación de pérdidas de rendimiento	26
3.1. Cálculo de severidad (S)	28
3.2. Estimación del área foliar (AF) de cada planta y cálculo del índice de área foliar (IAF)	28
3.3. Cálculo de la duración del área foliar sana (DAFS) y la absorción del área foliar sana (AAFS)	29
3.4. Cálculo del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCP)	29
3.5. Determinación del rendimiento y estimación de la función de daño	30
RESULTADOS	31
1. Identificación del organismo causal	31
2. Escala diagramática para cuantificación del tizón bacteriano	40

2.1. Elaboración de la escala	40
2.2. Validación de la escala diagramática	41
3. Cálculo de la función de daño para el tizón bacteriano	47
3.1. Variables patométricas calculadas	47
DISCUSIÓN	50
1. Identificación del organismo causal de las enfermedades	50
2. Escala diagramática para la cuantificación del tizón bacteriano	53
3. Calculo de la función de daño para el tizón bacteriano	55
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXO	68
Pruebas bioquímicas para aislamientos fluorescentes	68
1. Prueba de KOH para determinar el Gram	68
2. Catalasa	69
3. Oxidación y/o fermentación de la glucosa	69
4. Fluorescencia en KB	70
5. Arginina dihidrolasa	70
6. Citocromo oxidasa	71
7. Levano	71
8. Pudrición de papa	72
9. Hipersensibilidad en plantas de tabaco	72

ÍNDICE DE CUADROS

<p>Tabla 1: características bioquímicas de 19 aislamientos obtenidos durante la campaña 2005/2006 en las dos zonas de estudio.</p>	35
<p>Tabla 2: características bioquímicas de 29 aislamientos fitopatógenos obtenidos durante la campaña 2006/2007 en las dos zonas de estudio.</p>	36
<p>Tabla 2 (continuación): características bioquímicas de 29 aislamientos fitopatógenos obtenidos durante la campaña 2006/2007 en las dos zonas de estudio.</p>	37
<p>Tabla 3: características bioquímicas complementarias para los 29 aislamientos obtenidos durante la campaña 2006/2007 en las dos zonas de estudio.</p>	38
<p>Tabla 3 (continuación): características bioquímicas complementarias para los 29 aislamientos obtenidos durante la campaña 2006/2007 en las dos zonas de estudio.</p>	39
<p>Tabla 4: coeficientes de la ecuación de regresión, intercepto (a), pendiente (b) y coeficientes de determinación (r^2) calculados considerando como variable independiente la severidad real de cada folíolo y como variable dependiente la estimación de cada evaluador. Agrupados por evaluadores sin la escala (1 a 4) y con la escala (1 a 4) y por cultivares. Un intercepto (a) seguido de * es significativamente diferente de cero ($\alpha = 0.01$) y una pendiente (b) seguido de * es significativamente diferente de uno ($\alpha = 0.01$).</p>	43
<p>Tabla 5: coeficientes de la ecuación de regresión, intercepto (a), pendiente (b) y coeficientes de determinación (r^2) calculados combinando las estimaciones de dos evaluadores cuando no utilizaron la escala como ayuda visual. Los datos se presentan agrupados por combinación de evaluadores (x/y) y por cultivares. Un intercepto (a) seguido de * es significativamente diferente de cero ($\alpha = 0.01$) y una pendiente (b) seguido de * es significativamente diferente de uno ($\alpha = 0.01$).</p>	46
<p>Tabla 6: coeficientes de la ecuación de regresión, intercepto (a), pendiente (b) y coeficientes de determinación (r^2) calculados combinando las estimaciones de dos evaluadores cuando utilizan la escala como ayuda visual. Los datos se presentan agrupados por combinación de evaluadores (x/y) y por cultivares. Un intercepto (a) seguido de * es significativamente diferente de cero ($\alpha = 0.01$) y una pendiente (b) seguido de * es significativamente diferente de uno ($\alpha = 0.01$).</p>	46

Tabla 7: medias de tratamiento para el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (abcp), duración del área foliar sana (dafs), absorción del área foliar sana (aafs) y rendimiento (rend) para los cultivares a3401 y dm4800. Valores seguidos de letras distintas indican diferencias significativas para las medias de tratamiento por tukey ($\alpha = 0.05$) 49

Tabla 8: coeficientes de correlación lineal de pearson, entre la variable rendimiento y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (abcp), la duración del área folia sana (dafs) y la absorción del área foliar sana (aafs) para cada cultivar. Probabilidad asociada a la prueba de hipótesis $h_0: \rho = 0$ 49

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema de identificación de géneros de bacterias fitopatógenas por pruebas bioquímicas sencillas. Adaptado de Schaad (1988) 24
- Figura 2: Pico arenador basado en la succión de un sistema venturi. Extremo A conectado a la fuente de presión (cilindro de CO₂) y el caño de succión (B) es introducido en un recipiente con arena. 27
- Figura 3: A) Síntomas de pústula bacteriana sobre el cultivar DM 3200 recolectado en un lote de la localidad de Gral. Madariaga (Bs. As.). B) Detalle de una pústula (60x) 31
- Figura 4: Síntomas de tizón bacteriano A) con presencia de halo clorótico sobre el cv Munasca proveniente de la EEA Reconquista. B) con amplio halo clorótico sobre el cv Pampeana 540 proveniente de la EEA Reconquista. C) Leve halo clorótico sobre el cv DM 4500 proveniente de la localidad de Necochea (Bs. As.). 32
- Figura 5: Síntomas desarrollados luego de inocular plantas del cv DM 4800 con heridas en sus hojas: A) aislamiento 56.2, diez días desde la inoculación B) aislamiento 85.4, trece días desde la inoculación C) Aislamiento 87.2, quince días desde la inoculación. 33
- Figura 6: Síntomas desarrollados luego de inocular por infiltración: A) aislamiento 112.2, catorce días desde la inoculación en cv DM4870 B) aislamiento 111.6 doce días desde la inoculación en DM4200 C) Aislamiento 121.1 doce días desde la inoculación en DM4870. 34
- Figura 7: Escala diagramática para cuantificación del tizón bacteriano de la soja (*Glycine max* (L.) Merrill) causado por *Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea* elaborada del análisis de 162 folíolos de soja. Los niveles se eligieron considerando las limitaciones de la ley de estímulo visual de Weber y Fechner. 40
- Figura 8: Regresiones lineales entre la severidad estimada por los evaluadores sin utilizar la escala y la severidad real de los folíolos para los cultivares DM 3401 (o), DM 2000 (Δ), DM 4800 (□). Se presentan las ecuaciones estimadas por el modelo de regresión lineal y los R² obtenidos en cada uno. 41
- Figura 9: Regresiones lineales entre la severidad estimada por los evaluadores utilizando la escala y la severidad real de los folíolos para los cultivares DM 3401 (o), DM 2000 (Δ), DM 4800 (□). Se presentan las ecuaciones estimadas por el modelo de regresión lineal y los R² obtenidos en cada uno. 42

Figura 10: Distribución de errores absolutos entre severidad real y los valores estimados por cada evaluador para cultivar A 3401 (o), DM 4800 (□) y DM 2000 (Δ) sin utilizar la escala. 44

Figura 11: Distribución de errores absolutos entre severidad real y los valores estimados por cada evaluador para cada cultivar A 3401 (o), DM 4800 (□) y DM 2000 (Δ) cuando utilizan la escala como referencia visual. 45

Figura 12: Relación de ancho del folíolo central y superficie foliar para los cultivares A3401 y DM 4800. $y = 20.94 - 12.58x + 5.87x^2 - 0.20x^3$ para el cultivar A3401 (n= 595), $y = 57.70 - 35.34x + 9.40x^2 - 0.37x^3$ para el cultivar DM 4800 (n=464) donde x es el ancho del folíolo central. 48

INTRODUCCIÓN

En 1965 Atlas escribió “*El cultivo de soja ofrece en nuestro país brillantes perspectivas... Existe la posibilidad de su implantación definitiva y en gran escala*”. Su pronóstico se cumplió y en la actualidad la soja (*Glycine max* (L.) Merrill) ocupa una posición destacada en la agricultura Argentina con una superficie de 15,2 millones de hectáreas para la campaña 2005/2006, lo que confirma que es uno de los cultivos con mayor área sembrada (SAGPYA, 2006).

Desde la publicación pionera “Las bacteriosis de la soja en la Argentina” de Atlas (1965) hasta el presente no se han publicado trabajos tan completos de identificación y distribución de los agentes causales de las bacteriosis en nuestro país. Esta investigadora describió y caracterizó tres bacteriosis: el tizón foliar provocado por *Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea* (Coerper 1919) Gardan, Bollet, Abu Ghorrah, Grimont y Grimont 1992), la pústula bacteriana causada *Xanthomonas axonopodis* pv *glycines* ((Nakano 1919) Vauterin, Hoste, Kersters y Swings 1995) y la quemazón o ‘wildfire’ causada por *Pseudomonas syringae* pv *tabaco* (Wolf y Foster 1917) Young, Dye y Wilkie 1978), , esta última solo confirmada para la provincia de Misiones.

Sin embargo se han observado sintomatologías asociadas a bacterias que no se corresponden con las enfermedades descritas hasta el presente en Argentina. La bibliografía internacional cita dieciséis especies bacterianas como agentes causantes de enfermedades sobre soja, naturalmente o inoculadas, pertenecientes a seis géneros (Sinclair y Backman, 1989).

En años recientes las bacteriosis de la soja han comenzado a llamar la atención, ya sea por su prevalencia como por lo espectacular de sus síntomas. González et al. (2005) destacaron la presencia del tizón foliar causado por *Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea* en cultivos del noroeste argentino y Cabrera et al. (2005), en la provincia de Corrientes, informaron una prevalencia del 100 % para el tizón foliar y del 4,7 %

para la pústula bacteriana. Los valores de severidad del tizón foliar están poco documentados, pero la destrucción del follaje es evidente. Ridao et al. (2005) indicaron, para diferentes estadíos, un deflecamiento severo de las hojas causado por bacterias.

Aunque el tizón foliar es una enfermedad de amplia distribución y alta capacidad de destrucción del follaje, a pesar de ello poco se ha trabajado sobre las pérdidas que ocasiona. En 1994 se estimó para nuestro país una pérdida de rendimiento ocasionada por bacteriosis de 12200 t (Wrather et al. 1997).

Evaluar una enfermedad es esencial en estudios de disminución del rendimiento de los cultivos (Gaunt, 1987) y cuantificar precisamente un área enferma, a su vez, es una tarea trabajosa. Para salvar este inconveniente, varias estrategias han sido propuestas para la evaluación de la severidad, mereciendo destacar las escalas diagramáticas (Martins et al. 2004).

Las escalas diagramáticas son representaciones ilustradas de una serie de plantas, hojas o partes de plantas con síntomas de una determinada enfermedad con diferentes niveles de severidad (Bergamin y Amorim, 1996). Su utilización es esencial para obtener una función matemática que relacione la severidad (o una variable derivada) con el rendimiento del cultivo. Esta función no se conoce para el tizón bacteriano.

Hipótesis:

1. Enfermedades bacterianas no descritas para Argentina, se presentan en el cultivo de soja.
2. La pérdida de rendimiento en soja debida a bacteriosis puede ser estimada por una función matemática.

Objetivos:

1. Identificar las bacterias causantes de enfermedades en lotes de soja de las EEA Reconquista y Balcarce.
2. Confeccionar y validar una escala diagramática para la evaluación del tizón foliar bacteriano.
3. Hallar una función de daño causado por el tizón foliar en cultivares de soja de diferentes grupos de madurez.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5. Cultivo hospedante

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.), un cultivo con una semilla rica en aceite y proteínas, es actualmente la principal fuente de aceite comestible. Mundialmente se produjeron 228 millones de toneladas de soja en la campaña 2005/2006 ubicando a este cultivo como uno de los más importantes.

En la agricultura Argentina ocupa una posición destacada, siendo uno de los cultivos con mayor área sembrada, aproximadamente 15,2 millones de hectáreas en la campaña 2005/2006, con una producción de 40 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 2670 kg ha⁻¹ (SAGPYA, 2006).

Entre las campañas 1990/1991 y 2005/2006 la superficie sembrada con soja creció a una tasa de 0,7 millones de hectáreas por año. Este crecimiento se produjo por diferentes razones, y entre las más relevantes se mencionan la introducción de cultivares transgénicos, el incremento en el uso de la siembra directa y la adaptación del cultivo a diferentes regiones con el lanzamiento de nuevas variedades (Rossi, 2003). Esto permitió especialmente durante la década del '90 la difusión del cultivo en áreas ecológicamente marginales (Ghida Daza, 2002).

Actualmente existe una demanda potencial para la producción de biodiesel, estimándose un requerimiento de 3.5 millones de toneladas de soja, para satisfacer un corte del 5 % sobre el consumo actual de gasoil en Argentina. Esta demanda extra podría cubrirse con un aumento de 1,2 millones de hectáreas en la superficie sembrada. No obstante estas cifras se reducirían mejorando la eficiencia de cosecha y el control de las enfermedades de fin de ciclo, estos dos aspectos del manejo del cultivo aportarían el 35 % del biodiesel necesario para el corte del 5 % sin modificar la superficie de siembra (IICA/SAGPyA 2006).

5.1. Sanidad del cultivo

El incremento de la superficie de siembra causó un cambio en el aspecto sanitario del cultivo de soja (Ploper 2003), coincidiendo varios autores en señalar un incremento en la cantidad de enfermedades y en la severidad con la cual se manifiestan. (Hartman, Sinclair and Rupe, 1999; Wraher et al. 1997; Wrather et al. 2001; Ploper 2003; Ploper, Yorinori y Morel Paiva, 2003). Según Ploper (2003) en 1975/1976 se mencionaba la existencia de cinco enfermedades causadas por hongos y una por bacterias. Pero Atlas (1965) ya mencionaba la existencia de tres bacteriosis afectando al cultivo de soja en Argentina.

Lo cierto es que el cultivo de soja, a nivel mundial, se ve afectado por una gran cantidad de hongos, bacterias, virus y nemátodos. Hartman et al. (1999) compila 63 géneros de hongos, 10 géneros de bacterias, 13 géneros de nemátodos y 27 géneros de virus. Esto conforma más de 100 patógenos que afectan al cultivo de soja, de los cuales 35 son los más importantes económicamente (Hartman et al. 1999).

5.2. Resistencia genética de la soja a las bacterias

La variabilidad del cultivo de soja fue observada por Coerper (1919) quien destacó que el desarrollo de variedades resistentes es el principal método de control.

La resistencia a los patógenos es gobernada a menudo por una interacción de genes entre la planta y el patógeno. Donde un gen de resistencia específico (gen R) en la planta se corresponde con un gen de avirulencia (gen avr) en el patógeno. Esto es conocido como interacción gen por gen descrito por Flor (1955). Para cada gen de avirulencia en el patógeno le corresponde un gen de resistencia en una planta resistente, y la resistencia sólo se observa cuando ambos genes están presentes (Ashfield et al. 1995)

Mukherjee et al. (1966) y posteriormente Staskawicz, Dahlbeck y Keen, (1984) detectaron que la resistencia genética de algunos cultivares de soja a determinadas razas de *Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea* (Psg) responde al modelo de interacción gen por gen.

El gen *avrB* identificado en las razas 0 y 1 de Psg (Staskawicz et al. 1987) se corresponde con el gen de resistencia dominante, *Rpg1*, de los cultivares Norchief y Harosoy, demostrando la interacción gen por gen (Staskawicz et al. 1987; Tamaki et al. 1988).

Un alto nivel de resistencia a *Xanthomonas axonopodis* pv *glycinea* (Xag) es determinado por un gen simple recesivo designado como *rxp* (Groth and Braun, 1986; Narvel et al. 2001).

Los genes *avr* de Psg determinan el rango de hospedantes incompatibles para el patógeno y se definen así las diferentes razas (Napoli and Staskawicz, 1987).

Por ejemplo la raza 6 da una reacción incompatible en los cultivares “Harosoy”, “Acme”, “Peking” y “Centennial” y se califica como avirulenta, aunque da reacción compatible con los cultivares “Norchief” y “Flambeau” (Napoli and Staskawicz, 1987).

No se encuentra información publicada sobre la resistencia a las bacteriosis de los cultivares actualmente utilizados en Argentina.

6. Las bacterias como microorganismos fitopatógenos

Las bacterias son habitantes comunes de la superficie y del interior de la mayoría de los vegetales (Hirano and Upper, 1990), pudiendo presentar relaciones neutras o simbióticas con la planta hospedante.

Las distinciones entre bacterias endofíticas, epifíticas y fitopatogénicas son de naturaleza didáctica. No existe un claro límite entre grupos ni tampoco un gradiente

entre ellos, dado que algunas poblaciones bacterianas pueden fluctuar entre la colonización endofítica y epifítica (Hallmann et al. 1997).

Leben (1961) propuso que, cuando las bacterias se multiplican en la superficie de plantas aparentemente sanas lo hacen en su fase epifítica. Cuando se las asocia con una enfermedad lo hacen en una fase patogénica (Leben, 1981).

Distintas estrategias para el crecimiento tanto epifítico como endofítico son probablemente importantes para la vida de los patógenos asociados con las hojas. Una completa revisión sobre las adaptaciones necesarias para tolerar el ambiente de la hoja ha sido realizada por Beattie y Lindow (1995, 1999).

6.1. Mecanismo de entrada al tejido vegetal

Las bacterias para iniciar la patogénesis deben primero ingresar a la hoja. A diferencia de los hongos patógenos, las bacterias carecen de la habilidad de ingresar directamente por la epidermis.

Beattie y Lindow (1999) proponen un modelo de ocho etapas para explicar el ingreso de las bacterias al tejido vegetal. Este modelo comprende la llegada de la bacteria a la hoja, la modificación del micro ambiente en las inmediaciones de la célula bacteriana, la división celular y la extensión del ambiente modificado, la formación de microcolonias bacterianas, confluencia de las microcolonias, entrada al espacio intercelular, la multiplicación en los espacios intercelulares y la salida de la bacteria hacia la superficie de la hoja.

La entrada al espacio intercelular se produce a través de estomas, hidátodos, nectarios y heridas presentes en la superficie de la hoja (Huang, 1986). Kauffman y Leben (1974) probaron en condiciones controladas, que la entrada de bacterias también puede producirse a través de las flores.

Allington y Feaster (1946) relacionaron el comportamiento cíclico de apertura y cierre estomático con la severidad ocasionada por Xag, realizaron inoculaciones

espaciadas en el tiempo y obtuvieron mayor severidad en las horas del día en que los estomas permanecían completamente abiertos.

Existe evidencia reciente de que el cierre de los estomas es parte de un sistema innato de las plantas para defenderse de la invasión bacteriana. Las células guardianas de los estomas perciben la presencia de la célula bacteriana mediante receptores moleculares, lo cual produce el cierre estomático (Melotto et al. 2006).

Para una exitosa colonización de las plantas *Pseudomonas syringae* y otras fitobacterias desarrollaron una variedad de factores de virulencia para evadir las defensas de las plantas y así obtener nutrientes (Abramovitch and Martin, 2004; Nomura, Melotto and He, 2005) o para causar la re-apertura estomática (Melotto et al. 2006).

7. Bacteriosis de la soja

7.1. Tizón bacteriano causado *Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea* (Coercer)

Gardan, Bollet, Abu Ghorrah, Grimont & Grimont

Psg es el agente causal de una de las principales enfermedades del cultivo de soja conocida como “tizón bacteriano” en Argentina (Atlas, 1965), “bacterial blight” en todos los países de habla inglesa, “añublo” en Colombia (Peña, Soto y Victoria, 1982) y “crestamento foliar” en Brasil (Picinini y Fernández, 2000). La sinonimia de Psg es la siguiente: *Bacterium glycineun* Coerper; *Bacterium sojae* Wolf; *Pseudomonas glycinea* (Coerper) Stapp; *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* (Coerper) Young, Dye y Wilkie.

El tizón bacteriano prevalece en todas las áreas donde se cultiva soja alrededor del mundo (Mew and Kennedy, 1971; Daft and Leben, 1972; Kennedy and Ercolani, 1978; Fett and Sequeira, 1981; Park and Lim, 1986; Prom and

Venette, 1997). En Argentina su presencia fue reportada por Atlas (1965) en las provincias de Misiones, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires que actualmente constituyen las principales provincias productoras de soja.

Son pocos los trabajos que se han publicado sobre Psg en Argentina, Ploper (1994) reportó la prevalencia del tizón bacteriano en la campaña 1993/94 en Tucumán y González et al. (2005) destacaron su presencia en todo el noroeste argentino. Cabrera et al. (2005) manifestó que el tizón bacteriano predomina sobre otras enfermedades de la soja en la provincia de Corrientes. Por su parte Ridaó et al. (2005) encontraron que en diferentes estadios se produce un deflecamiento severo de las hojas causado por bacterias en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Una revisión de los informes semanales del SINAVIMO¹ permite determinar que Psg es endémica en todas las áreas sojeras de Argentina.

7.1.1. Síntomas que ocasiona

Sobre el follaje, las lesiones iniciales características de esta enfermedad aparecen como áreas pequeñas, angulares, húmedas, rodeadas por halos cloróticos (Atlas, 1965; Prom and Venette, 1997). El halo clorótico puede variar en tamaño. Chamberlain (1952) describe aislamientos que en inoculaciones en invernáculo producen mas o menos halo clorótico dependiendo de la temperatura de incubación y determina que a temperatura de 28° C durante el día y 18,5° C por la noche el halo presenta 2 mm. Moffett (1976) describe al aislamiento de Psg 0368, caracterizado por producir un ancho halo clorótico a 20° – 22° C, temperaturas que fueron más favorables que un rango entre 27° y 30° C para la formación del halo.

¹ SINAVIMO (Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo). Informes disponibles en www.sinavimo.gov.ar

La severidad de la enfermedad se incrementa bajo condiciones ambientales de alta humedad (Kennedy and Mew, 1971). Conforme las hojas envejecen las lesiones necróticas se expanden, coalescen y caen dando a la hoja un aspecto deshilachado (Atlas, 1965; Hwang and Lim, 1992; Prom and Venette, 1997) ocurriendo la defoliación.

7.1.2. Dispersión y persistencia

Kendrick y Gardner (1920) demostraron que el patógeno es llevado por las semillas y Kauffman y Leben (1974) investigaron cómo llegan las bacterias a las semillas concluyendo que, en condiciones controladas, la entrada se produce a través de las flores. Psg se ha detectado en las semillas hasta seis meses posteriores a la cosecha (Graham, 1953b) pudiendo permanecer tanto en la superficie como dentro de la semilla (Fett, 1979).

La dispersión del inóculo dentro de un lote se realiza por salpicado de la lluvia (Daft and Leben, 1972) y por la formación de finas partículas de agua suspendidas en el aire (aerosoles) que contiene células bacterianas (Venette and Kennedy, 1975)

Psg persiste durante el invierno en el suelo y en rastrojos de soja infectados (Graham, 1953b; Daft y Leben 1973; Kennedy, 1969) Sin embargo, un estudio conducido en el estado de Paraná, Brasil, determina que los rastrojos infectados puestos sobre el suelo o enterrados no resulta ser el sitio para la supervivencia del patógeno durante el invierno (Fett, 1979). El autor atribuye la rápida declinación de Psg a la actividad antagónica de los microorganismos saprófitos. A su vez, Park y Lim (1985) estudiaron el efecto de la humedad y la temperatura sobre la supervivencia, concluyendo que Psg puede sobrevivir sobre el suelo con la condición de que éste permanezca frío y seco.

7.1.3. Razas fisiológicas

La existencia de razas de Psg fue reportada por Cross et al. (1966). Actualmente se conocen 11 razas fisiológicas, todas ellas separadas por reacciones de susceptibilidad o resistencia sobre los cultivares Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit y Norchief.

Cross et al. (1966) definieron siete razas, designadas como Raza 1 a 7. Mientras que Thomas y Leary (1980) identificaron una nueva raza de aislamientos provenientes de Brisbane, Australia, a la que asignaron el número 8. La raza 9 fue detectada por Gnanamanickan y Ward (1982) trabajando con aislamientos realizados en Canadá. En 1985, Kuchareh y Stall describieron como raza 0, a un aislamiento patógeno en el cultivar "Centennial", pero avirulento sobre los cultivares diferenciales y propusieron incluir al cultivar "Centennial" entre los diferenciales. Por último Abo-Moch, Mavridis y Rudolph (1995) describieron la raza 10, la que produjo reacciones compatibles con los cultivares Harosoy, Lindarin y Merit. De la misma manera Prom y Venette (1997) detectaron cuatro aislamientos que presentaron el patrón de la raza 10, concluyendo que esta raza se encuentra presente en el estado de North Dakota (EEUU).

Cross et al. (1966) observaron que una raza particular tiende a asociarse con un determinado cultivar y que usualmente una raza prevalece en un campo cualquiera. Las razas más comunes en Canadá entre todos los cultivares y localidades evaluados por Gnanamanickan y Ward (1982) fueron la 3 y la 4. Sin embargo para Fett y Sequeira (1981) sólo la raza 4 fue la más predominante en Wisconsin (EEUU). Años más tarde, Prom y Venette (1997) determinaron que de 58 aislamientos provenientes de 70 campos en North Dakota, 40 indujeron reacciones susceptibles sobre todos los cultivares por lo que, también los designaron como pertenecientes a la raza 4.

En Argentina no se han realizado estudios de este tipo, por lo que se desconoce el número de razas presentes.

7.1.4. Pérdidas de rendimiento

La reducción del rendimiento ocasionada por Psg se debe al menor peso de las semillas y a la reducción del área foliar fotosintéticamente activa. Inoculaciones artificiales en el estadio R3, según la escala fenológica de Fehr et al., (1971), resultaron en disminuciones del peso de las semillas de soja en un 9 % (Park y Lim, 1986). En otro estudio Williams y Nyvall (1980) registraron una defoliación del 42 % y un 19 % de severidad de la enfermedad en el área foliar remanente, 4 semanas después de la inoculación.

Dunleavy, Weber y Chamberlain (1960) mencionan que el tizón bacteriano reduce el rendimiento del cultivo en no más del 22 %, en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. Mientras que Williams y Nyvall (1980) registraron un 17.8 % de disminución del rendimiento en condiciones de campo con inoculaciones artificiales de Psg. Para Park y Lim (1986) las pérdidas alcanzaron un 15.2 % cuando se inoculó en R3, y un 5 % cuando se inoculó en V3 o V6, por lo que concluyeron que las inoculaciones artificiales en estados vegetativos no disminuyeron significativamente el rendimiento debido a la capacidad del cultivo de generar nuevas hojas.

No se dispone de registros recientes de las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad.

7.2. Pústula bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv *glycines*

(Nakano) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings

Xag causa la pústula bacteriana de la soja. Esta bacteria ampliamente conocida como *Xanthomonas campestris* pv *glycines* (Nakano) Dye, fue clasificada

como *Xanthomonas axonopodis* pv *glycines* luego de la realización de análisis de hibridación de ADN-ADN (Vauterin et al., 1995).

Otros sinónimos para Xag son: *Phytomonas phaseoli* var. *sojense* (Hedges) Burk; *Bacterium phaseoli* var. *sojense* (Hedges); *Pseudomonas glycines* (Nak.) Elliot; *Phytomonas glycines* (Nak.) Mag.; *Xanthomonas phaseoli* var. *sojense* (Hedges) (Starr) Burk.

La pústula bacteriana es una de las enfermedades más importantes del cultivo de soja en Tailandia donde la temperatura y humedad elevadas acompañadas por esporádicas y fuertes lluvias favorecen su desarrollo (Prathuangwong and Khandej, 1998; Kaewnum, Prathuangwong and Burr, 2005). Esta enfermedad también es muy común en el sur de los Estados Unidos (Narvel et al. 2001); en India (Manjaya and Pawar, 1999) y en Java (Malasia) (Cook, Hardaningsig and Yusmani, 1990). En Java las elevadas temperaturas y las frecuentes lluvias hacen muy difícil el control por otra forma que no sea por cultivares resistentes (Cook et al. 1990).

En Argentina la pústula bacteriana ha sido mencionada para todas las áreas sojeras (SINAVIMO). Ya en la década de 1960, Atlas (1965) mencionaba su presencia en las provincias de Misiones, Chaco, Santa Fe, Entre Ríos, Salta, Tucumán y Río Negro.

7.2.1. Síntomas que ocasiona

La enfermedad afecta principalmente al follaje y se ha citado su presencia en vainas. En las que los síntomas aparecen como pequeñas manchas de color castaño rojizo (Atlas, 1965).

Los síntomas en hojas incluyen pequeñas manchas verde pálido con pústulas (Narvel et al. 2001) o lesiones amarillo – marrón con una elevación en el centro que corresponde a la pústula (Groth and Braun, 1986). La presencia

de la pústula y la ausencia de un halo de aspecto húmedo permiten diferenciar esta enfermedad del tizón bacteriano (Atlas, 1965).

La pústula se forma por hipertrofia (Cook, et al. 1990) o hipertrofia e hiperplasia (Jones and Fett, 1987) de las células del parénquima. La presencia de la pústula ha llevado a la confusión de esta enfermedad con la roya asiática causada por el hongo *Phakopsora pachyryzi* (Syndow & Syndow) (Hartman et al. 1999).

Cuando el ataque es severo se pueden desarrollar grandes lesiones necróticas por confluencia, que se desprenden y dan a la hoja un aspecto desgarrado (Atlas, 1965; Hartman et al. 1999). Altas severidades pueden causar defoliación prematura (Narvel et al. 2001; Hartman et al. 1999).

7.2.2. Dispersión y persistencia

La bacteria sobrevive en las semillas de soja, en la superficie de los rastrojos, y en la rizósfera de las raíces de trigo (Sinclair and Backman, 1989).

Según Groth y Braun (1989), entre un 2 % y un 3 % de las semillas cosechadas de plantas muy infectadas con Xag hospedaron la bacteria en niveles de 5 a 20 ufc semillas⁻¹. La bacteria fue aislada de semillas almacenadas durante 7 meses (Groth and Braun, 1989) y se observaron síntomas de pústula bacteriana en plántulas provenientes de semillas almacenadas 30 meses en condiciones de laboratorio (Graham, 1953b). Además Groth y Braun (1989), detectaron poblaciones epifitas de Xag en plantas cuyas semillas infectadas habían sido almacenadas por 7 meses, e investigaron la supervivencia de Xag sobre rastrojos infectados, determinando que la bacteria persiste en los rastrojos enterrados y en los que permanecen en la superficie.

Graham (1953b) estudió la supervivencia a diferentes temperaturas y humedades en suelo estéril y sin esterilizar. La bacteria persistió en el suelo estéril durante 9 meses a 25° C y 86 % de humedad, pero no sobrevivió más de un mes cuando se utilizó suelo sin esterilizar con las mismas condiciones de temperatura y humedad. Los ensayos de campo realizados por este mismo autor demostraron que Xag sobrevivió en el rastrojo infectado y que pudo iniciar la enfermedad en la siguiente primavera.

7.2.3. Razas fisiológicas

Respecto a las razas fisiológicas, Hwang y Lim (1987) describieron la formación de un grupo de cultivares diferenciales. Un único gen simple recesivo designado como *rxp* confiere resistencia contra Xag (Groth and Braun, 1986; Narvel et al. 2001). Manjaya y Pawar (1999) evaluaron el mecanismo genético de resistencia en el cultivar P-4-2 e informaron que el mismo se debe a la acción de un gen doble recesivo. Ellos indicaron que P-4-2 posee genes de resistencia diferentes del *rxp*, pero no realizaron pruebas genéticas para confirmar esta observación.

Los cultivares que poseen el gen *rxp* luego de ser inoculados con 20 aislamientos de Xag permanecieron asintomáticos mientras que otros cultivares presentaron diferentes síntomas según el aislamiento utilizado (Hwang and Lim, 1987). No se ha publicado más información respecto a este tema. La existencia de un único gen que confiere resistencia y la variabilidad en los síntomas podrían dificultar la utilización de un grupo diferencial de cultivares de soja. Resta aún de probar con otras especies de *Glycine*, como ha sido desarrollado para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* por Kamoun et al. (1992).

7.2.4. Pérdidas de rendimiento

Las pérdidas atribuidas a Xag en cultivares de soja susceptibles a la pústula bacteriana han sido de hasta un 4.3 % (Weber, Dunleavy and Fehr, 1966). En el cultivar “Pella” se observaron severidades de hasta 28 y 41 %, las que a partir del estado reproductivo R3 no resultaron en diferencias en el rendimiento en dos años de ensayos en Illinois (EEUU) (Hwang and Lim, 1992). Atlas (1965) mencionó que las mayores pérdidas se producen cuando la bacteria llega a infectar las vainas, pero la autora no realizó estudios para cuantificar estas pérdidas.

7.3. “Quemazón” o “wildfire” causado por *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* (Wolf & Foster) Young, Dye & Wilkie

Pst no es un patógeno específico de la soja. Aislamientos realizados a partir de soja infectan también porotos (*Phaseolus vulgaris* L.) (Ribeiro et al. 1979) y aislamientos realizados en tabaco (*Nicotiana* sp.) ha resultado ser patógenos de la soja (Chamberlain, 1956a; Ribeiro et al. 1979). Cuando los aislamientos efectuados a partir de soja se inoculan sobre tabaco provocan síntomas menos severos (Chamberlain, 1956a), aunque los aislamientos de soja y tabaco son similares morfológica, fisiológica y serológicamente y en su patogenicidad (Allington, 1945).

Pst ocasiona la enfermedad conocida como “quemazón” o “wildfire” sobre soja (Atlas, 1965) que ha sido citada en Estados Unidos (Allington, 1945; Graham, 1953b), Brasil (Ribeiro et al. 1979) y Argentina (Atlas, 1965).

7.3.1. Síntomas que ocasiona

Los síntomas típicos del wildfire son lesiones húmedas y necróticas de color castaño claro a negro, de 2 a 15 mm de tamaño o mayores y de forma

variable (Allington, 1945). Estas lesiones se rodean siempre por un ancho halo amarillo cualquiera sea la edad del síntoma (Atlas, 1965). El halo clorótico distingue al wildfire de otras enfermedades bacterianas de la soja (Allington, 1945; Atlas, 1965)

También suelen observarse manchas más restringidas, sin el halo amarillo y color desde el castaño oscuro al negro, en contraste con el castaño claro usual (Allington, 1945).

En condiciones ambientales húmedas, las lesiones se expanden y fusionan formando grandes áreas necrosadas en la hoja (Allington, 1945).

7.3.2. Dispersión y persistencia

La bacteria sobrevive en las semillas por más de dos años, siendo esta la fuente primaria de inóculo. La bacteria sobrevive también en restos vegetales, plantas invasoras u otros hospederos nativos, que sirven como fuente de inóculo primario. La diseminación de la bacteria a grandes distancias se debe a las semillas contaminadas y dentro del cultivo a la acción de la lluvia y el viento. Las pérdidas más severas ocurren en años de lluvias intensas asociadas a viento y temperaturas elevadas (Agrios, 1997).

Pst fue reaislada de semillas luego de un periodo de almacenamiento de hasta 6 meses después de la cosecha, pero no sobrevivió períodos más largos como por ejemplo 18 meses (Graham, 1953b), lo que indica que la bacteria puede ser transportada por la semilla. Graham (1953b) también estudió si pequeñas cantidades de inóculo en las semillas podrían ser suficientes para iniciar la enfermedad, encontrando que semillas infectadas generaron plantas enfermas y que la severidad sobre estas plantas se incrementó rápidamente. La dispersión dentro de los lotes infectados se produce a través de las lluvias y tormentas con viento (Graham, 1953b).

Graham (1953 a y b) y Chamberlain (1956b) obtuvieron mayores severidades de wildfire, cuando se inoculó Pst luego de o junto con Xag, estableciendo una asociación entre ambos patógenos.

Pst persistió durante 9 meses en suelo esterilizado a diferentes temperaturas y humedades, pero en suelo sin esterilizar no sobrevivió más de 2 meses a 25 ° C y con 17 % de humedad (Graham, 1953b).

7.3.3. Razas fisiológicas

No se han publicado trabajos que informen sobre la existencia de razas entre cepas de Pst patógenas sobre soja.

7.3.4. Pérdidas de rendimiento

Hwang y Lim (1992) no encontraron diferencias significativas en el rendimiento al realizar inoculaciones individuales de Pst. Por otro lado se desconoce la existencia de registros de las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad.

7.4. Otras bacteriosis de la soja

Dunleavy (1983) describe una enfermedad aparecida en cultivos de soja del estado de Iowa (EEUU) en 1975. Esta provoca clorosis en las hojas, que comienza en los márgenes y avanza hacia el interior o a veces en forma de manchas ovales, siendo estos los primeros síntomas macroscópicos observados en infecciones naturales. Luego de algunos días, el tejido clorótico se secó tornándose de un color tostado. Las áreas necróticas caen por efecto de vientos fuertes dando a la hoja un aspecto deshilachado.

A partir de los síntomas descritos en el párrafo anterior se aislaron colonias bacterianas cuyas características bioquímicas sugieren se trata de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv *flaccumfaciens* Hedges 1922) Collins & Jones 1983 (Cff) (Dunleavy, 1983). Estos aislamientos fueron patógenos sobre soja y poroto. El nombre que se propone para esa enfermedad fue el de “bacterial tan spot” Dunleavy (1983).

Maringoni y de Souza (2003) evaluaron el comportamiento de cultivares de soja a un aislamiento de Cff obtenido de poroto. Estos investigadores observaron una baja susceptibilidad en los 20 cultivares evaluados. Por su parte, Dunleavy (1983) observó que los aislamientos de soja eran patógenos en soja y poroto.

Las pérdidas de rendimiento debidas a Cff han sido variables, pudiendo alcanzar niveles importantes cuando la enfermedad ocurre sobre cultivares susceptibles. Dunleavy (1984) determinó un promedio de pérdidas de rendimiento de 12.5 % en el año 1979; de 0 % en 1980 y de 4.3 % en 1981.

Existen registros de otras bacterias que pueden afectar al cultivo de soja, pero la mayoría han sido evaluadas en condiciones de laboratorio y raramente se han encontrado causando enfermedades en la naturaleza (Hartman et al. 1999).

8. Cuantificación de enfermedades

Evaluar una enfermedad es esencial en estudios de disminución del rendimiento de los cultivos (Gaunt, 1987), en la caracterización de la resistencia de los cultivares y en epidemiología para la construcción de curvas de progreso de la enfermedad (Amorim, 1995). Estos estudios requieren métodos de cuantificación precisos, confiables y exactos que proporcionen resultados fácilmente reproducibles (Godoy, Koga and Canteri, 2006).

Para enfermedades foliares que producen manchas, la severidad o porcentaje de área de tejido cubierto por síntomas representa mejor la cantidad de enfermedad que la incidencia o porcentaje de plantas enfermas (Amorim, 1995).

Las escalas diagramáticas son representaciones ilustradas de una serie de plantas, hojas o partes de plantas con síntomas de una determinada enfermedad con diferentes niveles de severidad (Bergamin y Amorim, 1996) que se proponen de manera de reducir la subjetividad de las estimaciones visuales de severidad en diferentes patosistemas (James, 1971; Azevedo, 1998; Stonehouse, 1994; Andrade et al. 2005; Belasque et al. 2005) proveyendo así a los evaluadores con una serie de imágenes que son aceptadas como referencia real de la severidad pintada en cada diagrama (Nutter, Esker and Coelho Netto, 2006).

Para el cultivo de soja se dispone de escalas para evaluar el oidio (*Microsphaera diffusa* Cooke & Peck) (Mattiuzzi, 2003); enfermedades de fin de ciclo como la mancha marrón (*Septoria glycines* Hemmi) y el tizón de la hoja (*Cercospora kikuchii* (Matsu. & Tomoyasu) Gardner) (Martins et al. 2004), la roya asiática de la soja (*Phakopsora pachyrhizi* (Syd. & P. Syd.)) (Godoy et al. 2006; Ploper et al. 2006) y para el tizón bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea* Coerper) (Basu and Butler, 1986).

Godoy et al. (2006) consideran que en la elaboración de escalas deben examinarse algunos aspectos, como son, que los límites inferior y superior de la escala deben corresponder con el mínimo y máximo de severidad presentes en el campo; que la determinación de la intensidad actual de la enfermedad en el campo y su representación en la escala deben tener alta precisión y que la elección de los límites intermedios de la escala deben considerar las limitaciones definidas por la ley del estímulo visual de Weber y Fechner (Horsfall y Barrat, 1945). Esta ley que existe como tal solo en la literatura fitopatológica (Nutter y Schultz, 1995) manifiesta que “la exactitud visual es proporcional al logaritmo de la

intensidad del estímulo” es decir que el estímulo debe crecer exponencialmente para que la vista humana consiga diferenciarlos. Por ejemplo el ojo humano consigue diferenciar una severidad del 3 % de otra del 6 % pero no es capaz de separar una severidad del 25 % de una del 30 % (Amorim, 1995). Sin embargo, la ley del estímulo visual no es aplicable a todos los evaluadores, enfermedades y métodos propuestos para evaluar enfermedades (Nutter y Schultz, 1995).

Antes de presentar una escala como un método estándar para la cuantificación de una enfermedad, debe ser validada y en caso de producir resultados no satisfactorios se debe corregir (Martins et al. 2004; Godoy et al. 2006).

Las estimaciones de los parámetros de la ecuación de regresión, como la intersección (α) y la pendiente (β), pueden ser usados para evaluar y comparar la exactitud y precisión entre evaluadores (Nutter et al. 1993; Nutter y Schultz, 1995). Los parámetros estadísticos utilizados para este fin son: la pendiente y la intersección, el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de variación (CV) y el error estándar para las estimaciones de la variable dependiente (Y) (Nutter et al. 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

4. Identificación del organismo causal de las enfermedades

4.1. Recolección y acondicionamiento de las muestras

Durante las campañas 2005/2006 y 2006/2007, se recorrió en varias oportunidades, los lotes de soja de las EEA Reconquista y Balcarce, recolectando hojas con síntomas característicos de enfermedades bacterianas. Se registró la fecha de recolección y el cultivar; y se fotografiaron los síntomas típicos observados. En la campaña 2005/2006, también se tomaron muestras de diferentes cultivares de lotes comerciales del sudeste bonaerense que presentaban síntomas de bacteriosis.

De cada muestra se cortaron con un sacabocados, pequeños trozos del tejido lesionado y se desinfectaron superficialmente por inmersión en alcohol 70 % y posteriormente en solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante un minuto. Luego de eliminar el exceso de hipoclorito de sodio por lavado en agua destilada estéril, los trozos fueron transferidos asépticamente a tubos eppendorf con 1 ml de solución salina al 0.85 %. De esta forma las muestras correspondientes a la campaña 2005/2006 se guardaron en heladera hasta su utilización. Las muestras de la campaña 2006/2007 se sembraron en los medios de cultivo el mismo día de su recolección en el campo siguiendo los pasos descriptos.

4.2. Aislamiento y pruebas de patogenicidad

De cada muestra colectada, se maceró un trozo de tejido en un tubo eppendorf con 1 ml de solución salina estéril. Luego de un minuto de reposo la suspensión obtenida se sembró en estrías sobre placas de petri en diferentes medios de cultivo.

Los medios utilizados fueron: el medio King B (KB) diferencial para pseudomonas fluorescentes; el YDC para Xanthomonas (Schaad, 1988) y el medio YPGA. Se adicionó el antibiótico cefazolina al medio YPGA para inhibir el desarrollo de bacterias saprófitas (Samson com. pers) este medio permite el crecimiento de Pseudomonas. En todos los casos las cajas se incubaron en estufa a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C. (Ferreira y Salgado 1995; Schaad, 1988).

Cada aislamiento fue purificado realizando sucesivos estriados en los medios de cultivo mencionados. Para cada aislamiento se realizó la prueba de patogenicidad sobre los mismo cultivares de soja de los que fueron aislados.

Plantas de soja de cada cultivar desarrolladas en invernáculo y fueron inoculadas por infiltración o pulverización con una suspensión de solución fisiológica conteniendo 10^5 ufc ml^{-1} . Las plantas así inoculadas se colocaron en un ambiente controlado a 25 ± 2 °C durante 15 días registrando el tiempo de aparición de los síntomas. El ajuste de la concentración bacteriana se realizó mediante relación lineal entre la densidad óptica medida con espectrofotómetro (OD_{550}) y las ufc ml^{-1} obtenidas por conteo de siembra de diluciones serias en placas de petri.

4.3. Identificación y caracterización de aislamientos

Las cepas fluorescentes en KB, aisladas y purificadas se identificaron con pruebas bioquímicas siguiendo los lineamientos propuestos por Schaad (1988) (ver ANEXO) y se confirmó la identificación de Psg utilizando un kit EXPRESS™ específico para este organismo de NEOGEN® EUROPE Ltd, basado en la aglutinación de anticuerpos.

Para los aislamientos no fluorescentes se siguió un esquema básico (Figura 1) adaptado de Schaad (1988) a fin de identificar el género bacteriano. Las pruebas mencionadas en el esquema se listan en el Anexo.

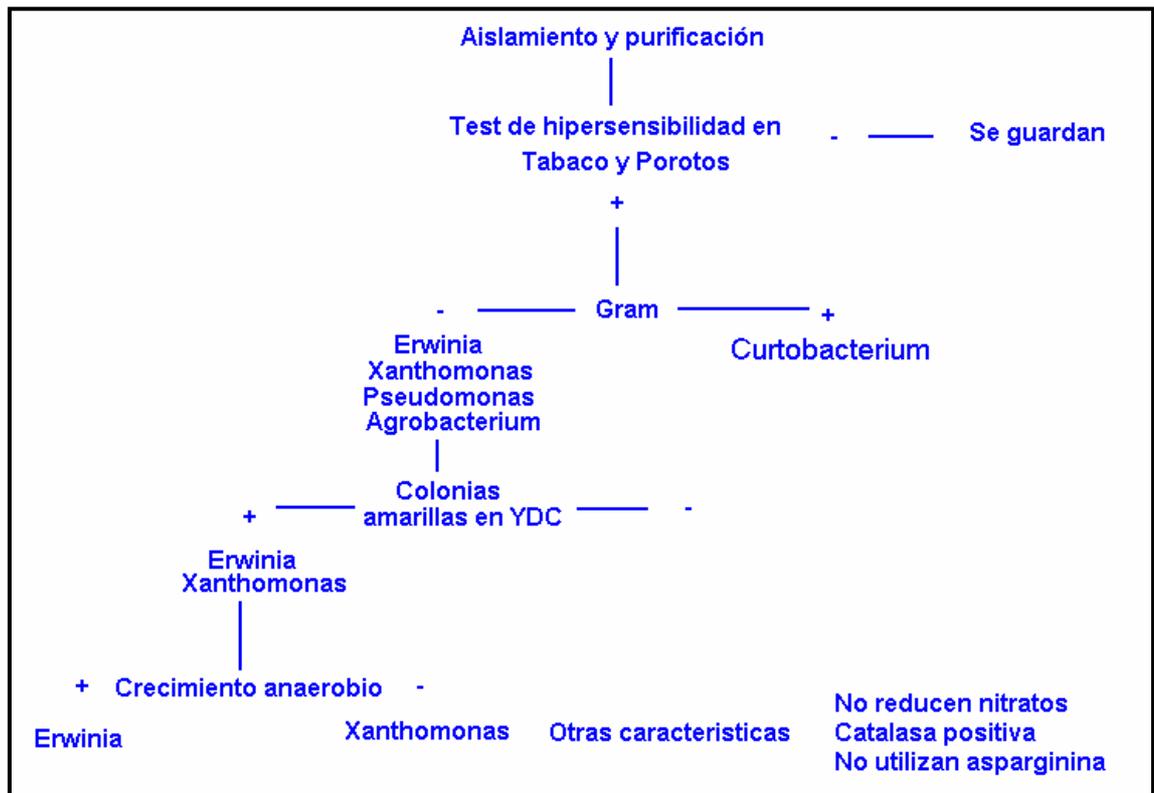


Figura 1: Esquema de identificación de géneros de bacterias fitopatógenas por pruebas bioquímicas sencillas. Adaptado de Schaad (1988)

5. Escala diagramática para cuantificación del tizón bacteriano

5.1. Elaboración de la escala

Durante la campaña 2005/2006 se recolectaron 162 folíolos de un lote de soja del cultivar DM 4800 RG en estado fenológico R5, que presentaban diferentes niveles de severidad de tizón bacteriano. En el laboratorio, los folíolos fueron digitalizados con un escáner ColorPage-HR7X Slim de Genius® a 200 dpi.

Luego de la digitalización, con un editor de imágenes, se procedió a rellenar las áreas de tejido faltantes. De esta forma fue posible medir la severidad real con el software ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (Lamari, 2002) y conocer el límite inferior y superior de severidad observados en el campo.

Además de los límites inferior y superior se determinaron matemáticamente tres niveles intermedios siguiendo la ley del estímulo visual de Weber y Fechner (Horsfall & Barrat, 1945).

Con los niveles de severidad definidos se representó 5 veces un folíolo patrón de superficie conocida. Sobre estos folíolos, comenzando con el nivel mínimo de severidad, se representaron los porcentajes a incrementos exponenciales de severidad para reproducir los síntomas observados en el campo estableciendo de esta forma la escala diagramática.

5.2. Validación de la escala diagramática

La validación de la escala se realizó colectando en el campo hojas de soja de los cultivares A3401, DM 4800 y DM 2000 que presentaban diferentes niveles de tizón bacteriano. Estas hojas fueron herborizadas y posteriormente se eligieron 30 folíolos de cada cultivar que se distribuyeron a cuatro evaluadores con experiencia previa en la evaluación de enfermedades foliares.

Los evaluadores estimaron la severidad de los folíolos sin utilizar la escala diagramática desarrollada, considerando como área enferma al tejido faltante, necrosado y/o clorótico. Posteriormente estimaron la severidad en base a la escala diagramática.

La severidad real de cada folíolo fue determinada con el software ASSESS previa digitalización y relleno de las áreas faltantes de cada uno.

La precisión y exactitud de las estimaciones visuales de cada evaluador fueron determinadas por medio del análisis de regresión lineal, considerando la severidad real como variable independiente y la severidad estimada como variable dependiente.

La precisión de las estimaciones fue evaluada por el coeficiente de determinación de la regresión (R^2) y por la variancia de los errores absolutos (severidad estimada menos severidad real).

La exactitud de cada evaluador fue determinada por medio de la comparación del coeficiente angular (pendiente) (b) y la ordenada al origen o intercepto de la recta (a) con los valores de 1 y 0 respectivamente por medio de la prueba de t de Student.

Además de la exactitud y la precisión, otro indicador de la eficiencia de una escala diagramática es la confiabilidad de las estimaciones entre los evaluadores que combinados en pares, puede ser utilizada como un indicador de la precisión del método, dado que, diferentes evaluadores utilizando la misma escala deben estimar los mismos valores de severidad para un mismo material (Nutter et al. 1993, Nutter and Schultz, 1995; Nutter et al. 2006).

Se realizaron todas las combinaciones posibles para las dos situaciones con y sin escala y nuevamente se realizaron las pruebas ya mencionadas para evaluar la confiabilidad de la escala.

En todos los casos los datos fueron procesados y analizados utilizando el programa Statistical Analysis System v.8e (SAS Institute, Cary, NC, USA, 1999).

6. Ensayo de campo para evaluación de pérdidas de rendimiento

En la Unidad Integrada Balcarce (EEA, INTA – FCA, UNMDP) se sembraron el 10/11/2005 los cultivares A 3401, de ciclo intermedio y DM 4800 considerado como de ciclo largo para esta zona.

Cada ensayo consistió de parcelas de 4 surcos, distanciados a 0,42 m por 6 m de largo, en un diseño completamente aleatorizado con siete tratamientos y cuatro

repeticiones. Los tratamientos fueron: T1: testigo sin inocular y con pulverización cada 10 días de oxiclورو de cobre y agrimicina, en dosis de 2 kg ha^{-1} y $0,5 \text{ kg ha}^{-1}$ respectivamente, con el propósito de mantener las plantas libres de enfermedades foliares; T2: Inoculación en el estadio fenológico R1; T3: Inoculación en R3; T4: inoculación en R5; T5: doble inoculación en R1 y R5; y T6: doble inoculación en R1 y R3. Por último T7: testigo sin control químico para que las bacteriosis se expresaran. La determinación de los estados fenológicos se realizó siguiendo la escala de Fehr et al. (1971).

En todos los casos la concentración de inóculo fue de 10^8 ufc ml^{-1} y para aumentar la eficiencia de la penetración, se provocaron heridas sobre las hojas pulverizando arena estéril tamizada con malla de $180 \mu\text{m}$ antes de la inoculación. La pulverización se realizó utilizando un pico arenador basado en un sistema de succión por venturi (Figura 2) conectado a un cilindro de CO_2 por su conexión A, la presión de trabajo se reguló y fijó en 60 psi. El extremo B constituye el caño de succión y es colocado en un recipiente conteniendo la arena a ser asperjada.



Figura 2: Pico arenador basado en la succión de un sistema venturi. Extremo A conectado a la fuente de presión (cilindro de CO_2) y el caño de succión (B) es introducido en un recipiente con arena.

6.1. Cálculo de severidad (S)

Para analizar la evolución de la severidad se cortaron cuatro plantas de los dos surcos laterales de cada parcela a intervalos de tiempo regulares. Las hojas enfermas de estas plantas se escanearon y editaron utilizando un software, para medir el área sana y enferma de cada hoja con el programa ASSESS, calculándose así la severidad en porcentaje.

6.2. Estimación del área foliar (AF) de cada planta y cálculo del índice de área foliar (IAF)

Durante el primer muestreo se escanearon todas las hojas y se midió, con una regla graduada, el ancho máximo del folíolo central de cada una. En los sucesivos muestreos sólo se escanearon las hojas afectadas por el tizón bacteriano y sobre las hojas sanas se registró el ancho máximo del folíolo central.

Posteriormente con las imágenes de las hojas sanas del primer muestreo y la utilización del programa ASSESS se midió el área foliar real.

Mediante análisis de regresión lineal se probaron los modelos lineal, cuadrático y cúbico, donde el área foliar real es la variable dependiente y el ancho máximo del folíolo central es la variable independiente. Se ajustó un modelo polinómico de orden tres con el programa Statistical Analysis System v.8e (SAS Institute, Cary, NC, USA, 1999). Con la ecuación obtenida en el modelo de mejor ajuste se calculó el AF de cada planta en los sucesivos muestreos.

El IAF fue calculado multiplicado la media aritmética de los cuatro valores de AF estimados en cada parcela por la densidad de plantas a cosecha.

6.3. Cálculo de la duración del área foliar sana (DAFS) y la absorción del área foliar sana (AAFS)

Con los valores de IAF y S, se calculó la variable DAFS utilizando la ecuación propuesta por Waggoner y Berger (1987):

$$DAFS = \sum_{i=1}^{n-1} \{ [IAF_i(1 - S_i) + IAF_{i+1}(1 - S_{i+1})] / 2 \} (t_{i+1} - t_i)$$

donde DAFS es expresada en días, S es la severidad expresada como proporción, IAF es el índice de área foliar sin dimensiones, t es el tiempo expresado en días y n es el número de muestreos realizados.

La llamada absorción del área foliar sana (AAFS) expresada en MJ m⁻², considera en la ecuación la cantidad de radiación interceptada por las hojas sanas. Waggoner y Berger (1987) propusieron la siguiente ecuación:

$$AAFS = \sum_{i=1}^{n-1} I [(1 - S_i)(1 - \exp(-k IAF_i)) + (1 - S_{i+1})(1 - \exp(-k IAF_{i+1}))] / 2 (t_{i+1} - t_i)$$

donde I es la radiación global (MJ m⁻² día⁻¹), S es la severidad de la enfermedad expresada como proporción, k es el coeficiente de extinción del cultivo (sin dimensiones), IAF es el índice de área foliar (sin dimensiones), t es el tiempo (días) y n es el número de muestreos realizados.

La radiación global se obtuvo de las mediciones diarias del observatorio agrometeorológico de la Unidad Integrada Balcarce.

Se utilizó un valor de 0.44 para el coeficiente k hallado por Haile et al. (1998) para un cultivar trifoliado y de hoja ancha.

6.4. Cálculo del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCP)

El ABCP fue calculado utilizando el método de integración trapezoidal mediante la ecuación:

$$ABCP = \sum_{i=1}^{n-1} [(S_i + S_{i+1}) / 2] (t_{i+1} - t_i)$$

donde S es la severidad promedio de cada parcela expresado en porcentaje, t es el tiempo expresado en días y n es el número de muestreos realizados.

6.5. Determinación del rendimiento y estimación de la función de daño

Al final del ciclo del cultivo se cosecharon los dos surcos centrales de cada parcela, expresándose el rendimiento en kg ha⁻¹ a la humedad de recibo.

Con los datos de las variables calculadas y el rendimiento de cada tratamiento se realizó un análisis de la varianza y la comparación de las medias de tratamiento por la prueba de Tukey.

La asociación de las diferentes variables con el rendimiento se comprobó con un análisis de correlación lineal de Pearson.

La función de daño se estimó mediante análisis de regresión lineal con el rendimiento es la variable dependiente y como variables independientes se utilizó el ABCP, DAFS y AAFS.

Todos los análisis se realizaron con el programa Statistical Analysis System v.8e (SAS Institute, Cary, NC, USA, 1999)

RESULTADOS

1. Identificación del organismo causal

Durante las campañas 2005/2006 y 2006/2007 se recolectaron en total 60 muestras de hojas de soja de diferentes lotes del sudeste bonaerense y 40 provenientes de los lotes de producción de la EEA Reconquista haciendo un total de 100 muestras, de las cuales solo una presentó síntomas típicos de pústula bacteriana (Figura 3).

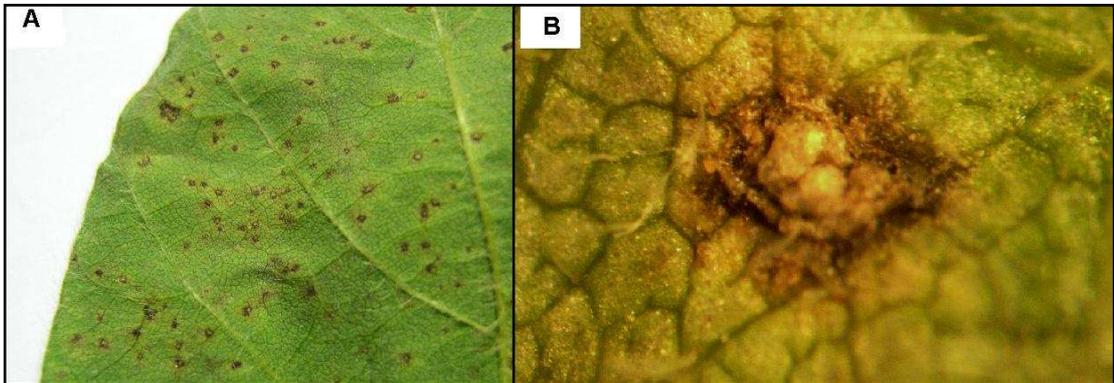


Figura 3: A) Síntomas de pústula bacteriana sobre el cultivar DM 3200 recolectado en un lote de la localidad de Gral. Madariaga (Bs. As.). B) Detalle de una pústula (60x).

El resto de las muestras presentó los síntomas típicos de tizón bacteriano con distintos grados de severidad y con mayor o menor desarrollo de halo clorótico (Figura 4) y no se observaron síntomas diferentes a los ya descriptos para algunas de las enfermedades bacterianas de la soja.

Los intentos en aislar al agente causal a partir de los síntomas observados resultaron infructuosos durante la campaña 2005/2006. Según la bibliografía la pústula bacteriana es causada por *Xanthomonas axonopodis* pv *glycines* y el tizón bacteriano por *Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea* pero estas bacterias no fueron detectadas en los más de mil aislamientos realizados.

Un tipo de colonia convexa, amarilla y de bordes lisos se presentó frecuentemente y en una alta concentración. Diecinueve de estos aislamientos, provenientes de

diferentes cultivares y localidades, causaron reacciones de hipersensibilidad al ser inoculados por inyección en hojas de tabaco y de porotos, indicando una interacción bacteria-planta incompatible y por lo tanto la presencia de un aislamiento fitopatógeno. Salvo que se indique lo contrario, todas las inoculaciones se efectuaron a una concentración de 10^5 ufc ml^{-1}

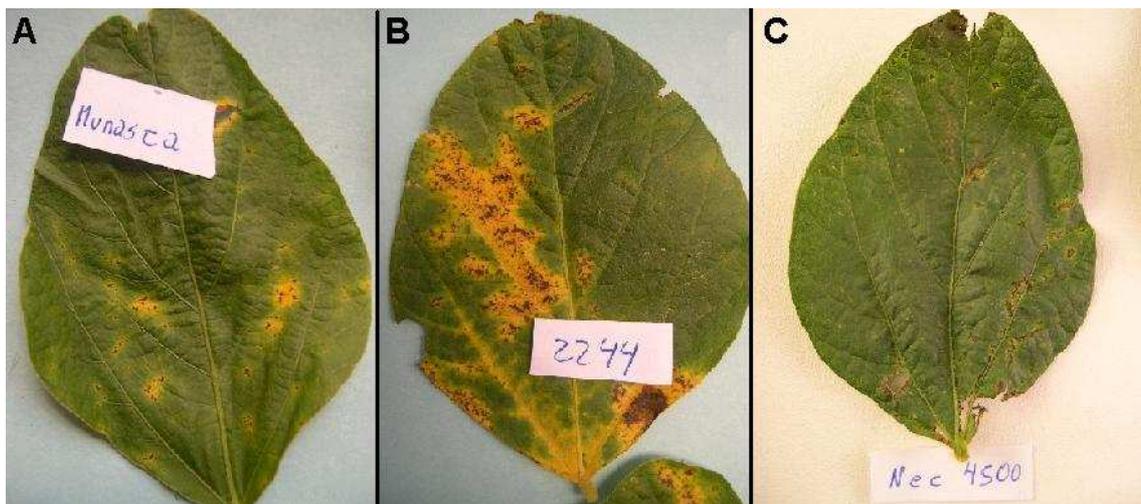


Figura 4: Síntomas de tizón bacteriano A) con presencia de halo clorótico sobre el cv Munasca proveniente de la EEA Reconquista. B) con amplio halo clorótico sobre el cv Pampeana 540 proveniente de la EEA Reconquista. C) Leve halo clorótico sobre el cv DM 4500 proveniente de la localidad de Necochea (Bs. As.).

Las principales características, así como los cultivares y localidades de procedencia se presentan en la Tabla 1.

Las inoculaciones de estos aislamientos en plantas de soja, en algunos casos no causaron síntomas y en otros causaron leves clorosis a severas necrosis (Figura 5).

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas y el esquema básico de identificación de géneros propuesto, permiten ubicar a estos aislamientos en el género *Pantoea* (= *Erwinia*). No se determinó la especie a la cual pertenecen los aislamientos.

Durante la campaña 2006/2007 solamente se encontraron síntomas similares al tizón bacteriano causado por *Psg*. Los intentos de aislar esta bacteria resultaron infructuosos hasta que se observó que al dejar las cajas sembradas sobre la mesada del laboratorio, había crecimiento de bacterias fluorescentes en el medio KB.

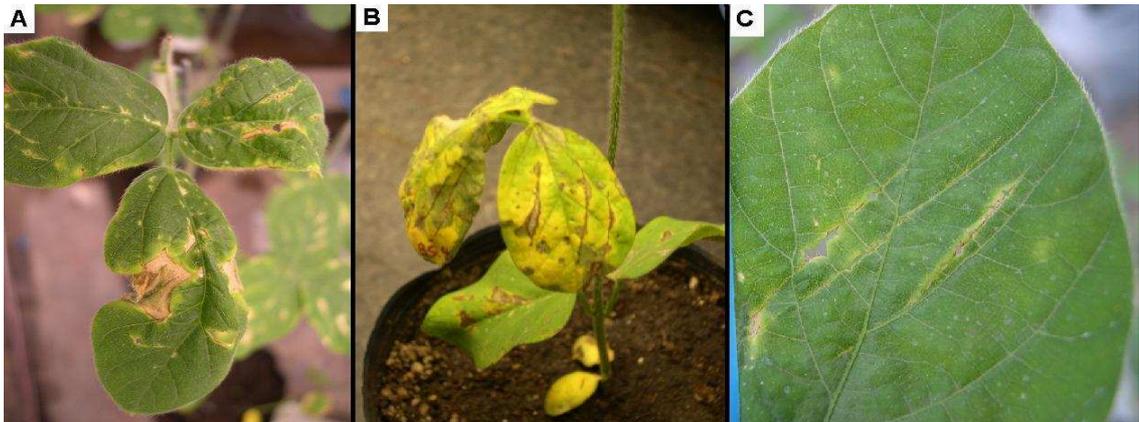


Figura 5: Síntomas desarrollados luego de inocular plantas del cv DM 4800 con heridas en sus hojas: A) aislamiento 56.2, diez días desde la inoculación B) aislamiento 85.4, trece días desde la inoculación C) Aislamiento 87.2, quince días desde la inoculación.

Luego de este acontecimiento se bajó la temperatura de la estufa de cultivo de 28 ± 2 °C a 22 ± 2 °C lográndose así obtener 29 aislamientos de bacterias fluorescentes fitopatógenas.

Las principales características bioquímicas, así como el número de aislamiento, cultivar y lugar de procedencia se resumen en la Tabla 2. Las características bioquímicas principales se complementaron con las pruebas LOPAT y con una prueba de aglutinación de anticuerpos (ver anexo) para confirmar la identidad de los aislamientos. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3.

El resultado positivo en la prueba de aglutinación y los resultados de las pruebas bioquímicas permiten ubicar taxonómicamente a los aislamientos: 111.1; 111.2; 111.3; 111.4; 111.5; 111.6; 112.1; 112.2; 112.4; 112.5; 115.1; 115.2; 116.1; 116.2; 116.3, 118.1 y 122.1 como *Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea*. Estos son gram negativos, fluorescentes en KB, levano positivo, oxidasa y arginina dihidrolasa negativos, no producen protopectinasas e inducen reacciones hipersensibles en plantas de tabaco dentro de las 24 h de inoculadas. Estas características concordaron con lo descrito previamente por Lelliot et al. (1966) y Schaad (1988) para esta especie y confirmando

estos resultados ellos dan reacciones de aglutinación positiva con el kit EXPRESS™ específico para Psg

Estos 17 aislamientos reprodujeron los síntomas típicos del tizón bacteriano al ser inoculados en plantas de soja (Figura 6) y los nuevos aislamientos obtenidos concordaron en sus características bioquímicas con el organismo inoculado.

Los aislamientos 114.0 y 117.1 no produjeron levano y fueron negativos en la prueba de aglutinación.

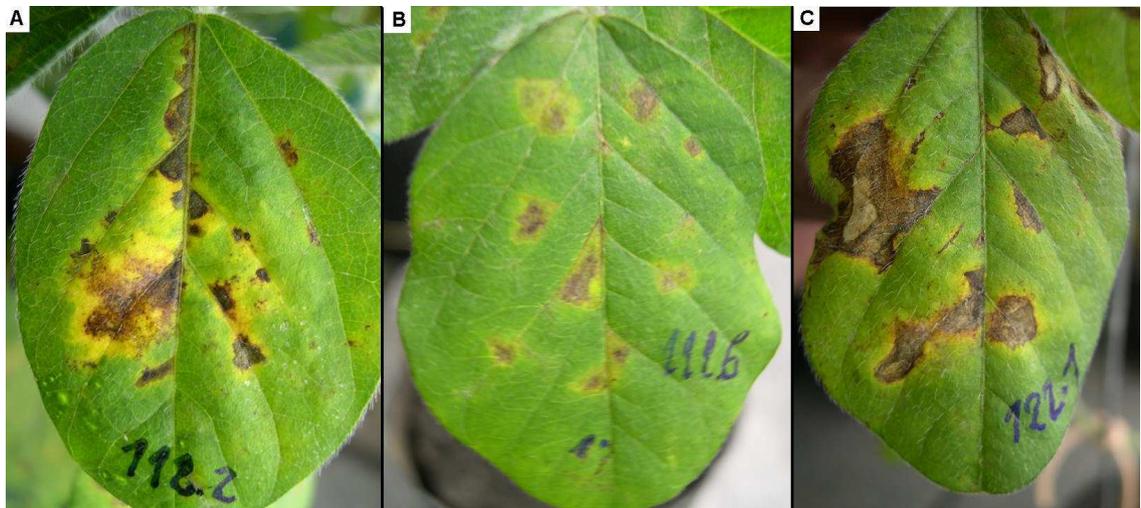


Figura 6: Síntomas desarrollados luego de inocular por infiltración: A) aislamiento 112.2, catorce días desde la inoculación en cv DM4870 B) aislamiento 111.6 doce días desde la inoculación en DM4200 C) Aislamiento 121.1 doce días desde la inoculación en DM4870.

Los aislamientos 112.3, 113.1, 113.2, 113.3, 113.5, 113.6, 113.7, 115.3, 120.1 y 121.1 fueron negativos en la prueba de aglutinación. Sobre la base de estos resultados ninguno de estos aislamientos pudo ser clasificado como Psg. No obstante todos ellos produjeron reacciones de hipersensibilidad en plantas de tabaco y reprodujeron los síntomas típicos del tizón bacteriano al ser inoculados por infiltración en hojas de soja. De los síntomas desarrollados se obtuvieron aislamientos que concuerdan con las características del aislamiento infiltrado.

Tabla 1: Características bioquímicas de 19 aislamientos obtenidos durante la campaña 2005/2006 en las dos zonas de estudio.

N° de aislamiento	Cultivar hospedante	Procedencia	Gram	Color de la colonia en YDC	Crecimiento en anaerobiosis	Hipersensibilidad en			Síntomas en hojas de soja
						Tabaco cv		Poroto	
						Xanthi	Sansung		
6.3	Munasca	EEA Reconquista	-	Amarillo	+	+	+	+	Leve clorosis
7.1	A 4910	EEA Reconquista	-	Amarillo	+	+	+	+	Sin síntomas
9.5	N. Maria 55	EEA Reconquista	-	Amarillo	+	+	+	+	Sin síntomas
14.1	RAR 516	EEA Reconquista	-	Amarillo	+	-	-	+	Leve clorosis
14.2	RAR 516	EEA Reconquista	-	Amarillo	+	-	-	+	Leve clorosis
26.6	DM 4500	Necochea	-	Amarillo	+	+	+	+	Leve clorosis
56.2	DM 4800	Pirovano	-	Amarillo	+	+	+	+	Necrosis
81.1	A 8010	EEA Reconquista	-	Amarillo	+	+	+	+	Leve clorosis
81.2	A 8010	EEA Reconquista	-	Amarillo	+	-	-	+	Leve clorosis
81.4	A 8010	EEA Reconquista	-	Amarillo	+	-	-	+	Leve clorosis
81.5	A 8010	EEA Reconquista	-	Amarillo	+	-	-	+	Leve clorosis
83.1	DM 4800	EEA Balcarce	-	Amarillo	+	+	+	+	Sin síntomas
84.1	DM 4800	EEA Balcarce	-	Amarillo	+	+	+	+	Sin síntomas
84.3	DM 4800	EEA Balcarce	-	Amarillo	+	+	+	+	Sin síntomas
85.4	DM 4800	EEA Balcarce	-	Amarillo	+	+	+	+	Necrosis con clorosis
87.2	DM 4800	EEA Balcarce	-	Amarillo	+	+	+	+	Leve clorosis
92.3	DM 4800	EEA Balcarce	-	Amarillo	+	+	+	-	Necrosis
100.1	DM 4800	EEA Balcarce	-	Amarillo	+	+	+	+	Necrosis con leve clorosis
100.4	DM 4800	EEA Balcarce	-	Amarillo	+	-	-	+	Sin síntomas

Tabla 2: Características bioquímicas de 29 aislamientos fitopatógenos obtenidos durante la campaña 2006/2007 en las dos zonas de estudio.

Nº de aislamiento	Cultivar hospedante	Procedencia	Gram	Fluorescencia en KB	Catalasa	Crecimiento en anaerobiosis
111.1	DM 3100	EEA Balcarce	-	+	+	-
111.2	DM 3100	EEA Balcarce	-	+	+	-
111.3	DM 3100	EEA Balcarce	-	+	+	-
111.4	DM 3100	EEA Balcarce	-	+	+	-
111.5	DM 3100	EEA Balcarce	-	+	+	-
111.6	DM 3100	EEA Balcarce	-	+	+	-
112.1	DM 4200	EEA Balcarce	-	+	+	-
112.2	DM 4200	EEA Balcarce	-	+	+	-
112.3	DM 4200	EEA Balcarce	-	+	+	-
112.4	DM 4200	EEA Balcarce	-	+	+	-
112.5	DM 4200	EEA Balcarce	-	+	+	-
113.1	DM 3700	EEA Balcarce	-	+	+	-
113.2	DM 3700	EEA Balcarce	-	+	+	-
113.3	DM 3700	EEA Balcarce	-	+	+	-
113.5	DM 3700	EEA Balcarce	-	+	+	-
113.6	DM 3700	EEA Balcarce	-	+	+	-
113.7	DM 3700	EEA Balcarce	-	+	+	-
114.0	A3933	Huanguelen	-	+	+	-
115.1	A 8000	EEA Reconquista	-	+	+	-

Tabla 2 (Continuación): Características bioquímicas de 29 aislamientos fitopatógenos obtenidos durante la campaña 2006/2007 en las dos zonas de estudio.

Nº de aislamiento	Cultivar hospedante	Procedencia	Gram	Fluorescencia en KB	Catalasa	Crecimiento en anaerobiosis
115.2	A 8000	EEA Reconquista	-	+	+	-
115.3	A 8000	EEA Reconquista	-	+	+	-
116.1	A 7636	EEA Reconquista	-	+	+	-
116.2	A 7636	EEA Reconquista	-	+	+	-
116.3	A 7636	EEA Reconquista	-	+	+	-
117.1	DM 4600	EEA Reconquista	-	+	+	-
118.1	DM 4600	EEA Balcarce	-	+	+	-
120.1	DM 2200	EEA Balcarce	-	+	+	-
121.1	DM 4870	EEA Balcarce	-	+	+	-
122.1	DM 4800	EEA Reconquista	-	+	+	-

Tabla 3: Características bioquímicas complementarias para los 29 aislamientos obtenidos durante la campaña 2006/2007 en las dos zonas de estudio.

N° de aislamiento	Levano	Citocromo oxidasa	Pudrición de rodajas de papa	Arginina dihidrolasa	Hipersensibilidad en Tabaco		kit EXPRESS™ para Psg	Síntomas en hojas de soja
					Xanthi	Samsung		
111.1	+	-	-	-	+	+	+	+
111.2	+	-	-	-	+	+	+	+
111.3	+	-	-	-	+	+	+	+
111.4	+	-	-	-	+	+	+	+
111.5	+	-	-	-	+	+	+	+
111.6	+	-	-	-	+	+	+	+
112.1	+	-	-	-	+	+	+	+
112.2	+	-	-	-	+	+	+	+
112.3	+	-	-	-	+	+	-	+
112.4	+	-	-	-	+	+	+	+
112.5	+	-	-	-	+	+	+	+
113.1	+	-	-	-	+	+	-	+
113.2	+	-	-	-	+	+	-	+
113.3	+	-	-	-	+	+	-	+
113.5	+	-	-	-	+	+	-	+
113.6	+	-	-	-	+	+	-	+
113.7	+	-	-	-	+	+	-	+
114.0	-	-	-	-	+	+	-	+
115.1	+	-	-	-	+	+	+	+

Tabla 3 (continuación): Características bioquímicas complementarias para los 29 aislamientos obtenidos durante la campaña 2006/2007 en las dos zonas de estudio.

Nº de aislamiento	Levano	Citocromo oxidasa	Pudrición de rodajas de papa	Arginina dihidrolasa	Hipersensibilidad en Tabaco		kit EXPRESS™ para Psg	Síntomas en hojas de soja
					Xanthi	Samsung		
115.2	+	-	-	-	+	+	+	+
115.3	+	-	-	-	+	+	-	+
116.1	+	-	-	-	+	+	+	+a
116.2	+	-	-	-	+	+	+	+a
116.3	+	-	-	-	+	+	+	+a
117.1	-	-	-	-	+	+	-	+
118.1	+	-	-	-	+	+	+	+b
120.1	+	-	-	-	+	+	-	+b
121.1	+	-	-	-	+	+	-	+
122.1	+	-	-	-	+	+	+	+

a: síntomas leves de desarrollo lento.

b: necrosis en el sitio de inoculación.

2. Escala diagramática para cuantificación del tizón bacteriano

2.1. Elaboración de la escala

Se procesaron 162 imágenes a partir de hojas colectadas de un lote de soja del cultivar DM 4800, se midió la superficie y la severidad de cada hoja con el programa ASSESS. Se determinó el nivel inferior y el superior de severidad detectable en el campo que resultó de 0,07 % y 53,07 % por folíolo, respectivamente.

El 50 % de los datos se ubicó en el rango de severidad de 0,07 % a 5,30 %, mientras que un 8,75 % de los datos se ubicó en el rango de 31,8 % a 53,07 %.

La escala se constituyó con los valores de severidad de 2, 8, 16, 27 y 52 % representados en un folíolo patrón, que incluyen el área faltante, necrosada y/o clorótica (Figura 7).

Valores de severidad inferiores al 2 % no se incluyeron por cuanto el ojo humano difícilmente pueda diferenciarlos, considerando las limitaciones de la ley de estímulo visual de Weber y Fechner (Horsfall & Barrat, 1945). Hojas con valores de severidad superiores al 53 % no persisten en el campo a causa del daño efectuado a los tejidos por la bacteria, por lo que tampoco se incluyeron.

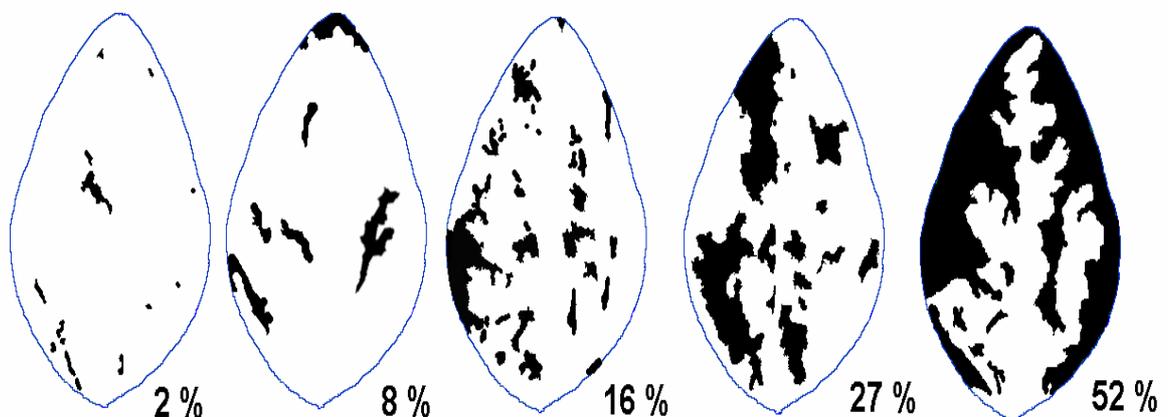


Figura 7: Escala diagramática para cuantificación del tizón bacteriano de la soja (*Glycine max* (L.) Merrill) causado por *Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea* elaborada del análisis de 162 folíolos de soja. Los niveles se eligieron considerando las limitaciones de la ley de estímulo visual de Weber y Fechner.

2.2. Validación de la escala diagramática

La escala se validó con 4 evaluadores experimentados, a quienes se solicitó estimaran la severidad de 90 folíolos de tres cultivares (30 folíolos por cultivar) sin utilizar la escala. Posteriormente se distribuyó la escala y se solicitó que estimaran nuevamente las severidades utilizando la escala como referencia visual.

Con los datos de las estimaciones de cada evaluador sin utilizar la escala (Figura 8) y utilizando la escala (Figuras 9), se calcularon los coeficientes de la ecuación de regresión lineal. Previamente cada folíolo fue escaneado y sobre la imagen se rellenaron las partes faltantes con un editor, para luego medir la severidad real con el programa ASSESS.

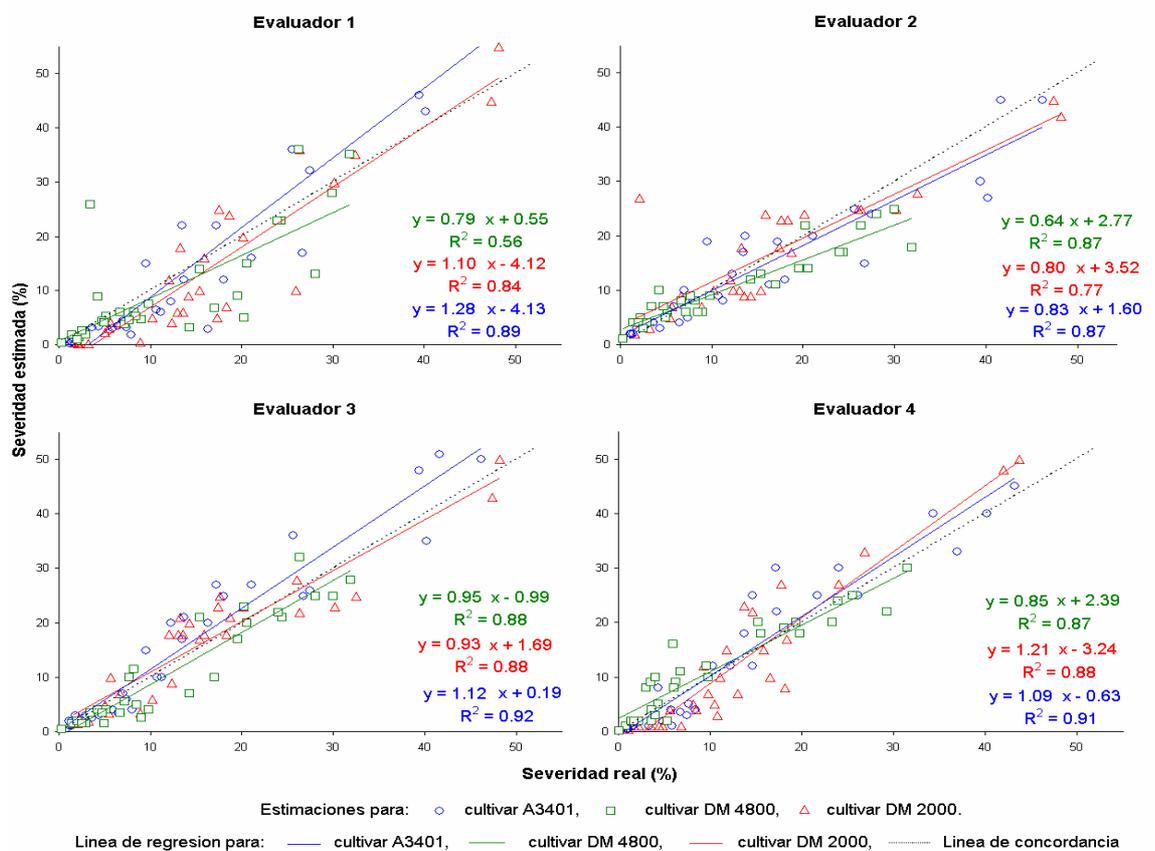


Figura 8: Regresiones lineales entre la severidad estimada por los evaluadores sin utilizar la escala y la severidad real de los folíolos para los cultivares DM 3401 (○), DM 2000 (△), DM 4800 (□). Se presentan las ecuaciones estimadas por el modelo de regresión lineal y los R² obtenidos en cada uno.

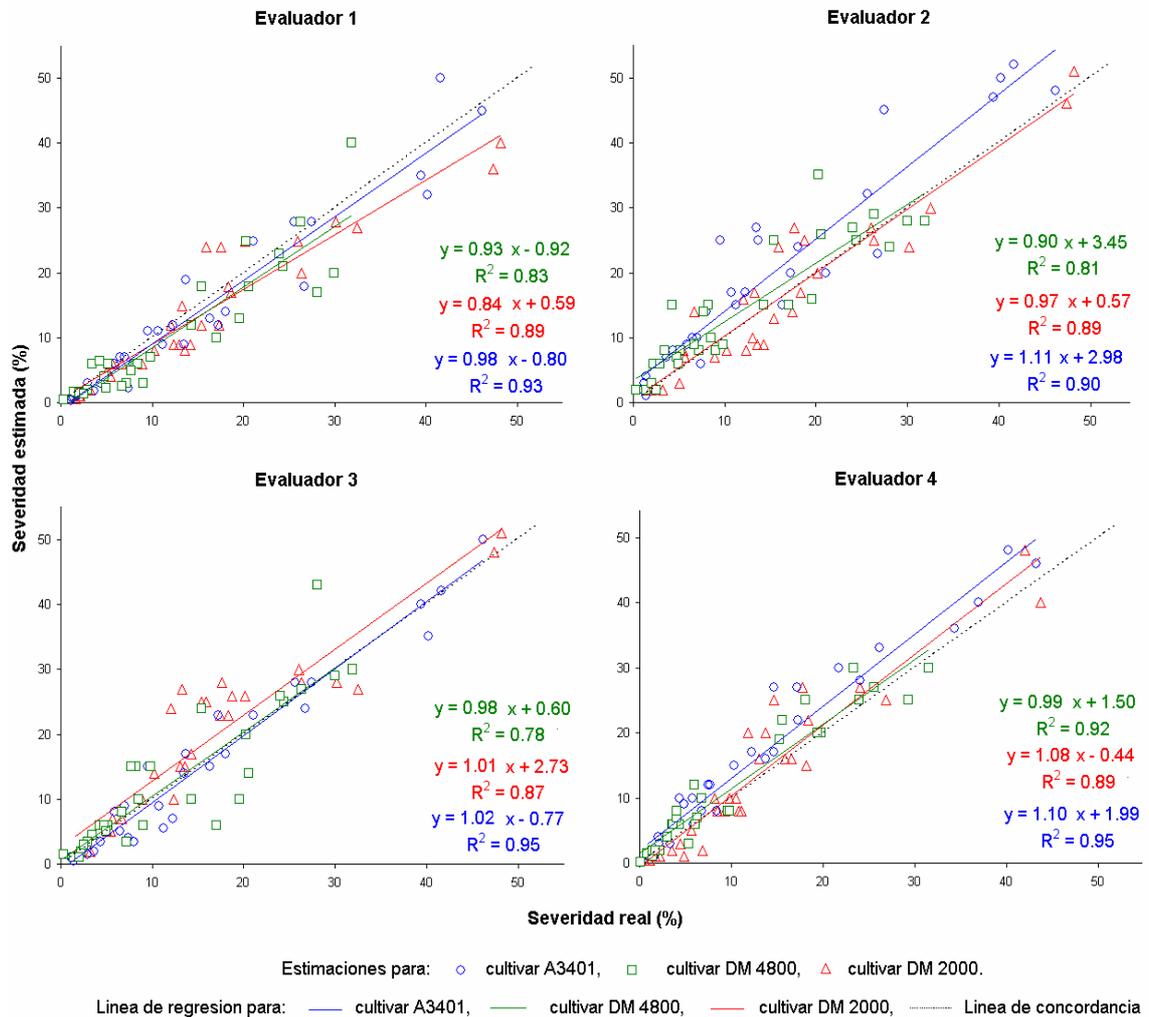


Figura 9: Regresiones lineales entre la severidad estimada por los evaluadores utilizando la escala y la severidad real de los folíolos para los cultivares DM 3401 (○), DM 2000 (△), DM 4800 (□). Se presentan las ecuaciones estimadas por el modelo de regresión lineal y los R^2 obtenidos en cada uno.

Los estimadores del intercepto (a) y la pendiente (b) así como también los coeficientes de determinación (R^2) son indicadores de la exactitud de los evaluadores. En la Tabla 4 se resumen las estimaciones de estos coeficientes y los resultados de las pruebas de t realizadas a cada coeficiente.

Tabla 4: Coeficientes de la ecuación de regresión, intercepto (a), pendiente (b) y coeficientes de determinación (R^2) calculados considerando como variable independiente la severidad real de cada folíolo y como variable dependiente la estimación de cada evaluador. Agrupados por evaluadores sin la escala (1 a 4) y con la escala (1 a 4) y por cultivares. Un intercepto (a) seguido de * es significativamente diferente de cero ($\alpha = 0.01$) y una pendiente (b) seguido de * es significativamente diferente de uno ($\alpha = 0.01$).

Cultivar	Coef.	Evaluadores							
		Sin la escala				Con la escala			
		1	2	3	4	1	2	3	4
DM 4800	a	0.55	2.77*	-0.99	2.39*	-0.92	3.45	0.60	1.50
	b	0.79	0.64*	0.95	0.85	0.93	0.90	0.98	0.99
	R^2	0.56	0.87	0.88	0.87	0.83	0.81	0.78	0.92
DM 2000	a	-4.12	3.52	1.69	-3.24	0.59	0.57	2.73	-0.44
	b	1.10	0.80	0.93	1.21	0.84*	0.97	1.01	1.08
	R^2	0.84	0.77	0.88	0.88	0.89	0.89	0.87	0.89
A 3401	a	-4.13	-1.60	0.18	-0.63	-0.80	2.97	-0.77	1.99
	b	1.28*	0.83*	1.12	1.09	0.98	1.11	1.02	1.10
	R^2	0.89	0.87	0.92	0.91	0.93	0.90	0.95	0.95

La distribución de los errores absolutos permite evaluar el grado de precisión de los evaluadores y la existencia de tendencias en la distribución de la variancia de los errores. Al no utilizar la escala, algunos evaluadores superaron el 20 % de error absoluto, mientras que al utilizar la escala los evaluadores presentaron errores absolutos que no sobrepasaron el 15 %, salvo en las estimaciones del evaluador 2 para el cultivar A3401 que presenta valores de hasta 17 % (Figura 11).

La distribución de los errores absolutos se presenta en las figura 10 y 11 para los evaluadores sin la escala y con la escala respectivamente

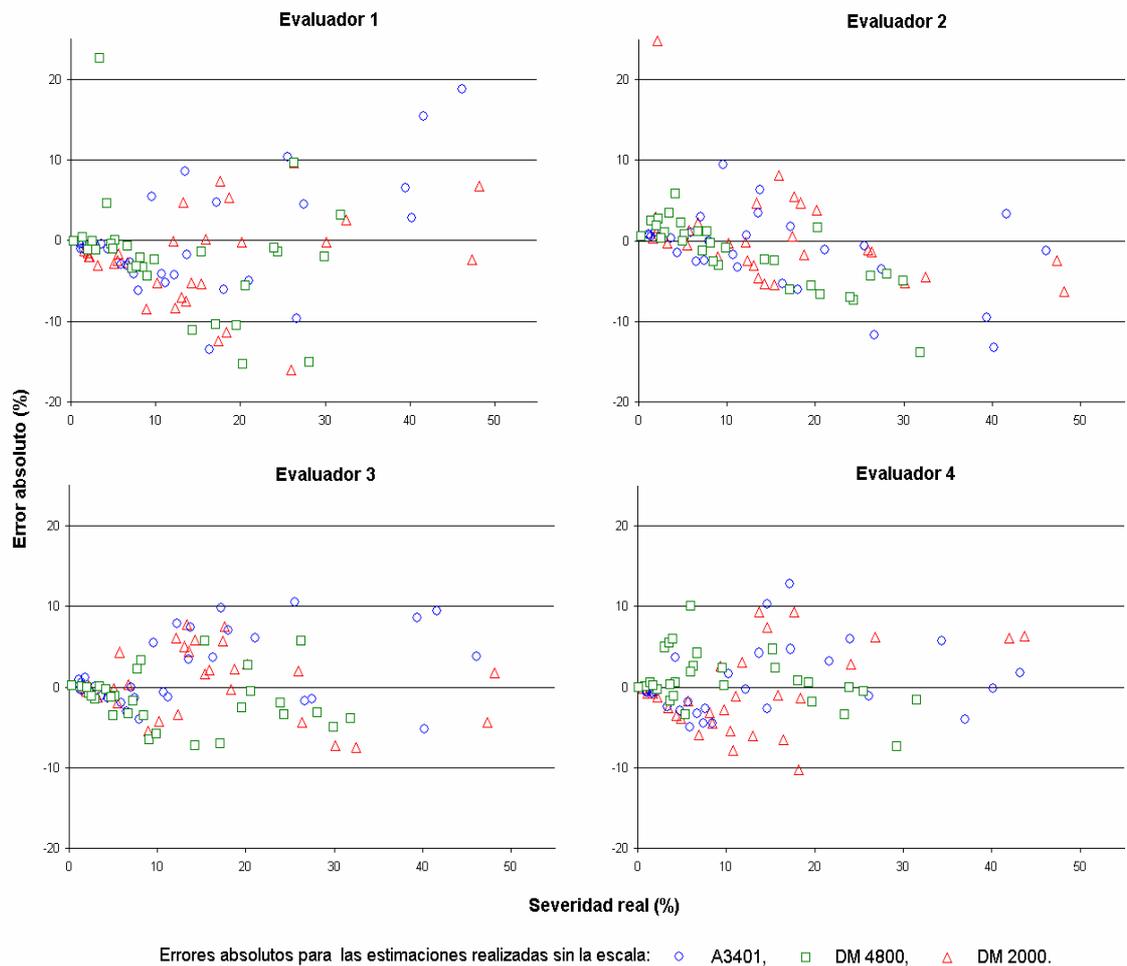


Figura 10: Distribución de errores absolutos entre severidad real y los valores estimados por cada evaluador para cultivar A 3401 (○), DM 4800 (□) y DM 2000 (△) sin utilizar la escala.

Dos evaluadores que estiman la severidad de las mismas hojas utilizando la escala deberían obtener valores similares. Esto se conoce como confiabilidad de escala y se evalúa realizando todas las combinaciones posibles de evaluadores.

En la mayoría de los casos al no tener una referencia visual, las combinaciones de diferentes evaluadores para un mismo material se aleja de la situación ideal (intercepto igual a cero y pendiente uno) y presentan coeficientes de determinación en un rango de 0.49 a 0.94 (Tabla 5).

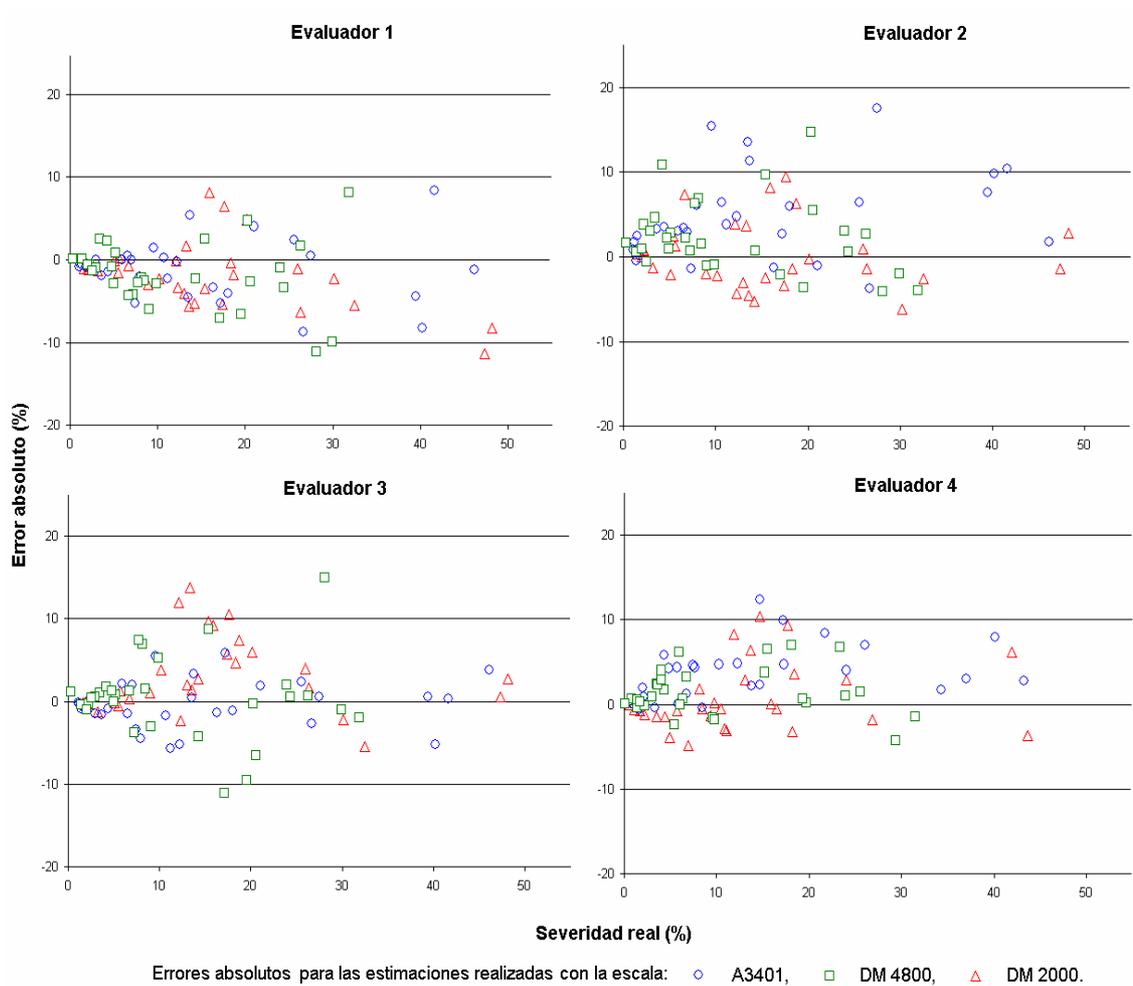


Figura 11: Distribución de errores absolutos entre severidad real y los valores estimados por cada evaluador para cada cultivar A 3401 (○), DM 4800 (□) y DM 2000 (△) cuando utilizan la escala como referencia visual.

Cuando se compararon las estimaciones de todos los evaluadores combinados al utilizar la escala como referencia visual se obtienen mejores coeficientes de determinación (0.66 a 0.94) y las estimaciones de los coeficientes no difieren de la situación ideal ($\alpha = 0.01$), salvo dos situaciones para el evaluador 1 y 2, donde el intercepto difiere de cero (Tabla 6).

Tabla 5: Coeficientes de la ecuación de regresión, intercepto (a), pendiente (b) y coeficientes de determinación (R^2) calculados combinando las estimaciones de dos evaluadores cuando no utilizaron la escala como ayuda visual. Los datos se presentan agrupados por combinación de evaluadores (x/y) y por cultivares. Un intercepto (a) seguido de * es significativamente diferente de cero ($\alpha = 0.01$) y una pendiente (b) seguido de * es significativamente diferente de uno ($\alpha = 0.01$).

Cultivar	Coef.	Combinaciones de las estimaciones realizadas sin la escala					
		Ev1/Ev2	Ev1/Ev3	Ev1/Ev4	Ev2/Ev3	Ev2/Ev4	Ev3/Ev4
DM 4800	a	5.89*	3.03	4.55*	-3.94*	-1.25	2.30*
	b	0.45*	0.74	0.64*	1.37*	1.17	0.83*
	R^2	0.49	0.59	0.59	0.86	0.82	0.90
DM 2000	a	7.65*	6.76*	1.18	1.60	-5.10	-4.41
	b	0.64*	0.71*	0.82	0.90	1.06	1.01
	R^2	0.70	0.76	0.77	0.70	0.75	0.79
A 3401	a	4.50*	4.86*	2.84	-0.53	-1.70	-1.45
	b	0.63*	0.80*	0.72*	1.24*	1.10	0.89
	R^2	0.92	0.87	0.83	0.90	0.83	0.94

Tabla 6: Coeficientes de la ecuación de regresión, intercepto (a), pendiente (b) y coeficientes de determinación (R^2) calculados combinando las estimaciones de dos evaluadores cuando utilizan la escala como ayuda visual. Los datos se presentan agrupados por combinación de evaluadores (x/y) y por cultivares. Un intercepto (a) seguido de * es significativamente diferente de cero ($\alpha = 0.01$) y una pendiente (b) seguido de * es significativamente diferente de uno ($\alpha = 0.01$).

Cultivar	Coef.	Combinaciones de las estimaciones realizadas con la escala					
		Ev1/Ev2	Ev1/Ev3	Ev1/Ev4	Ev2/Ev3	Ev2/Ev4	Ev3/Ev4
DM 4800	a	5.08*	3.29	2.35	-1.02	-1.55	1.41
	b	0.89	0.89	0.89	0.94	0.91	0.81
	R^2	0.83	0.66	0.82	0.71	0.83	0.81
DM 2000	a	0.54	2.76	-1.37	2.83	-1.38	-2.86
	b	1.10	1.14	1.06	0.99	0.92	0.87
	R^2	0.92	0.89	0.89	0.89	0.90	0.87
A 3401	a	4.59*	0.77	2.63	-1.98	-0.08	2.20
	b	1.08	0.99	1.00	0.84	0.84	0.98
	R^2	0.88	0.93	0.92	0.88	0.87	0.94

3. Cálculo de la función de daño para el tizón bacteriano

Para estimar el área foliar de cada hoja en los distintos muestreos fue necesario hallar primero una función matemática que relacione el ancho del folíolo central con la superficie total de la hoja. Una vez procesadas las imágenes del primer muestreo se obtuvieron, 595 hojas sanas para el cultivar A3401 y 464 para el cultivar DM4800.

El modelo polinómico de mejor ajuste para cada cultivar es del tipo $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2 + \beta_3 x^3$, donde x es el ancho máximo del folíolo central e \hat{y} es el área foliar estimada. Ambos modelos resultaron significativos con un p-valor <0.0001 en cada cultivar, resultando significativa la componente de orden 3 con un p-valor <0.0001 para el cv DM 4800 y de 0.0025 para el cv A 3401 por lo que no puede reducirse el grado de los polinomios. En la Figura 12 se presentan los modelos para ambos cultivares.

Obtenidos los modelos fue posible calcular la superficie foliar de cada hoja en los sucesivos muestreos.

3.1. Variables patométricas calculadas

Las inoculaciones realizadas con el fin de obtener diferentes niveles de enfermedad en el campo, no produjeron un incremento en la severidad en los diferentes tratamientos. Los resultados obtenidos en el aislamiento del/los agente/s causal/es del tizón bacteriano durante el ciclo agrícola 2005/2006, llevó a elegir al aislamiento 85.4 para las inoculaciones en el campo. A pesar de que se brindaron todas las condiciones necesarias para lograr buenas infecciones (heridas por abrasión y riego por aspersión) este aislamiento no manifestó el efecto esperado.

En el análisis de la varianza realizado para cada cultivar, se encontraron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre las medias de tratamiento para AAFS del cultivar A3401 y para ABCP del cultivar DM4800 por lo que se realizó una prueba de

Tukey ($\alpha = 0.05$) para la significancia estadística de las diferencias en las medias de tratamiento. Estas diferencias no se reflejaron en el rendimiento que resultó estadísticamente similar para todos los tratamientos (Tabla 7). En esta tabla se resumen los valores promedio de las variables patométricas ABCP, DAFS y AAFS calculados para los dos cultivares ensayados.

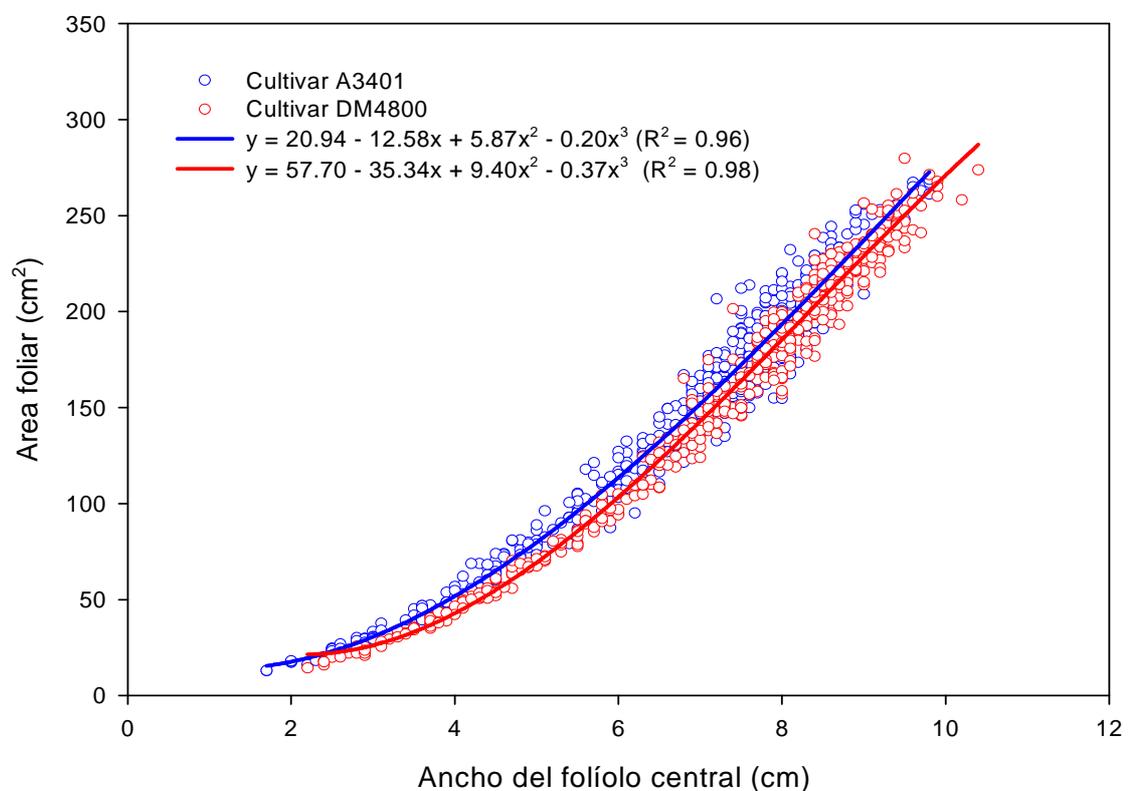


Figura 12: Relación de ancho del folíolo central y superficie foliar para los cultivares A3401 y DM 4800. $y = 20.94 - 12.58x + 5.87x^2 - 0.20x^3$ para el cultivar A3401 ($n=595$), $y = 57.70 - 35.34x + 9.40x^2 - 0.37x^3$ para el cultivar DM 4800 ($n=464$) donde x es el ancho del folíolo central.

Tabla 7: Medias de tratamiento para el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCP), duración del área foliar sana (DAFS), absorción del área foliar sana (AAFS) y rendimiento (REND) para los cultivares A3401 y DM4800. Valores seguidos de letras distintas indican diferencias significativas para las medias de tratamiento por Tukey ($\alpha = 0.05$)

Tratam.	Cv. A 3401				Cv. DM 4800			
	ABCP	DAFS días	AAFS Mj m ⁻²	REND Kg ha ⁻¹	ABCP	DAFS días	AAFS Mj m ⁻²	REND Kg ha ⁻¹
T1	92.18 a	134.70 a	521.35 a	3139.1 a	104.30 c	198.05 a	799.95 a	3149.1 a
T2	105.38 a	125.94 a	507.47 bc	2915.5 a	196.19 a	178.48 a	775.68 a	3235.2 a
T3	94.89 a	135.73 a	519.53 ab	3082.2 a	128.83 bc	158.78 a	772.75 a	3077.4 a
T4	75.93 a	138.28 a	524.29 a	3000.6 a	127.24 c	191.10 a	788.67 a	3277.4 a
T5	94.79 a	128.36 a	518.00 abc	2954.5 a	146.93 abc	187.33 a	787.33 a	3410.1 a
T6	96.08 a	131.16 a	518.03 abc	2781.7 a	188.66 ab	183.63 a	779.07 a	3145.4 a
T7	98.00 a	121.24 a	506.70 c	2880.9 a	150.00 abc	166.43 a	774.48 a	3138.4 a

Un análisis de correlación de los datos obtenidos en los ensayos de campo reveló que no existe asociación entre alguna de las variables analizadas y el rendimiento de los cultivares ensayados (Tabla 8) por lo que no se realizaron otros análisis.

Tabla 8: Coeficientes de correlación lineal de Pearson, entre la variable rendimiento y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCP), la duración del área foliar sana (DAFS) y la absorción del área foliar sana (AAFS) para cada cultivar. Probabilidad asociada a la prueba de hipótesis Ho: $\rho = 0$

	Cultivares			
	DM 4800		A 3401	
	REND		REND	
	Coef.	P > r	Coef.	P > r
ABCP	-0.04	0.81	-0.17	0.38
DAFS	0.27	0.15	0.12	0.51
AAFS	0.32	0.09	0.16	0.40

DISCUSIÓN

1. Identificación del organismo causal de las enfermedades

La técnica de inoculación en plantas no hospederas para seleccionar los aislamientos bacterianos patógenos se basa en la habilidad de estos de inducir la reacción de hipersensibilidad en la planta, ya que los saprófitos no pueden hacerlo (Romeiro, 2001; Romantschuk, 1992), lo que permitió reducir el número de aislamientos a manejar desde más de 1000 a solo diecinueve en el ciclo agrícola 2005/2006 y veintinueve en el ciclo 2006/2007. La constatación de necrosis seca en el área foliar infiltrada, después de 24 h de inoculadas las plantas fue indicador del aislamiento de bacterias fitopatógenas (Klement, Farkas y Lovrekovich, 1964).

Las características morfológicas (color y forma) y bioquímicas de los diecinueve aislamientos del ciclo agrícola 2005/2006, concordaron con las del género *Erwinia*, posiblemente *Erwinia herbicola* dado que en el medio KB mantuvieron el color amarillo (Schaad, 1988). *E. herbicola* ha sido posteriormente renombrada como *Pantoea agglomerans* (Young, Takikawa, Gardam and Stead, 1992).

La ausencia de *Pseudomonas* en todos los aislamientos del ciclo agrícola 2005/2006 posiblemente se debe a un enmascaramiento de su presencia por la abundancia y rápido crecimiento de *P. agglomerans* (Block, Hill and McGee, 1998) favorecido por la relativamente alta temperatura de aislamiento utilizada ($28 \pm 2^\circ \text{C}$).

Marchi et al. (2006) mencionan la presencia de una "yellow-pigmented bacterium" (identificada como *P. agglomerans*) que algunas veces aparece a concentraciones que hacen muy difícil el aislamiento de *P. savastanoi* pv *savastanoi*, agente causal de la agalla del olivo.

Una situación similar fue señalada por Kennedy (1969) quien tuvo dificultades en aislar las bacterias patógenas de soja por el método corriente de siembra en cajas de

petri. Este autor eligió para sus trabajos una “yellow bacterium” por su abundancia en muestras de semillas de soja, pero no realizó pruebas para su identificación.

Seis de los aislamientos de *Pantoea* sp. no causaron síntomas cuando fueron inoculados por en plantas de soja, sin embargo habían incitado reacciones de hipersensibilidad en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv *Xanthi* y *Samsung*) o en poroto (*Phaseolus vulgaris*).

Gonçalves (2003) encontró que aislamientos de *Pseudomonas syringae* y *Erwinia* spp, inducían necrosis cuando eran inyectados en hojas, pero no producían síntomas cuando eran atomizados en un híbrido de eucalipto (*E. urophylla* x *E. maidenii*), de donde habían sido aislados. Jiménez, Contreras y Rodríguez (2007) obtuvieron mejores resultados al inocular por aspersion, con cepas de *P. agglomerans*, hojas de *Gloxinia alba* previamente heridas.

En estos casos la presencia de heridas es un factor importante en la respuesta quimiotáctica del patógeno para la movilidad y la penetración (Beattie and Lindow, 1995).

Estudios posteriores deberán dilucidar la asociación de estos aislamientos de *Pantoea* spp. patógenos con las lesiones en plantas de soja, ya que *P. agglomerans* ha estado asociada con la necrosis del brote del mango (*Mangifera indica*) causada por *P. syringae* pv. *syringae* (Cazorla et al. 1998) y con la agalla del olivo causada por *P. savastanoi* pv *savastanoi* (Surico and Lavermicocca, 1989). También se la ha mencionado causando la necrosis de la punta y márgenes de la hoja del mijo perla (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) (Frederickson et al. 1997) y se ha demostrado interacción sinérgica con *P. savastanoi* pv *savastanoi* en la formación de la agalla del olivo (Marchi et al. 2006) o antagónica con *Erwinia amylovora* (Wright et al., 2001).

Las variaciones encontradas en las pruebas bioquímicas de los aislamientos de fitopatógenos del ciclo agrícola 2006/2007 agruparon al 59 % de los veintinueve

aislamientos fitopatógenos fluorescentes en Psg, y al 7 % en el grupo de *Pseudomonas syringae*, mientras que el 34 % restante se nombraron *Pseudomonas*.

Cuando se aíslan bacterias a partir de una planta infectada que desarrolla los síntomas típicos de una enfermedad, habitualmente predomina una especie bacteriana, aunque es posible que en el tejido infectado de la planta contenga otras especies bacterianas (Romantschuk, 1992). En un estudio, May, Volksch y Kampmann (1997) encontraron sobre 112 aislamientos realizados en hojas de soja con síntomas de tizón bacteriano que el 43 % pertenecían a Psg, el 21 % a *E. herbicola* (Syn *P. agglomerans*) y 19 % a otras *Pseudomonas*.

Aislamientos bacterianos fitopatógenos, que causan enfermedad cuando son infiltrados, pueden no causar enfermedad cuando son atomizados en plantas sin heridas (Gonçalves, 2003).

Las condiciones ambientales probablemente son la mayor influencia en la virulencia de un patógeno y en la susceptibilidad de una planta. Tanto la temperatura, la intensidad de luz, la longitud del día, la edad y la saturación de agua en los tejidos de la hoja ha sido demostrado que influyen en la multiplicación y/o virulencia del patógeno (Beattie and Lindow, 1995). Es por ello que el acondicionamiento previo de las plantas en cámaras húmedas a 25 ± 2 ° C por más de 24 h ha sido considerado favorable para el establecimiento de infecciones por bacterias (Romeiro, 2001).

La ausencia de síntomas en plantas de soja, al inocular algunos aislamientos patógenos identificados como *P. agglomerans* y la ocurrencia de síntomas también en plantas de soja inoculadas con aislamientos fitopatógenos fluorescentes, indica la necesidad de estudios posteriores para establecer la asociación de estos aislamientos con la/s enfermedades bacterianas en plantas de soja.

2. Escala diagramática para cuantificación del tizón bacteriano

Basu y Burtler (1986) desarrollaron una escala diagramática para evaluar el tizón bacteriano con 9 niveles de enfermedad sobre hojas de soja, a diferencia de las escalas desarrolladas por Mattiazzi (2003), Martins et al. (2004) y Godoy et al. (2006) para otras enfermedades de la soja, que se representan sobre folíolos de soja y sólo con 5 o 6 niveles como la escala propuesta en esta tesis, dado que estas características hace más práctico el uso de la escala.

Según James (1977) hay dos requisitos principales en el uso de escalas, el primero es que los observadores que usan la escala para evaluar un grupo de plantas enfermas deben ser capaces de llegar a valoraciones similares de forma consistente, y el segundo es que la valoración sea simple y rápida. Para lograr estos objetivos las escalas son validadas a través de la exactitud y precisión de los evaluadores (Nutter et al. 1993; Nutter y Schultz, 1995).

Al no utilizar la escala los evaluadores son mas inexactos, evidenciado por la mayor cantidad de evaluadores cuyos valores del intercepto (a) ó de la pendiente (b) son significativamente diferentes de cero y uno respectivamente, para alguna de las 3 evaluaciones que realizaron. Por ejemplo los evaluadores 2 y 4 para el cultivar DM4800 sobreestimaron la severidad a valores bajos ($a = 2.77$ y 2.39 respectivamente) y subestimaron a valores altos ($b = 0.64$ y 0.85).

Según Nutter et al. (2006) una pendiente significativamente mayor o menor que uno, indica la presencia de tendencias sistemáticas y un intercepto significativamente diferente de cero indica la presencia de otra forma de tendencias que es constante para todos los niveles de la enfermedad evaluada.

Los resultados muestran que al utilizar la escala, solo con el evaluador 1 se obtiene una pendiente significativamente diferente de 1 en una de sus evaluaciones, lo

que indica que la escala desarrollada es útil para mejorar la precisión y la exactitud de las estimaciones.

Otro indicador de la precisión es el coeficiente de determinación (R^2) con un rango de 0.56 a 0.92 para las estimaciones realizadas sin la ayuda de la escala y de 0.78 a 0.95 para las estimaciones realizadas con ayuda de la escala. Estos resultados pueden ser considerados como buenos si se los compara con los valores obtenidos por Godoy et al. (2006) que cuando trabajaron con evaluadores experimentados utilizando una escala desarrollada para la roya de la soja encontraron valores que oscilaron entre 0.89 y 0.91 y por Martins et al. (2004) quienes encontraron valores de 0.65 a 0.84 para evaluadores inexpertos usando una escala validada para enfermedades de fin de ciclo también en soja.

La precisión se evalúa además teniendo en cuenta la distribución de los errores absolutos donde se observa que, salvo el evaluador 2, todos tienden a concentrar los errores en la faja de $\pm 10\%$ cuando utilizan la escala y presentan errores absolutos mayores cuando no la utilizan. Estos valores son considerados buenos por Nutter y Worawitlikit (1989) para quienes excelente es aquel evaluador cuyos errores no superan un $\pm 5\%$.

La utilización de escalas diagramáticas para evaluar severidades logra reducir el error absoluto como puede comprobarse en las publicaciones de Godoy et al. (2006) y Andrade et al. (2005) como así también con los resultados presentados en el presente trabajo.

Los evaluadores convocados para validar esta escala diagramática tenían experiencia evaluando enfermedades foliares, pero ninguno había evaluado enfermedades que provocan desprendimiento de partes de la lámina foliar, como ocurre con el tizón bacteriano. Ésta característica puede afectar las estimaciones de

los evaluadores, lo cual se solucionado, al menos en parte, con el entrenamiento de los evaluadores como lo determinaron Nutter et al. (2006).

En las combinaciones de los evaluadores sin la escala se obtuvieron estimaciones de los coeficientes a y b que difirieron estadísticamente ($\alpha = 0.01$) de los valores ideales, 0 y 1 respectivamente. Mientras que al utilizar la escala como referencia visual, se obtuvieron estimaciones que no difirieron estadísticamente de los valores ideales, salvo con la combinación de los evaluadores 1 y 2 que presenta una tendencia constante en todos los niveles evidenciado por su intercepto de 5.08 para el cv DM 4800 y de 4.59 para el cv A3401 que sí son estadísticamente diferentes de 0 ($\alpha = 0.01$).

También se mejoran los coeficientes de determinación que están en el rango de 0.49 a 0.94 para las combinaciones de las estimaciones de los evaluadores sin la escala y en el rango de 0.66 a 0.94 cuando utilizan la escala.

Estos resultados permiten afirmar que la escala desarrollada es útil para mejorar las estimaciones de los evaluadores y realizar comparaciones entre las estimaciones de diferentes evaluadores.

3. Cálculo de la función de daño para el tizón bacteriano

Para hallar una función que relacione el rendimiento con alguna variable patométrica es necesario lograr diferentes niveles de enfermedad y que las variables que se calculen se correlacionen con el rendimiento, hecho que no fue verificado con los datos obtenidos.

El análisis de correlación lineal de Pearson realizado a los datos obtenidos en los ensayos de campo, evidencia la falta de asociación entre el ABCP, la DAFS y AAFS con el rendimiento del cultivo de soja en las condiciones del ensayo.

Diaz et al. (2001 y 2004) trabajando en el patosistema *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* – Poroto (*Phaseolus vulgaris*) no encontraron asociación entre la variable

de área bajo la curva de progreso de la enfermedad y el rendimiento. Sí comprobaron cierta asociación entre este último con la duración del área foliar sana y con la absorción del área foliar sana.

Por otra parte en tres años de experimentos con las enfermedades de fin de ciclo (tizón foliar por *Cercospora kikuchii* y mancha marrón por *Septoria glycines*) Martins (2003) no encontró correlación entre la variable duración del área foliar sana y rendimiento, aunque si existió relación positiva entre la absorción del área foliar sana y el rendimiento.

CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos, la hipótesis de que enfermedades no descritas para el cultivo de soja se presentan en Argentina debe ser rechazada.

Por la sintomatología que presentan en el campo las enfermedades detectadas en las dos campañas de estudio son: la pústula bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv *glycinea* y el tizón bacteriano causado por *Pseudomonas savastanoi* pv *glycines*.

Diecisiete aislamientos de la EEA Reconquista y Balcarce se identificaron fehacientemente como *P. savastanoi* pv *glycines* causantes del tizón bacteriano.

Diecinueve aislamientos de bacterias asociadas a los síntomas de tizón bacteriano se incluyeron en el género *Pantoea*.

Se desarrolló una escala diagramática para la evaluación del tizón bacteriano de la soja con 6 niveles de enfermedad (0, 2, 8, 16, 27 y 52 %) esquematizados sobre folíolos.

La validación de la escala con diferentes evaluadores confirmó que es adecuada para la evaluación del tizón bacteriano de la soja, presentándose como una herramienta útil para lograr estimaciones confiables y comparables.

La hipótesis de que la pérdida de rendimiento en soja debida a bacterias puede ser determinada por una función matemática al igual que el objetivo 3 de hallar una función de daño para el tizón bacteriano, no pueden ser probadas con los resultados obtenidos.

No se obtuvieron correlaciones lineales entre las variables patométricas de ABCP, DAFS y AAFS con el rendimiento de los dos cultivares de soja evaluados.

BIBLIOGRAFIA

- ABO-MOCH, F., MAVRIDIS, A. and RUDOLPH, K. 1995. Determination of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* occurring in Europe. J. Phytopathol. 143:1-5.
- ABRAMOVITCH, R.B. and MARTIN, G.B. 2004. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. Curr. Opin. Plant Biol. 7:356–364.
- AGRIOS, G. N. 1997. Plant pathology 4th ed. Academic Press. 635 p.
- ALLINGTON, W.B. and FEASTER, C.V. 1946. The relation of stomatal behavior at the time of inoculation to the severity of infection of soybean by *Xanthomonas phaseoli* var. *sojense* (Hedges) (Starr). Burk. Phytopathology 36:385 – 386.
- AMORIM, L. 1995. Avaliação de doenças. En: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., e AMORIM, L. eds. Manual de fitopatologia, 3^{ed}. São Paulo. Agronômica Ceres. pp. 647-671
- ANDRADE, G.C.G., ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G., MAFFIA, L.A. e GONÇALVES, R.C. 2005. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. Fitopatologia Brasileira 30:504-509.
- ASHFIELD, T, KEEN, N.T., BUZZELL, R.I. and INNES, R.W. 1995. Soybean resistance genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic, or closely linked, at the RPG1 Locus. Genetics 141:1597-1604.
- ATLAS, E. DE GOTUZZO. 1965. La bacteriosis de la soja en la Argentina. Revista de la facultad de agronomía y veterinaria de Buenos Aires. 16(2):27–62.
- AZEVEDO, L. A. S. 1998. Manual de quantificação de doenças de plantas. 114 p.
- BASU, P.K. and BUTLER G. 1986. An evaluation of soybean bacterial blight assessment methods. Can. J. Plant Pathol. 8:459-463.
- BEATTIE, G.A and LINDOW, S.E. 1999. Bacterial Colonization of leaves: A spectrum of strategies. Phytopathology 89:353–359.
- BEATTIE, G.A. and LINDOW, S.E. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. Annu. Rev. Phytopathol. 33:145-172.
- BELASQUE, JÚNIOR, J., BASSANEZI, R.B., SPÓSITO, M.B., RIBEIRO, L.M., JESUS JUNIOR, W.C. E AMORIM, L. 2005. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. Fitopatologia Brasileira 30:387-393.
- BERGAMIN FILHO, A. E AMORIM, L. 1996. Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico. Piracicaba: Agronômica Ceres. 299 p.
- BLOCK, C.C., HILL, J.H., and MCGEE, D.C. 1998. Seed transmission of *Pantoea stewartii* in field and sweet corn. Plant Dis. 82:775-780.

- BOURGAULT, A.M. and LAMOTHE, F. 1988. Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology. *J. Clin. Microbiol* 26: 2144-2146.
- CABRERA, M.G., GUTIERREZ, S.A., CUMDOM, M.A., ALVAREZ, R.E., BOURDIN, L., Y OBREGÓN, V. 2005. Prevalencia del tizón bacterial de la soja en los cultivos de la provincia de Corrientes, Argentina. 12 Congreso Latinoamericano de Fitopatología y 3^{er} Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Libro de Resúmenes. pp. 227.
- CAZORLA, F.M., TORÉS, J.A., OLALLA, L., PÉREZ-GARCÍA, A., FARRÉ, J.M., and DE VICENTE, A. 1998. Bacterial apical necrosis of mango in southern Spain: A disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology* 88:614-620.
- CHAMBERLAIN, D.W. 1952. A halo-producing strain of *Pseudomonas glycinea*. *Phytopathology* 42:299-300.
- CHAMBERLAIN, D.W. 1956a. Pathogenicity of *Pseudomonas tabaci* on soybean and tobacco. *Phytopathology* 46:51-52.
- CHAMBERLAIN, D.W. 1956b. Methods of inoculation for wildfire of soybean and the effect of bacterial pustule on wildfire development. *Phytopathology* 46:96-98.
- COERPER, F.M. 1929. Bacterial blight of soybean. *J. Agr. Res.* 18:179-193. En: MUKHERJEE, D., LAMBERT, J.W., COOPER, R.L. and KENNEDY, B.W. 1966. Inheritance of resistance to bacterial blight (*Pseudomonas glycinea* Coerper) in soybean (*Glycine max* L.). *Crop sci.* 6:324-326.
- COOK, A.A., HARDANINGSIH, S.R.I. and YUSMANI, D. 1990. An inoculation technique to assess soybean plants for response to *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Plant Dis.* 74:309-310.
- CROSS, J.E., KENNEDY, B.W., LAMBERT, J.W. and COOPER, R.L. 1966. Pathogenic races of the bacterial blight pathogens of soybeans, *Pseudomonas glycinea*. *Plant Dis. Rep.* 50:557-560. En: THOMAS, M.D. and LEARY, J.V. 1980. A new race of *Pseudomonas glycinea*. *Phytopathology* 70:310-312.
- DAFT, G.C. and LEBEN, C. 1973. Bacterial blight of soybeans: field-overwintered *Pseudomonas glycinea* as possible primary inoculum. *Plant Dis Rep.* 57:156-157.
- DAFT, G.C. and LEBEN, C., 1972. Bacterial blight of soybean: epidemiology of blight outbreaks. *Phytopathology* 62:57-62.
- DIAZ, C.G., BASSANEZI, R.B., GODOY, C.V., LOPES, D.B., BERGAMIN FILHO, A. 2001. Quantificação do efeito do cretamento bacteriano comum na eficiência fotossintética e na produção do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 26(1):71-76.
- DIAZ, C.G., PLOPER, L.D., GALVEZ, R., BERGAMIN FILHO A., HAU, B. 2004. Efectos de la bacteriosis común del poroto sobre las variables de área foliar sana (HAD y HAA) y sobre la producción en la argentina. *Fitopatología* 39(2):66-75.

- DUNLEAVY, J.M. 1983. Bacterial tan spot, a new foliar disease of soybean. *Crop Sci.* 23:473 – 476.
- DUNLEAVY, J.M. 1984. Yield losses in soybean caused by bacterial tan spot. *Plant Dis* 68:774-776.
- DUNLEAVY, J.M., WEBER, C.R. and CHAMBERLAIN, D.W. 1960. A source of bacterial blight resistance for soybeans. *Proc. Iowa Acad. Sci.* 67:120-125. En: WILLIAMS, D.J. and NYVALL, R.F. 1980. Leaf infection and yield losses caused by brown spot and bacterial blight disease of soybean. *Phytopathology* 70:900-902.
- FEHR, W., CAVINESS, C., BURMOOD, D. and PENNINGTON, J. 1971. Stage development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L) Merrill. *Crop Sci.* 11:929–931.
- FERREIRA L. E SALGADO C. L. 1995. Parte II – Agentes causais: Bactérias. BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. eds Manual de fitopatologia, 3^{ed}. São Paulo. Agronômica Ceres. pp. 97-130.
- FETT, W.F. 1979. Survival of *Pseudomonas glycinea* and *Xanthomonas phaseoli* var *sojensis* in leaf debris and soybean seed in Brazil. *Plant Dis. Rep.* 63(1):79-83.
- FETT, W.F. and SEQUEIRA, L. 1981. Further characterization of the physiologic races of *Pseudomonas glycinea*. *Can. J. Bot.* 59:283–287.
- FLOR, A. H. 1955. Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. *Phytopathology* 45:680-685.
- FREDERICKSON, D.E., MONYO, E.S., KING, S.B., and ODVODY, G.N. 1997. A Disease of pearl Millet in Zimbabwe Caused by *Pantoea agglomerans*. *Plant Dis.* 81:959.
- GAUNT, R.E. 1987. Measurement of disease and pathogens. In: TENG, P.S. ed *Crop Loss Assessment and Pest Management*. St. Paul, APS Press, pp.6-18.
- GHIDA DAZA, C. 2002. Evolución de la Producción de Soja en Argentina – 2002. INTA Marcos Juárez, Córdoba Argentina. Boletín técnico N° 12. 3 p.
- GNANAMANICKAM, S.S. and WARD, E.W.B. 1982. Bacterial Blight soybean: a new race of *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* and variations in systemic symptoms. *Can. J. Pathology* 4:73-78.
- GODOY, C.V., KOGA, L.J. and CANTERI, M.G. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* 31:063-068.
- GONÇALVES, R. C. 2003. Etiologia da mancha bacteriana do eucalipto no Brasil – Tese de Doutorado- Universidade Federal de Viçosa. 79 p.
- GONZALEZ, V.; GALVEZ, M.R.; ZAMORANO, C.G.; DIAZ, L. y PLOPER, D. 2005. Prospección de enfermedades en cultivos de soja del noroeste argentino durante cuatro campañas agrícolas. 12 Congreso Latinoamericano de

Fitopatología y 3^{er} Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Libro de Resúmenes p 529.

- GRAHAM, J.H. 1953a. Cultural and epiphytotic relationships of three bacterial pathogens of soybeans. *Phytopathology* 43:193 – 194.
- GRAHAM, J.H. 1953b. Overwintering of three bacterial pathogens of soybean. *Phytopathology* 43:189–192.
- GREGERSEN, T. 1978. Rapid method for distinction of Gram negative from Gram positive bacteria. *Eur. J. Appl Microbiol Biotech* 5:123-127.
- GROTH, D.E. and BRAUN, E.J. 1986. Growth kinetics and histopathology of *Xanthomonas campestris* pv *glycines* in leaves of resistant and susceptible soybean. *Phytopathology* 76: 959 – 965.
- GROTH, D.E. and BRAUN, E.J. 1989. Survival, seed transmission, and epiphytic development of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in the north central united states. *Plant dis.* 73: 326-330.
- HAILE, F.J., HIGLEY, L.G., SPECHT, J.E., and SPOMER, S.M. 1998. Soybean leaf morphology and defoliation tolerance. *Agron. J.* 90:353 – 362.
- HALEBIAN, S., HARRIS, B., FINEGOLD, S.M. and ROLFE, R.D. 1981. Rapid method that aids in distinguishing Gram positive from Gram negative anaerobic bacteria. *J. Clin Microbiol* 13:444-448.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMAN, A.; MAHAFFEE, W.F. and KLOEPPER, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiology*, 43:895-914,
- HARTMAN, G.L., SINCLAIR, J.B. and RUPE, J.C. 1999. *Compendium of Soybean Diseases*. 4rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. USA. 100 p.
- HIRANO, S.S. and UPPER, C.D. 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathology* 28:155-77.
- HORSFALL, J.C. and BARRAT, R.W. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology* 35:665.
- HUANG, J.S. 1986. Ultrastructure of Bacterial Penetration in Plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24:141-157.
- HUGH, R. and LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 66: 24-26.
- HWANG, I. and LIM, S.M. 1992. Effects of individual and multiple infections with three bacterial pathogens on disease severity and yield of soybeans. *Plant Dis.* 76:195-198.

- HWANG, I., and LIM, S.M. 1987. Pathogenic variation in soybean of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Phytopathology* 77:1709. (Abstract)
- IICA/SAGPyA, 2006. *Perspectivas de los biocombustibles en la Argentina y en Brasil*. Coordinado por Edith Scheinkerman de Obschatko y Flory Begenisic - 1a ed. - Buenos Aires: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura - IICA : Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación - SAGPYA, 2006. 150 p.
- JAMES, W.C. 1977. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. *Can. plant dis. Surv.* 51(2): 39-65
- JAMES, W.C. 1971. A manual of assessment Keys for plant diseases. Publication N° 1458. The American Phytopathological Society.
- JIMÉNEZ, O., CONTRERAS, N. y RODRÍGUEZ, C., 2007. Identificación y caracterización de *Pantoea agglomerans* aislada en plantas de gloxinia (*Gloxinia alba*). *Bioagro* 19(1): 53-57.
- JONES, S.B. and FETT, W.F. 1987. Bacterial pustule disease of soybean: microscopy of pustule development in a susceptible cultivar. *Phytopathology* 77:266–274.
- KAEWNUM, S., PRATHUANGWONG, S. and BURR, T. J. 2005. Aggressiveness of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* isolates to soybean and hypersensitivity responses by others plants. *Plant pathology* 54:409 – 415.
- KAMOUN, S., KAMDAR, H.V., TOLA, E. and KADO, C.I. 1992. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: Role of the hrpX locus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:22-23.
- KAUFFMAN, P.H. and LEBEN, C. 1974. Soybean bacterial blight: flower inoculation studies. *Phytopathology* 64:329-331.
- KENDRICK, B.W. and GARDNER, M.W. (1920). Seed transmission of soybean bacterial blight. *Phytopathology* 11:340-342. En GRAHAM, J. H. 1953. Overwintering of three bacterial pathogens of soybean. *Phytopathology* 43:189 – 192.
- KENNEDY, B.W. 1969. Detection and distribution of *Pseudomonas glycinea* in Soybean. *Phytopathology* 59: 1618 – 1619.
- KENNEDY, B.W. and ERCOLANI, G. L., 1978. Soybean primary leaves as a site for epiphytic multiplication of *Pseudomonas glycinea*. *Phytopathology* 68:1196-1201.
- KENNEDY, B.W. and MEW, T.W. 1971. Relationship of post inoculation humidity to bacterial leaf blight development on soybean. *Phytopathology* 61:879-880.
- KING, E.O., WARD, M.K., and RANEY, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.

- KLEMENT, Z., FARKAS, G.L. and LOVREKOVICH, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474-477.
- KUCHAREK, T. and STALL, B. 1985. A bacterial leafspot of soybean caused by a new race of *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. *Soil and Crop Science Society of Florida Proceeding*, 44:174-177.
- LAMARI, L. 2002. ASSESS: Image Analysis Software for Plant Disease Quantification. American Phytopathological Society. University of Manitoba, Winnipeg, Canadá.
- LEBEN, C. 1961. Microorganisms on cucumber seedlings. *Phytopathology* 51:553-557.
- LEBEN, C. 1981. How plant pathogenic bacteria survive. *Plant Dis.* 65:633-637.
- LELLIOT, R.A., BILLING, E. and HAYWARD, A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *J. Appl Bacteriol* 29: 470-489.
- MANJAYA, J.G. and PAWAR, S.E., 1999. New genes for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and their inheritance. *Euphytica* 106:205–208.
- MARCHI, G., SISTO, A., CIMMINO, A., ANDOLFI, A., CIPRIANI, M.G., EVIDENTE, A., SURICO, G. 2006. Interaction between *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* and *Pantoea agglomerans* in olive knots. *Plant Pathology*, 55:614-624
- MARINGONI, A.C. & CORRÊA DE SOUZA, E. L. 2003. Reação de cultivares de soja a isolado de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, proveniente de feijoeiro. *Pesq. agropec. bras.*, 38(6):777-781
- MARTINS, M.C. (2003) Produtividade da soja sob influência de ocorrência natural de *Septoria glycines* Hemmi e *Cercospora kikuchii* (Matsu. & Tomoyasu) Gardner com e sem controle químico. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba - Brasil. 104 p.
- MARTINS, M.C., GUERZONI, R.A., CÂMARA, G.M.S., MATTIAZZI, P., LOURENÇO, S.A. e AMORIM, L. 2004. Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. *Fitopatologia Brasileira* 29:179-184.
- MATTIAZZI, P. 2003. Efeito do oídio (*Microsphaera diffusa* Cooke & Peck) na produção e duração da área foliar sadia da soja. (Dissertação de mestrado). Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2003. En: GODOY, C.V., KOGA, L.J. & CANTERI, M.G. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* 31:063-068.
- MAY, R., WOLKSCH, B., KAMPMANN, G. 1997. Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* in vitro and in planta. *Microb. Ecol.* 34:118-124.

- MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., KOCZAN, J., NOMURA, K. and HE, S.Y. 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969–980.
- MEW, T.W. and KENNEDY, B.W. 1971. Growth of *Pseudomonas glycinea* on the surface of soybean leaves. *Phytopathology* 61:715–716.
- MOFFETT, M.L. 1976. A Halo-producing Strain of *Pseudomonas glycinea* in Australia. *Australian Plant Pathology* 5(1): 5-6.
- MUKHERJEE, D., LAMBERT, J.W., COOPER, R.L. and KENNEDY, B.W. 1966. Inheritance of resistance to bacterial blight (*Pseudomonas glycinea* Coerper) in soybean (*Glycine max* L.). *Crop sci.* 6:324–326.
- NAPOLI, C. and STASKAWICZ, B.J. 1987. Molecular characterization and nuclei acid sequence of an avirulence gene from race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Journal of Bacteriology*, 169 (2):572–578.
- NARVEL, J.M., JAKKULA, L.R., PHILLIPS, D.V., WANG, T., LEE, S.H. and BOERMA, H.R. 2001. Molecular Mapping of Rxp Conditioning Reaction to Bacterial Pustule in Soybean. *The Journal of Heredity* 92(3):267-270.
- NOMURA, K., MELOTTO, M. and HE, S.Y. 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 361–368.
- NUTTER, F.W. and SCHULTZ, P.M. 1995. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. *Can. J. Plant Pathology* 17:174-184.
- NUTTER, F.W., GLEASON, M.L., JENCO, J.H. and CHRISTIANS, N.C. 1993. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. *Phytopathology* 83:806-812.
- NUTTER, F.W., ESKER, P. D. and COELHO NETTO, R. A.. 2006. Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. *European Journal of Plant Pathology* 115: 95–103.
- NUTTER, F.W.; WORAWITLIKIT, O. 1989. Disease.Pro: a computer program for evaluating and improving a person ability to assess disease proportion. *Phytopathology*, 79:1135.
- PALLERONI, N. J. 1984. Genus I: *Pseudomonas*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1 N. R. Krieg ed. Williams and Wilkins, Baltimore p. 141 – 199.
- PARK, E. W. and LIM, S. M. 1985. Overwintering of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in the field. *Phytopathology* 75: 520–524.
- PARK, E. W. and LIM, S. M. 1986. Effects of bacterial blight on soybean yield. *Plant Dis.* 70: 214-217.

- PEÑA, E.R., SOTO, E.R. y VICTORIA, J.I.K., 1982. Determinación de razas fisiológicas de *Pseudomonas glycinea* Coerper y evaluación de variedades de soja. Acta agronomica 32(1) 53-62.
- PICININI, E.C. e FERNANDEZ, J.M. 2000. Doenças de soja: diagnose, epidemiologia e controle. 2^{da} ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo. Documento 16. 91p.
- PLOPER, L.D. 1994. Aspectos salientes de las enfermedades de la soja en el nordeste Argentino durante la campaña 1993/94. Avance Agroindustrial. 58:37-39
- PLOPER, L.D. 2003. Manejo de enfermedades en el cultivo de soja. En: Centro Soja 2003. "La planta, el cultivo y el negocio de la soja, desde Vendo Tuerto, hacia la región y el MERCOSUR". Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina.
- PLOPER, L.D., ESCOBAR, D., IVANCOVICH, A., DIAZ, C.G., SILLON, M., FORMENTO, N., DE SOUZA, J., CABRERA DE ALVAREZ, G., GONZALEZ, V., GALVEZ, M.R., FRIGIDI, V., RIDAO, A., SCANDIANI, M., VICENTIN, I., CASTRO, A., ZAPATA, R., RIVADENEIRA, M. y SAIEG, E. 2006. Propuesta de protocolo para muestreo y evaluación de la roya asiática de la soja en Argentina. Libro de Resúmenes 3^{er} Congreso de soja del MERCOSUR. Rosario 27 a 30 de junio. p. 474-477.
- PLOPER, L.D., YORINORI, J.T. Y MOREL PAIVA, W. 2003. Importancia de las enfermedades de la soja en el MERCOSUR. Soja en siembra directa. AAPRESID. pp: 83-90.
- PRATHUANGWONG, S. and KHANDEJ, K. 1998. Development of the New Methods for Ecological Study of Soybean Bacterial Pustule: An Artificial Inoculation Method of Soybean Seed with *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* for Inducing Disease Expression. Kasetsart J. (Nat. Sci) 32:84-89.
- PROM, L. K. and VENETTE, J. R. 1997. Races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* on commercial soybean in eastern North Dakota. Plant Dis. 81:541-544.
- RIBEIRO, R., HAGEDORN, D.J., DURBIN, R.D. and UCHYTIL, T.F. 1979. Characterization of the bacterium inciting bean wildfire in Brazil. Phytopathology 69:208-212.
- RIDAO, A.; PEREYRA IRAOLA, M.; PAGANI, A.; BODEGA, E.; AZPEITIA, M.; ROSS, F. 2005. Situación actual de las principales enfermedades de soja en el sudeste de Buenos aires. 12 Congreso Latinoamericano de Fitopatología y 3^{er} Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. Libro de Resúmenes. p. 456
- ROMANTSCHUK, M. 1992. Attachment of Plant Pathogenic Bacteria to Plant Surfaces. Annu. Rev. Phytopathol. 30:225-43.
- ROMEIRO, R.S. 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, MG: Editora UFV. pp 279.
- ROSSI, R.L. 2003. Aporte del mejoramiento genético al cultivo de la soja en la Argentina actual y de expansión futura. En: Centro Soja 2003. "La planta, el cultivo y el negocio de la soja, desde Vendo Tuerto, hacia la región y el MERCOSUR". Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina.

- SAGPyA. 2006. Estimaciones Agrícolas Mensuales. Campaña 2005/2006. Disponible en línea: http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/otros/estimaciones/pdfmensual/junio_06.pdf. Actualizado: 16/6/2006. Consulta: 18/07/2006.
- SAS, 1999. SAS Companion for Microsoft Windows Environment, Version 8. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- SCHAAD, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society. 2^{da} ed.
- SINCLAIR, J.B., and BACKMAN, P.A., eds. 1989. Compendium of Soybean Diseases. 3rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- STASKAWICZ, B.J., DAHLBECK, D. and KEEN, N.T. 1984. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.) Merr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6024–6028
- STASKAWICZ, B., DAHLBECK, D., KEEN, N. and NAPOLI, C. 1987. Molecular Characterization of Cloned Avirulence Genes from Race 0 and Race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Journal of Bacteriology, 169(12):5789-5794.
- STONEHOUSE, J. 1994. Assessment of Andean bean diseases using visual keys. Plant Pathology 43:519-527.
- SURICO, G., and LAVERMICOCCA, P., 1989. A selective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi*. Phytopathology 79:185-190.
- TAMAKI, S., DAHLBECK, D., STASKAWICZ, B. and KEEN, N.T. 1988. Characterization and expression of two avirulence genes cloned from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Journal of Bacteriology, 170(10):4846-4854.
- THOMAS, M.D. and LEARY, J.V. 1980. A new race of *Pseudomonas glycinea*. Phytopathology 70:310-312.
- THORNLEY, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl Bacteriol 23:37-52. IN: SCHAAD, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society. 2^{da} ed.
- VAUTERIN L., HOSTE B., KERTERS K. and SWINGS J. 1995. Reclassification of Xanthomonas. International Journal of Systematic Bacteriology. 45:472-489.
- VENETTE, J.R. and KENNEDY, B.W., 1975. Naturally produced aerosols of *Pseudomonas glycinea*. Phytopathology 65:737-738.
- WAGGONER, P.E. and BERGER, R.D. 1987. Defoliation, disease and growth. Phytopathology 77:393-398.
- WEBER, C.R., DUNLEAVY, J.M. and FEHR, W.R 1966. Effect of bacterial pustule on closely related soybean lines. Agron. J. 58:544-545. En HWANG I. and LIM S.

- M. 1992. Effects of individual and multiple infections with three bacterial pathogens on disease severity and yield of soybeans. *Plant Dis.* 76:195-198.
- WILLIAMS, D.J. and NYVALL, R.F. 1980. Leaf infection and yield losses caused by brown spot and bacterial blight disease of soybean. *Phytopathology* 70:900-902.
- WRATHER, J.A., ANDERSON, T.R., ARSYAD, D.M., GAI, J., PLOPER, L.D., PORTA-PUGLIA, A., RAM, H.H. and YORINORI, J.T. 1997. Soybean disease loss estimate for the top 10 soybean producing countries in 1994. *Plant Dis.* 81:107-110.
- WRATHER, J.A., ANDERSON, T.R., ARSYAD, D.M., TAN, Y., PLOPER, L.D., PORTA-PUGLIA, A., RAM, H.H. and YORINORI, J.T. 2001. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. *Can. J. Plant Pathol.* 23:115-121.
- WRIGHT, S.A., ZUMOFF, C.H., SCHNEIDER, L. and BEER, S.V. 2001. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:284–292.
- YOUNG, J.M., TAKIKAWA, Y., GARDAN, L. and STEAD, D.E. 1992. Changing Concepts in the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:67-105.

ANEXO

PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA AISLAMIENTOS FLUORESCENTES

Pseudomonas savastanoi pv *glycinea* pertenece a la sección 1 según la división propuesta por Palleroni (1984) para el género *Pseudomonas*. Psg presenta siguientes características bioquímicas que permiten su ubicación taxonómica: Gram negativas, catalasa positiva, aerobias estrictas, producen pigmentos fluorescentes en el medio KB al ser expuestos a la luz ultravioleta, ausencia de arginina dihidrolasa, ausencia de citocromo oxidasa. Estas características básicas fueron complementadas con otras pruebas por Lelliot, Billing y Hayward (1966) dando origen a las pruebas LOPAT iniciales de: Levano, Oxidasa, Podredumbre de papa, Arginina dihidrolasa e hipersensibilidad en tabaco.

1. Prueba del koh para determinar el gram

La tinción de Gram permite una diferenciación útil entre microorganismos Gram positivos y Gram negativos, algunos factores como el tiempo de cultivo o la composición del medio pueden alterar la respuesta a la reacción Gram. Un ejemplo sería el de bacterias Gram positivas anaeróbicas que se decoloran en la tinción de Gram, dando un resultado falso.

Un método alternativo es la denominada prueba del KOH, descrita por Gregersen (1978), Halebian et al. (1981) y Bourgault and Lamothe (1988). Este método está basado en la rotura de la pared celular de las bacterias al entrar en contacto con soluciones alcalinas diluidas. Una suspensión de células bacterianas en KOH al 3% toma un aspecto viscoso debido a la liberación del ADN cuando se trata de una bacteria Gram negativa.

Se coloca una pequeña masa bacteriana sobre un porta objetos y se agregan unas gotas de KOH, se homogeniza con un ansa de platino y se observa la viscosidad y la formación de un hilo al levantar el ansa desde el porta objetos.

Las suspensiones bacterianas fueron preparadas a partir de cultivos puros de 2 días de incubación a 23 °C, en placas de petri con medio KB.

2. Catalasa

La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en H₂O y O₂. La actividad de la catalasa se detectó cubriendo una pequeña cantidad de biomasa bacteriana depositada en un portaobjetos con unas gotas de H₂O₂ de 30 volúmenes. La presencia de la enzima se pone de manifiesto por el desprendimiento de burbujas de O₂ inmediatamente después de haber sido añadida el agua oxigenada. Se utilizaron cultivos sobre KB de 2 días de incubación a 23 ° C.

3. Oxidación y/o fermentación de la glucosa

Para determinar la vía de degradación oxidativa y/o fermentativa de la glucosa se utilizó el medio descrito por Hugh y Leifson (1953).

El medio de cultivo se distribuye en tubos de ensayo de 10 mm de diámetro y se inocula con la cepa problema en profundidad y por duplicado. Uno de los dos tubos se cubre con una capa de vaselina estéril para crear una atmósfera sin oxígeno, se incuba durante 14 días a 27 ° C, diariamente se revisan si hay cambio del indicador. La producción de ácido a partir de la glucosa se manifiesta por un cambio de color del medio de cultivo que pasa del verde al amarillo.

4. Fluorescencia en KB

La producción de pioverdinas se evidencia al hacer crecer a la cepa problema en un medio pobre en hierro, como es el medio B de King, Ward y Raney (1954).

Las pioverdinas son compuestos solubles en agua y por lo tanto difusibles en el medio de cultivo, presentan una coloración verde-amarillenta con fluorescencia bajo luz ultravioleta. Esta característica constituye una ayuda inestimable al momento de identificar a las *Pseudomonas* fitopatógenas.

Composición del medio de B de King's

Proteosa peptona	20,0 g
Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4)	1,5 g
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	1,5 g
Agar-agar	15,0 g
Glicerina	10,0 mL
Agua destilada	1,0 L
Ajuste de pH 7,2	

5. Arginina dihidrolasa

Para detectar la presencia de la enzima arginina dihidrolasa se utilizó el método descrito por Thornley (1960) y modificado por Lelliot, Billing and Hayward (1966).

Para la realización del ensayo los biotipos bacterianos se hacen crecer en el medio de Thornley que contiene L-Arginina y rojo fenol como indicador. El medio de cultivo, distribuido en tubos de ensayo de 10 mm, se inocula en profundidad sellándose con parafina líquida para proporcionar una atmósfera anaeróbica. La presencia de arginina dihidrolasa se evidencia por un cambio del indicador, ocasionado por la producción de amonio a partir del aminoácido.

Las cepas se incubaron durante 14 días a 27 °C y se observaron diariamente.

Composición del medio de Thornley

Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4)	0,3 g
Arginina HCL	10,0 g
Agar - agar	3,0 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua destilada	1,0 L
Ajuste de pH 7,2	

6. Citocromo oxidasa

La prueba de la oxidasa permite detectar la presencia del citocromo C como último receptor de electrones en la cadena respiratoria. Para ello se utiliza una solución de tetrametil-p-fenilendiamina al 1 %, compuesto que sustituye al O₂ como receptor terminal de electrones produciendo una coloración rosada por la acción de la citocromo oxidasa.

Para la realización de la prueba se utilizaron cultivos sobre KB de 2 días de incubación en estufa a 23 °C. Una colonia del microorganismo problema se deposita sobre un cubre objetos y se vierten unas gotas de agua destilada estéril, se homogeniza la muestra y se agrega un disco de papel impregnado con un substrato de N,N-dimetil-1,4-phenylene diammonium dichloride 0.1µmol, 1-naphtol 1.0 µmol. Este substrato puede ser reducido por la enzima citocromo oxidasa en presencia de oxígeno molecular, dando lugar a la formación de una molécula de color rosado. La presencia de oxidasa se pone de manifiesto rápidamente por la aparición del color rosado después de 10 segundos.

7. Levano

Esta prueba se fundamenta en la producción de polímeros de glucosa y levulosa en un medio con alta concentración de sacarosa. Para ello se siembra una placa de AN + sucrosa, se incuba a 25 ° C por 2 – 5 días y se observa el crecimiento. Las placas que presenten colonias bacterianas blancas, muy convexas y mucoides o estrías muy abultadas se consideran positivas.

Composición del medio

Agar nutritivo	31,0 g
Sucrosa	50,0 g
Agua destilada	1,0 L

8. Pudrición de papa

Esta prueba permite detectar la producción de protopectinasas por parte de la bacteria problema. La prueba consiste en colocar en cámara húmeda rodajas de papa previamente desinfectadas e inocular con la bacteria problema por pinchadura en la zona central. Si la bacteria produce protopectinasas se observa el reblandecimiento de los tejidos de la papa.

9. Hipersensibilidad de tabaco

Para cada aislamiento se realizó la prueba de reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco (*Nicotiana tabaco* cv Xhanti y Sansumg) por inyección de una suspensión conteniendo 10^8 ufc ml^{-1} . Las plantas así inoculadas se colocaron en un ambiente controlado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 h p para observar la reacción.

La reacción hipersensible es el resultado de un sistema incompatible hospedante-patógeno y se evidencia por el colapso de las células en la zona de infiltración después de 24 o 48 horas.