

**Innovaciones Tecnológicas Agropecuarias S.A.**

**Estudio Exploratorio N° PSA 021/06**



**Informe Final**

**Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva**

**PROGRAMA DE PRODUCCION Y SANIDAD AGROPECUARIA**

**DIRECCION NACIONAL DE PROGRAMAS Y PROYECTOS ESPECIALES**

**- Diciembre de 2006 -**

## INDICE

	Pág.
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
3. Particularidades de la enfermedad.....	4
4. Sintomatología.....	5
5. Manejo de la roya de la soja.....	7
6. El diagnóstico como factor clave de éxito.....	8
6.a. Método de diagnóstico rápido.....	9
7. Objetivos y Alcances del Proyecto.....	11
8. Metodología Aplicada.....	11
8.I. Método Elisa.....	11
8.I.1. Protocolo resumido del método de Elisa.....	14
8.I.2. Materiales necesarios para la prueba de Elisa.....	14
8.I.3. Preparación de soluciones.....	14
8.I.4. Preparación de muestras.....	14
8.I.5. Prueba de Elisa.....	15
8.I.6. Resultados.....	18
8.I.7. Conclusiones del método.....	34
8.II. Desarrollo del método de las “tiritas”	37
.....	37
8.II.1. Método de las tiritas - Protocolo 1.....	37
8.II.1.a. Materiales.....	37
8.II.1.b. Metodología desarrollada .....	38
8.II.1.c. Evaluaciones con las “tiritas”.....	39
8.II.1.d. Interpretación de los resultados.....	40
8.II.1.e. Resultados.....	44
8.II.2. Validación del método de las tiritas - Protocolo 2.....	44
8.II.2.a. Metodología desarrollada en Pergamino y Cerro	46
Azul...	50
8.II.3. Conclusiones del método.....	51
9. Costos beneficios de la aplicación de la metodología de diagnóstico..	53
9.I. Estimación del costo-beneficio de la metodología.....	55
9.II. Interpretaciones sobre las ventajas del método.....	56
9.III. Conclusiones.....	57
10. Estrategias futuras.....	58
Agradecimientos.....	60
Anexo I.....	
Anexo II. Informe de rendición de gastos.....	

Nuestra empresa, constituida mayoritariamente por el INTA y organizaciones del sector Rural, tiene como prioridad generar negocios de base tecnológica, de aplicación en los ámbitos agropecuario, agroalimentario y agroindustrial.

La concreción de un negocio implica la sumatoria de una serie de actividades y eventos de distinto orden, marco en el cual la evaluación de situaciones previas a la propia actividad comercial adopta un rol sumamente importante, particularmente cuando de procesos innovativos se trata.

INTEA ha participado oportunamente de similares convocatorias propiciadas por la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. En esta oportunidad lo ha hecho convencida de la importancia estratégica de sumar capacidades expertas y facilidades adecuadas, para generar una nueva herramienta, basada en el conocimiento, orientada al desarrollo de un producto/servicio de apropiación por los diversos actores que intervienen en la cadena de valor de la soja.

Ing. Roberto Mario Delafosse  
Gerente  
INTEA S.A.

## **INFORME FINAL**

**Estudio Exploratorio PSA 021/06**

### **Programas y Proyectos especiales**

**Título del Proyecto:**

#### **Validación de un nuevo método para la detección temprana de la Roya de la Soja en la Argentina**

**Entidad Beneficiaria: INTEA S.A.**

**Coordinador del Proyecto y Responsable ante el PyPE:**

Ing. Agr. Néstor A. Moris – Area Agronegocios de INTEA S.A.

**Responsable Técnico:**

Dr. Antonio Ivancovich, Sección Fitopatología del INTA Pergamino

## **1. INTRODUCCION**

El Estudio Exploratorio para validar un nuevo método para la detección temprana de la roya de la soja en Argentina, fue presentado por INTEA en el mes de octubre de 2005 y aprobado en abril de 2006, por la Comisión del Programa de Producción y Sanidad Agropecuaria.

La realización del presente Estudio estuvo a cargo del Dr. Antonio Ivancovich y el Ing. Agr. Néstor Moris, en su ejecución participaron profesionales de la Sección Fitopatología de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA Pergamino y consultores privados, más la colaboración de técnicos de las Estaciones Experimentales del INTA Cerro Azul (Misiones) y Yuto (Jujuy).

Conforme a las pautas establecidas en la normativa de los Estudios Exploratorios y cumplidas las actividades programadas, se elabora el presente Informe Final con los resultados alcanzados. Las actividades se iniciaron en los primeros días del mes de mayo de 2006 y culminaron en el mes de octubre del mismo año. Los tiempos reales para llevar adelante el Estudio se dilataron 20 días más de lo previsto, ante imprevistos personales y/o profesionales de los técnicos participantes.

Culminado el trabajo, se dispone de una base de conocimientos promisorios y pautas para la aplicación de la nueva metodología de diagnóstico, que necesariamente deberá complementarse con mayores experiencias en condiciones reales de infestaciones de roya en el gran cultivo.

## **2. ANTECEDENTES**

### **a. Importancia de la roya de la soja**

La soja es el principal cultivo que se realiza en país. Durante la campaña 2005/06, la superficie sembrada con soja rondó las 16,5 millones de hectáreas (53 % del total cultivado con cereales y oleaginosas), con una producción de 38,3 millones de toneladas (casi el 50% del total granario).

La roya de la soja es una enfermedad de alto riesgo por sus potencial impacto económico, la amplia difusión geográfica que la misma ha alcanzado en el país, la carencia de resistencia genética, la permanente presencia de inóculo y la alta probabilidad que se den condiciones ambientales favorables para su desarrollo, torna necesario profundizar los conocimientos sobre el patógeno y continuar con instrumentos programáticos que atienda las demandas del sector agropecuario, en particular las de minimizar los daños productivos y sus consecuencias económicas.

La magnitud del problema se focaliza en varios factores claves que son motivo de atención, caso del comportamiento de las variedades, la incidencia de las fechas de siembra, la presencia de hospedantes alternativos y las condiciones ambientales en cada región.

Por tratarse de una enfermedad de naturaleza “explosiva”, que en pocas semanas puede devastar los lotes de cultivo, el éxito de las medidas de control químico –por el momento lo más eficaz para el control de la enfermedad- depende fundamentalmente de su detección temprana y de la oportunidad y calidad de aplicación de fungicidas, por lo que es imprescindible realizar un exhaustivo monitoreo de los lotes de cultivo.

Para ello es esencial contar con sistemas de alarmas e información centralizada y actualizada que contribuya a la detección oportuna de la enfermedad, y que asimismo, constituyan en una herramienta de diagnóstico regional, analizando su evolución en el espacio-temporal.

Se dispone de un sistema de prospección y vigilancia fitosanitaria de la roya de la soja, coordinada entre los organismos responsables (SINAVIMO), por el que se realizan permanentes registros en "lotes de observación" en todas las regiones sojeras.

Durante el período vegetativo del cultivo, las parcelas de observación son monitoreadas cada 15 días, incrementándose la presión de monitoreo a partir de floración, momento en que las prospecciones se realizan al menos semanalmente. Desde diciembre de 2003, se hacen monitoreos semanales en las regiones NEA y NOA. En el resto del área sojera, se efectúan en forma quincenal y/o mensual según la etapa del cultivo.

En el ciclo del cultivo 2003/2004, la enfermedad fue detectada por monitores oficiales y privados en lotes de cultivos de varias provincias argentinas, todas ellas pertenecientes a la denominada ZONA 1 o de mayor riesgo debido a ocurrencia de condiciones ambientales favorables para el desarrollo del patógeno y su cercanía con las fuentes de inóculo primarias (Paraguay, Bolivia y Brasil).

Si bien la roya no ocasionó pérdidas económicas debido a su aparición tardía en el ciclo del cultivo, fue detectada e inmediatamente oficializada por el SINAVIMO en las provincias de Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Chaco, Salta, Tucumán, Catamarca y Santa Fe.

#### **b. Antecedentes en países vecinos:**

En **Paraguay**, durante el ciclo 2002/03, la roya de la soja afectó el 70-80% del área de producción, habiéndose recurrido al control químico para disminuir las pérdidas (Morel Paiva, 2003).

En **Brasil**, para el ciclo (2001/02) ya se había extendido al 60% del área sojera, detectándose su presencia en los estados de Río Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás y el extremo sur de Mato Grosso. Pérdidas de rendimiento entre 30 y 75% se registraron en varios municipios, como Chapadão do Sul, Chapadão do Céu y Costa Rica (en Mato Grosso do Sul), y Alto Taquarí, Alto Araguaia y Alto Garças (en Mato Grosso).

Los cultivos más afectados rindieron entre 840 y 900 kg/ha. Las estimaciones al final del ciclo concluyeron en que más de 400.000 hectáreas tuvieron pérdidas cercanas a los 25 millones de dólares (Yorinori, 2003).

### 3. PARTICULARIDADES DE LA ENFERMEDAD

La roya es una enfermedad de alto potencial destructivo que afecta al cultivo de la soja, es causada por dos especies de hongos: *Phakopsora pachyrhizi*, originaria de Asia, y *Phakopsora meibomia*, originaria de Sudamérica. La especie asiática es más virulenta y agresiva que la sudamericana, por lo tanto causa mayores daños económicos. Desde su identificación a comienzos del siglo pasado en Asia, la roya ha provocado severos daños en lotes de soja ubicados en varios continentes.

La especie asiática fue encontrada en Hawaii en 1994, y causa considerables pérdidas de rendimiento en varios países asiáticos, hasta 40% en Japón y 80% en Taiwán. En los EEUU el riesgo de la roya de la soja está siendo investigado desde la década del 70' por el USDA (Departamento de Agricultura de los EEUU). En Brasil y Paraguay la forma asiática de la roya de la soja ha sido observada desde los años 2001 y 2002. En ese mismo período fue encontrada en la provincia de Chaco, Argentina (comunicación personal, Ing. de Alvarez, de la Universidad del NE, Corrientes).

El patógeno no perdura en los rastrojos ni existen evidencias de transmisión por semilla, razón por la cual las pérdidas se dan exclusivamente en las etapas del cultivo. De todos modos el hongo para sobrevivir, necesita la presencia de tejido vivo, caso de la soja "guacha" y de otras especies que actúan como hospedantes, que le permiten perpetuarse de una campaña a otra.

La germinación de esporas ocurre con un mínimo de 6 horas de rocío y temperaturas entre 8 y 36° C, con un óptimo entre 16 y 24° C. La infección ocurre también con un mínimo de 6 horas de rocío y temperaturas entre 11 y 28° C, con un óptimo entre 19 y 24° C. Con temperaturas de 22 a 27° C, los urediniosoros maduran entre los 6 a 7 días después de infección.

Bajo condiciones ambientales favorables, en el término de 10 a 11 días el hongo tiene capacidad de producir abundantes urediniosporas, propio de un patógeno policíclico (varias generaciones durante el ciclo del cultivo de la soja). Asimismo, penetra en forma directa a través de la cutícula y la epidermis del hospedante, lo que hace que la infección sea rápida y fácil.

Datos de la EEA INTA Pergamino registrados en varias temporadas del cultivo de soja, revelaron que se presentaron condiciones climáticas favorables para la roya en el mes de enero, con períodos de más de diez días de seis o más horas de rocío continuo y temperaturas máximas promedios aproximadas a 25-26°C (Ivancovich, 2003).

**El mayor efecto negativo de la enfermedad es la madurez anticipada y la disminución del rendimiento** y el período de mayor susceptibilidad de la soja se extiende desde floración (R1) y comienzo de fructificación (etapa R3) hasta tamaño máximo de semilla (R6). Si se detecta la enfermedad en esos estadios, la aplicación de funguicidas tiene resultados positivos, **no siendo recomendable el control químico con posterioridad al estadio R6**, ya que si el hongo ataca en períodos más avanzados, no tiene consecuencias sobre los rendimientos.

La enfermedad se presenta en forma bastante uniforme en el lote y, a medida que la infección prospera, comienzan a aparecer pequeñas pústulas de color marrón. Estas lesiones son más abundantes y pueden ser visualizadas mejor en el envés de las hojas, aunque también pueden presentarse en pecíolos, tallos y vainas.

Se recomienda recorrer los lotes de cultivo con una frecuencia semanal, especialmente a partir de floración, prestando especial atención al amarillamiento de las hojas basales.

**En síntesis, las características de la enfermedad son:**

- Presenta lesiones o manchas muy diminutas
- Se confunde con otras enfermedades del cultivo
- Se presenta inicialmente en las hojas inferiores (ocultas) y asciende posteriormente hacia las superiores
- Forma pústulas en el envés e las hojas
- Se visualiza dificultosamente con lupas de menos de 20 aumentos

#### **4. SINTOMATOLOGIA**

Aunque los síntomas de la roya pueden presentarse en cualquier momento del ciclo del cultivo, se hacen más evidentes en plantas próximas a floración, y progresan desde las hojas inferiores hacia las superiores.

Los síntomas se visualizan mayormente en el envés, como lesiones de color amarillo que posteriormente se tornan marrón y marrón-rojizo. Sobre estas lesiones se forman estructuras globosas denominadas urediniosoros, que liberan urediniosporas a través de un poro central. Durante los últimos estados de la enfermedad se forman otras estructuras, de color pardo oscuro, denominadas telios, que contienen teliosporas.

Los síntomas de la roya se pueden confundir con los causados por la mancha marrón (*Septoria glycines*) y la pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*).

Las urediniosporas, pueden sobrevivir hasta 50 días, y son fácilmente dispersadas por el viento, lo que posibilita que la enfermedad pueda ser diseminada a grandes distancias geográficas.

El agente causal de la roya es un patógeno policíclico (varias generaciones durante el ciclo del cultivo de la soja), con capacidad de producir abundantes urediniosporas bajo condiciones ambientales favorables. Penetra en forma directa a través de la cutícula y la epidermis del hospedante, lo que hace que la infección sea rápida y fácil.

El nivel de pérdidas causado por la roya depende del estado fenológico en que comienzan los síntomas, y de la severidad de los mismos. El mayor efecto negativo de la enfermedad sobre el cultivo se relaciona con la madurez anticipada y el rendimiento del mismo. (foto 1)

**Foto 1: Sintomatología de Roya de la Soja**



## 5. MANEJO DE LA ROYA DE LA SOJA

Hasta tanto no se dispongan de cultivares de buen comportamiento frente a la enfermedad, la aplicación de fungicidas foliares apenas se detecten los primeros síntomas, constituye la única herramienta factible de ser utilizada para minimizar los daños causados por la roya.

La detección temprana de la roya es importante porque la enfermedad evoluciona muy rápidamente en pocos días. Para un eficiente manejo de la enfermedad, además de la detección temprana de la misma, es necesario el uso de un buen fungicida y la correcta aplicación del mismo. Si las condiciones favorables para la enfermedad persisten durante un tiempo prolongado, pueden ser necesarias varias aplicaciones.

### **Estudios y análisis consecuentes:**

. **Análisis climáticos:** En las experimentales del INTA que disponen de estaciones meteorológicas se continúa con el estudio de las condiciones climáticas, especialmente los datos de temperatura, rocío y vientos predominantes en las zonas.

. **Detección de esporas de roya:** Se han instalado más dispositivos caza esporas de roya en las áreas donde ya se ha manifestado la enfermedad y en las que se encuentran en las cercanías de las mismas. Se ha contemplado la instalación de estos equipos en Gob. Virasoro y Santo Tomé (Corrientes), Reconquista y San Justo (Santa Fe), Marcos Juárez (Córdoba), Pergamino (Buenos Aires) y Concepción del Uruguay y Paraná (Entre Ríos).

. **Implantación de ensayos de variedades en micro y macroparcels en diferentes localidades del NOA.** Destinado a conocer la reacción de las variedades a la enfermedad, evaluarlas en función de su comportamiento y determinar su grado de tolerancia (productividad de las variedades susceptibles).

. **Obtención de cultivares con resistencia a la roya de la soja.** El primer paso es tratar de conseguir germoplasma con resistencia a la enfermedad para ser utilizado como progenitores. A partir de la campaña 2003/04 se llevan a cabo cruzamientos entre materiales que podrían tener alguna fuente de resistencia y cultivares y líneas avanzadas adaptadas a las condiciones agroecológicas del NOA. Hasta el momento no se conocen resultados promisorios en este sentido.

**Implantación de ensayos de control químico.** Destinado a conocer el comportamiento de los fungicidas disponibles en el mercado y productos en experimentación. Se están evaluando diversos ingredientes activos, con énfasis en los pertenecientes a los grupos de los triazoles y las estrobilurinas, así como mezcla de ambos.

## **6. EL DIAGNOSTICO COMO FACTOR CLAVE DE EXITO**

Los síntomas (lesiones cloróticas y necróticas) y los signos (pústulas) de la roya asiática de la soja no se identifican con la misma facilidad que los de las demás royas en otros cultivos, lo que determina que sea una enfermedad de difícil diagnóstico. Se presenta mayormente en las hojas inferiores formando pústulas en el envés de las hojas que deben ser visualizadas con lupas de no menos de 20 aumentos.

La forma de monitoreo que más se recomienda para la detección temprana de la roya en el cultivo, resulta bastante engorroso y lleva tiempo confirmar la infección, es decir hasta la visualización de los síntomas y signos de la enfermedad, requiere recolectar hojas “sospechosas” y guardarlas por lo menos 24 horas en ambientes preparados y adecuados (cámaras húmedas) para que dichos síntomas y signos logren hacerse visibles.

El sistema de monitoreo “oficial”, implementado por el SINAVIMO mediante un accionar coordinado entre diferentes estaciones experimentales, universidades nacionales y organismos privados, permite analizar una gran cantidad de muestras para realizar la detección, seguimiento y evolución de la enfermedad, aún así los monitores encuentran a menudo dificultades para confirmar la presencia de la misma, siendo las principales razones las siguientes:

- Poder visualizar y confirmar su presencia ante bajos niveles de infección.
- La necesidad de analizar numerosas muestras y prepararlas en cámaras húmedas.
- La dificultad de lograr una escala patrón de intensidad de ataque que sirva de modelo único y común para todos los monitores.
- La necesidad de satisfacer rápidamente las inquietudes de productores y asesores.
- La presencia de otros síntomas y adversidades que enmascaran y/o confunden la sintomatología.

Aún así, ha quedado demostrado que el monitoreo oportuno, es fundamental para un manejo racional de la roya asiática y todo lo que contribuya a mejorarlo y perfeccionarlo, resultará clave para ajustar la oportunidad de las medidas de control y reducir los riesgos del cultivo.

#### **a. Método de diagnóstico rápido**

La empresa norteamericana Enviroligix de los EEUU ha desarrollado un método inmunológico en formatos ELISA y flujo lateral “tiritas” que permiten detectar la presencia de la roya de la soja en una temprana fase de su desarrollo de manera sencilla, rápida e ideal para el monitoreo en campo, la citada empresa ha desarrollado “kits” de diagnóstico en dos formatos:

**I - El primer formato** es comúnmente denominado Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, conocido como “ELISA”, el cual detecta el antígeno de interés inmovilizado sobre una superficie sólida por anticuerpos que indirectamente producen una reacción calibrable espectofotométricamente y en ciertos casos observable a simple vista.

El ensayo ELISA consiste en una microplaca de 96 pocillos de plástico tratados con anticuerpos que han sido desarrollados por ELIX precisamente para detectar la roya de soja en una temprana fase de desarrollo. La microplaca es desmontable en 12 filas de 8 pocillos cada uno y viene empacado con una serie de accesorios. ELISA suele utilizarse en laboratorios por personal técnico adecuadamente entrenado y produce resultados en menos de dos horas (foto 2).

**Foto 2: Método Elisa**



El juego (kit) de Elisa permite detectar una simple infección causada por el agente causal de la roya de la soja (*Phakopsora* spp.), en estados tempranos de infección, aún antes de ser visibles las pústulas y/o esporas.

El método permite separar la reacción de la originada por otros agentes causales de roya (*Uromyces* spp. y *Puccinia* spp.) u otras infecciones causadas por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Penicillium*, *Septoria* y *Rhizopus*.

**II – El segundo formato** es denominado de flujo lateral, inmunostrip o de las “Tiritas”, que combina anticuerpos de captura con anticuerpos de detección. Las “Tiritas” permiten detectar la presencia del antígeno a simple vista cuando se encuentra presente en la muestra por encima de cierto nivel estipulado por las especificaciones técnicas (foto 3).

Las “Tiritas” son recomendadas para su uso en condiciones de campo, no requieren entrenamiento especializado y producen resultados en pocos minutos.

**Foto 3: Método de flujo lateral (de la tiritas)**



## 7. OBJETIVOS Y ALCANCES DEL PROYECTO

### a. El Estudio Exploratorio plantea los siguientes objetivos:

- Validar la eficacia de los “Kits” o juegos de diagnóstico para la detección de la roya en diferentes momentos y condiciones de cultivo.
- Determinar y ajustar la metodología de muestreo a campo y en laboratorio.
- Determinar costos y beneficios de la metodología.

### b. Impacto esperado del Estudio:

- Detección anticipada y oportuna de la presencia de la roya.
- Mayor tiempo para tomar previsiones, organizar, implementar y eficientizar los aspectos logísticos del control químico (disponibilidad de equipos y productos en momentos de máxima demanda).
- Reducción de la contaminación ambiental y de los costos de producción, al desalentar las “aplicaciones preventivas”.
- Contribuir a la determinación del momento óptimo de control de la enfermedad, de manera de minimizar los daños y las consecuentes pérdidas de rendimiento del cultivo de la soja.

## 8. METODOLOGÍA APLICADA

**8.I. Método Elisa:** Se evaluó la eficacia de este método (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para el diagnóstico temprano de la roya en muestras de:

- 1: Soja de las provincias de Chaco, Corrientes, Misiones, Tucumán, Salta, Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba y Buenos Aires.
- 2- Hospedantes alternativos incluyendo: Plantas guachas/voluntarias de soja, de soja perenne (*Neonotonia* spp.), poroto (*Phaseolus* spp.) (colorado, blanco, dolicho, alubia, chaucha larga, pallares), kudzú (*Pueraria lobata*), guandú/Cajanus (*Cajanus cajan*), mucuna (*Stylobium niveun*), caupí, vigna, Trébol rojo, Trébol blanco, Lotus, Lupino y Crotalaria.

- 3- Hospedantes no alternativos (malezas).
- 4- Soja con síntomas de otras enfermedades.
- 5- Discos de tejidos con síntomas y sin síntomas (de la misma hoja) de roya de la soja.
- 6- Diferentes tamaños de muestra, uno y dos discos de la misma hoja, y uno o dos discos de dos hojas diferentes.
- 7- Infecciones nuevas y viejas.

Los “kits” o juegos de Elisa fueron provistos por la empresa Enviroligix de EEUU, y consisten en: platos conteniendo los anticuerpos de la roya de la soja; conjugados de la enzima; y reactivos tales como: soluciones Buffer de extracción, sustrato y solución para detener la reacción. Las evaluaciones se hicieron sobre muestras de hojas de soja (A1) y de hospedantes alternativos de roya de la soja (A2).

#### **8.1.a.- Soja:**

- Muestra de campo, lote de producción, ensayos, plantas guachas, soja perenne. Soja de lotes tratados con fungicidas.
- Invernáculo: Diferentes especies y con inóculo de diferentes lugares del país.

#### **8.1.b. - Hospedantes alternativos:**

- Porotos (colorado, blanco, dolicho, alubia, chaucha larga, pallares); Kudzú, Guandú, Mucuna, Caupí, Vigna, Trébol rojo, Trébol blanco; Lotus; Lupino; Crotalaria.

Las determinaciones se hicieron considerando las siguientes variables:

- Muestras frescas: recolectadas en el día, o durante la semana.
- Muestras herborizadas: recolectadas más de una semana atrás y herborizadas (secas).
- Muestras con mucha roya (alta severidad o número de pústulas por hoja). Síntomas visibles a simple vista.

- Muestras con poca roya (baja severidad, con 1 a 5 pústulas por hoja).  
Síntomas difíciles de observar a simple vista.
- Muestras de distintas localidades de Argentina.
- Hojas con pústulas nuevas, viejas, y muertas.
- Hojas con síntomas aparentes de la enfermedad, pero sin manifestación visible del patógeno causal.
- Hojas sin síntomas de roya.
- Hojas con síntomas de otras enfermedades, similares a la roya.
- Disco extraído dentro de la zona de la pústula
- Disco extraído fuera de la zona de la pústula

**8.1.c. Se evaluó el tamaño más adecuado de muestra**, en cuanto al número de hojas (folíolos) a analizar y la capacidad de detectar la enfermedad, lo que permitirá orientar y facilitar los ajustes que en el futuro habrá que efectuar a campo, en cuanto al número mínimo de muestras a utilizar por cada lote de soja a analizar.

Se evaluaron 1 y 2 discos de una misma hoja, y 1 o dos discos de diferentes hojas. El objetivo es comprobar si es posible utilizar menor número de muestras para detectar la roya, y de esa manera hacer más económico el método al reducir el número de pocillos/tiritas a utilizar en las pruebas.

**8.1.d. Se evaluó el método sobre muestras de soja inoculadas artificialmente en condiciones de laboratorio e invernáculo** y con seguimiento diario durante una semana posterior a las mismas. Las inoculaciones se realizaron en los invernáculos de Fitopatología del INTA Pergamino.

**8.1.e. Validaciones y ajustes de metodología de muestreo** en diferentes momentos del cultivo (estados fenológicos) y en áreas cultivadas de la región centro y norte del país.

*Esta actividad no se pudo llevar a cabo porque el trabajo se inició cuando la temporada del cultivo de soja estaba terminada.*

### 8.1.1. Protocolo resumido del método de Elisa

El juego (kit) para la determinación de roya de la soja incluye:

- Antígeno/anticuerpo de roya de la soja.
- Enzima conjugada de roya de la soja.
- Solución buffer para extracción de hoja de soja.
- Solución para lavado de buffer.
- Sustrato.
- Solución para detener reacción (stop solution).

### 8.1.2. Materiales necesarios para la prueba de Elisa

- Pipetas de 100  $\mu$ L.
- Marcadores indelebles.
- Etiquetas.
- Timer.
- Agua destilada o de ionizada para preparar la solución de lavado del Buffer y para diluir el Buffer de extracción de la hoja de soja.
- Recipientes (erlenmeyers) de 250 cc para solución de extracción Buffer y de 1000 cc para solución de lavado de Buffer.
- Lector de discos/platos (espectrofotómetro)..
- Agitador.

### 8.1.3. Preparación de soluciones

- **Buffer para lavado:** Se agrega el contenido del sobre con las sales del buffer de lavado (fosfato salino, pH 7.4 y Tween 20) a un litro de agua destilada deionizada. Se agita para disolver, se almacena en refrigerador, y antes de su uso se deja a temperatura ambiente.

- **Buffer para extracción:** Se agrega el contenido de la botella con la solución buffer de extracción a 200 cc de agua destilada desionizada, se mezcla para disolver y almacena en refrigerador, y antes de su uso se deja a temperatura ambiente.

### 8.1.4. Preparación de muestras

Se utilizan microtubos identificados donde se colocan un disco de tejido foliar de aproximadamente 10 mm de diámetro, obtenido por presión de la tapa del microtubo sobre la hoja (tipo sacabocados).

Se trata de lograr parte de la hoja con síntomas/signos de roya de la soja. Se macera el tejido con un pestle (pequeño objeto punzante) en el microtubo con 300 ul de solución buffer de extracción, hasta obtener un líquido verdoso (foto 4). Se debe tener especial cuidado de no producir contaminaciones entre muestras. El primero de los microtubos se deja en blanco, sin agregar tejido foliar (testigo negativo) y el segundo se destina al control positivo (provisto por Envirologix). A continuación todas estas muestras son sometidas a la prueba de Elisa.

**Foto 4: Extracción de muestras con microtubo y macerado con pestle**



#### **8.1.5. Prueba de Elisa**

-Los platos contienen tiras de 8 pozos, que deben ser claramente identificados, y en los cuales se colocan 100 ul de la muestra a investigar. Se mezcla suavemente, se cubre el plato con papel microfilm y se coloca en un agitador orbital durante una hora.

-Se lava varias veces con buffer y agua destilada, y se seca sobre papel hasta eliminar la humedad.

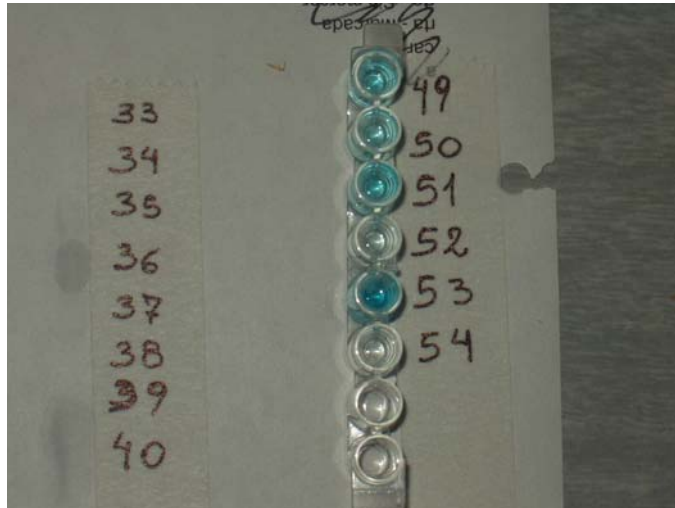
-Se agrega 100 ul del conjugado de la enzima en todos los pozos, se mezcla suavemente, se cubre con papel microfilm y se deja en un agitador orbital por una hora.

-Se lava varias veces con buffer y agua destilada, y se seca sobre papel hasta eliminar la humedad.

-Se agrega 100 ul de sustrato en todos los pozos, se mezcla suavemente, se cubre con papel microfilm y se deja en un agitador orbital durante 20 minutos.

-Se agrega solución stop para detener la reacción. El color observado en las muestras positivas es azul (foto 5), mientras que las negativas no presentan ninguna coloración.

**Foto 5: las muestras positivas se presentan en azul**



Luego de agregar la solución stop las muestras de color azul viran al amarillo (foto 6). Finalmente se leen los resultados en un espectrofotómetro (foto 7).



**Foto 6: Las muestras positivas viran del azul al amarillo.**

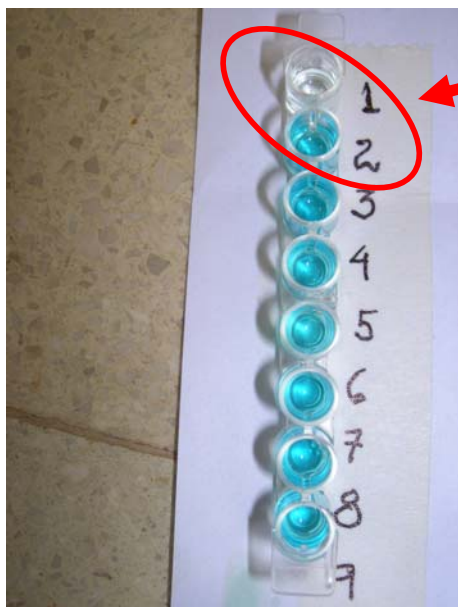
**Foto 7: lectura mediante espectrofotómetro**



El resultado final de las pruebas se expresa como un índice que surge de la relación entre los valores de absorvancia de las muestras analizadas y del testigo o blanco (o sea el testigo sin muestra de tejido vegetal). El valor considerado como positivo (índice) para roya de la soja surge de la siguiente relación:

$$\text{Índice} = (\text{Absorvancia blanco} \times 3) - (\text{Absorvancia muestra})$$

Cuando el valor del índice es igual o superior a la absorvancia de la muestra, la misma se considera positiva para la presencia de roya de la soja. Todas las pruebas incluyen en sus dos primeros lugares a un testigo (sin tejido vegetal) y a un control positivo (provisto por el kit de Elisa) (foto 8).



**Foto 8: prueba con la muestra testigo (1) y la de control positivo (2)**

## 8.1.6. Resultados

### Evaluaciones del método de Elisa en soja y en hospedantes alternativos.

En las regiones del NEA (Corrientes y Misiones) se detectaron las primeras infecciones de roya en diciembre 2005 y enero 2006, mientras que en las provincias de Chaco y Formosa fueron en abril y mayo 2006.

En regiones del norte de Santa Fe y de la provincia de Entre Ríos se detectaron las primeras infecciones a comienzos de marzo, mientras que en el resto de la Pampa Húmeda (centro y sur de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires) las primeras infecciones se detectaron desde mediados de abril.

**Cuadro 1**

Muestra	Tipo de Muestra (Hospedante-Localidad)	Absorvancia	Indice (x)	Resultado
1	Blanco	0,176	-----	-----
2	Control Positivo	2,922	2,394	POSITIVO
3	Soja fresca con mucha roya Misiones	1,190	0,662	POSITIVO
4	Soja fresca con poca roya (de la pústula) Esperanza (SF)	1,133	0,605	POSITIVO
5	Soja fresca con poca roya (lejos de la pústula) Esp. (SF)	1,131	0,603	POSITIVO
6	Kudzu fresco con roya Misiones	1,105	0,577	POSITIVO
7	Guandú Misiones	0,644	0,116	NEGATIVO
8	Poroto NAG 12 Misiones	0,916	0,388	NEGATIVO
9	Alubia Misiones	0,498	0,030	NEGATIVO
10	Poroto colorado Misiones	0,75	0,222	NEGATIVO
11	Chaucha larga Misiones	0,562	0,034	NEGATIVO
12	Vigna herborizado Misiones	0,217	-0,311	NEGATIVO
13	Trébol rojo Misiones	0,534	0,006	NEGATIVO
14	Lupino Misiones	0,283	-0,245	NEGATIVO
15	Soja de invernáculo Pergamino - sin síntomas	0,302	-0,226	NEGATIVO
16	Planta maleza (no hospedante) Pergamino	0,199	-0,329	NEGATIVO

(x) Índice= Absorvancia muestra - (Absorvancia blanco x 3)

Absorvancia blanco x 3 = 0,176 X 3 = 0,528

Índice > 0,528 Positivo

Ejemplos:

Muestra 2:  $2,922 - 0,528 = 2,394 > 0,528$  - POSITIVO  
 Muestra 3:  $1,190 - 0,528 = 0,662 > 0,528$  - POSITIVO  
 Muestra 4:  $1,133 - 0,528 = 0,605 > 0,528$  - POSITIVO  
 Muestra 5:  $1,131 - 0,528 = 0,603 > 0,528$  . POSITIVO  
 Muestra 6  $1,105 - 0,528 = 0,577 > 0,528$  - POSITIVO  
 Muestra 7:  $0,644 - 0,528 = 0,116 < 0,528$  NEGATIVO

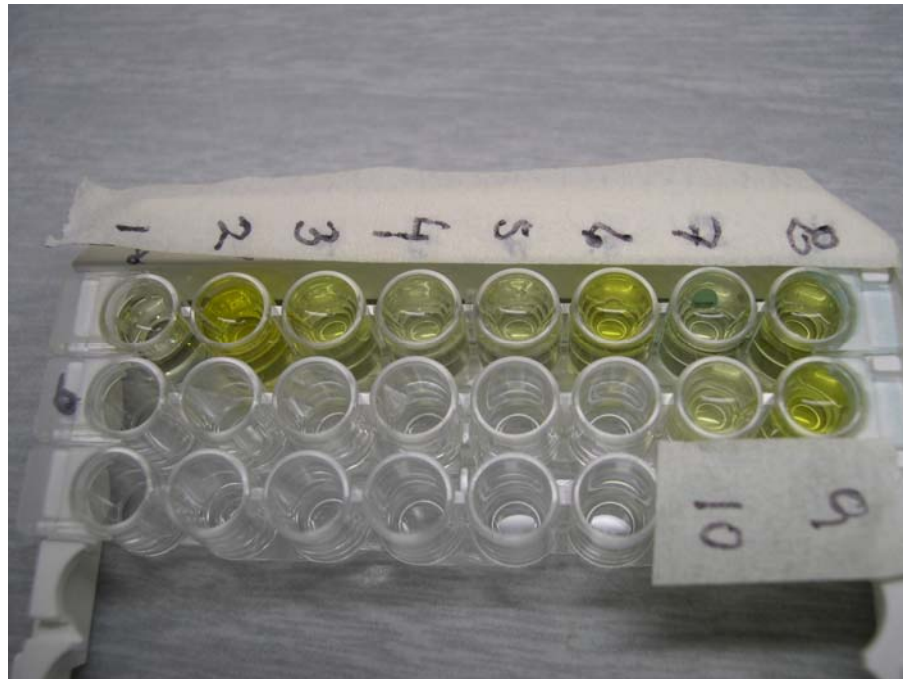
### **Interpretación de los resultados:**

Se analizaron 16 muestras de soja (de Esperanza, Pergamino y Misiones), hospedantes alternativos procedentes de Misiones y hospedante no conocido como alternativo (maleza) de Pergamino.

Los resultados de las muestras 3-6, fueron positivos para roya de la soja, coincidiendo con lo esperado. La muestra 5, con tejido tomado fuera de la zona con síntomas dio positivo al igual que la 4 que procedía de la zona afectada.

En las muestras restantes, que dieron negativas, si bien algunos de ellos son hospedantes alternativos de la roya de la soja, no presentaban síntomas de roya, por lo tanto no se esperaba ningún resultado determinado.

**Foto 9: Método de Elisa en Roya de la Soja**



**Cuadro 2**

Muestra	Tipo de Muestra (Hospedante-Localidad)	Absorvancia	Indice (x)	Resultado
1	<b>Testigo</b>	0,166	0,498	-----
2	<b>Control Positivo</b>	<b>2,895</b>	<b>2,397</b>	<b>Positivo</b>
3	Soja con mucha roya – Misiones	<b>1,132</b>	<b>0,634</b>	<b>Positivo</b>
4	Soja con poca roya (de la pústula) Esperanza (Santa Fe)	0,267	-0,231	<i>Negativo</i>
5	Soja con poca roya (lejos de la pústula) Esperanza (Santa Fe)	0,305	-0,193	<i>Negativo</i>
6	Soja sana ensayo campo INTA Pergamino	0,279	-0,219	<i>Negativo</i>
7	Soja sana invernáculo INTA Pergamino	0,193	-0,305	<i>Negativo</i>
8	Maleza No hospedante Pergamino	0,214	-0,284	<i>Negativo</i>
9	Kudzu Sin roya Pergamino	0,204	-0,294	<i>Negativo</i>
10	Kudzu Sin roya Pergamino	0,23	-0,268	<i>Negativo</i>
11	Guandú Misiones	0,468	-0,030	<i>Negativo</i>
12	Poroto Misiones	<b>1,047</b>	<b>0,549</b>	<b>Positivo</b>
13	Alubia Misiones	<b>1,156</b>	<b>0,658</b>	<b>Positivo</b>
14	Poroto colorado Misiones	0,865	0,367	<i>Negativo</i>
15	Chaucha larga Misiones	<b>0,996</b>	<b>0,498</b>	<b>Positivo</b>
16	Vigna Misiones	0,689	0,191	<i>Negativo</i>
17	Trebol rojo Misiones	0,788	0,290	<i>Negativo</i>
18	Lupino Misiones	0,805	0,307	<i>Negativo</i>
19	Poroto pallares Misiones	0,932	0,434	<i>Negativo</i>
20	Mucuna Misiones	0,673	0,175	<i>Negativo</i>
21	Poroto Dolicho Misiones	0,834	0,336	<i>Negativo</i>
22	Trebol blanco Misiones	0,519	0,021	<i>Negativo</i>
23	Kudzu con roya Misiones	<b>1,216</b>	<b>0,718</b>	<b>Positivo</b>
24	Kudzu con roya Misiones	<b>1,052</b>	<b>0,554</b>	<b>Positivo</b>
25	Guandú Misiones	0,839	0,341	<i>Negativo</i>
26	Caupí Misiones	0,391	-0,107	<i>Negativo</i>
27	Soja perenne Misiones	0,232	-0,266	<i>Negativo</i>
28	Soja perenne Misiones	0,942	0,444	<i>Negativo</i>
29	Lotus Misiones	0,558	0,060	<i>Negativo</i>
30	Soja Esperanza (Santa Fe)	0,252	-0,246	<i>Negativo</i>
31	Hoja Soja tratada c/fun.. Esperanza (S Fe)	0,275	-0,223	<i>Negativo</i>
32	Soja con mucha roya Misiones	<b>1,092</b>	<b>0,594</b>	<b>Positivo</b>

(x) Absorvancia muestra - (Absorvancia blanco x 3) = > 0,498 Positivo

Absorvancia blanco x 3 = 0,166 X 3 = 0,498

Indice > 0,498 Positivo

Ejemplos:

Muestra 2:  $2,895 - 0,498 = 2,397 > 0,498$  - POSITIVO

Muestra 3:  $1,132 - 0,498 = 0,634 > 0,498$  - POSITIVO

Muestra 4:  $0,267 - 0,498 = -0,231 < 0,498$  - NEGATIVO

Muestra 5:  $0,305 - 0,498 = -0,193 < 0,498$  - NEGATIVO

### Interpretación de los resultados:

Las muestras 3, 12, 13, 15, 23, 24 y 32 resultaron positivas para roya de la soja y correspondían a soja y otros hospedantes alternativos provenientes del INTA Cerro Azul, Misiones. Las muestras que resultaron negativas para roya de la soja provenían de:

-Hojas de soja con poca roya (baja severidad) (4 y 5), de Esperanza.

-Hojas de soja sanas (6, 7) de Pergamino y de Esperanza (30 y 31).

-Hospedantes alternativos de roya de la soja que no manifestaban síntomas de la enfermedad Kudzu (9 y 10) de Pergamino; y Guandú (11); Poroto colorado (14); Vigna (16); Trébol rojo (17); Lupino (18); Poroto pallares (19); Mucuna (20); Poroto Dolicho (21); Trébol blanco (22); Guandú (25); Caupí (26); Soja perenne (27 y 28) y Lotus (29), de Misiones.

**Cuadro 3**

Muestra	Tipo de Muestra (Hospedante-Localidad)	Absorvancia	Indice (x)	Resultado
1	<b>Blanco</b>	0,068		
2	<b>Control positivo</b>	<b>1,936</b>	<b>1,732</b>	<b>Positivo</b>
3	Soja con mucha roya Esperanza (SF)	<b>0,779</b>	<b>0,575</b>	<b>Positivo</b>
4	Soja con poca roya (de la pústula) Esperanza (SF)	<b>0,417</b>	<b>0,267</b>	<b>Positivo</b>
5	Soja con poca roya (lejos de la pústula) Esp. (SF)	0,13	0,074	Negativo
6	Soja con mildiu Esperanza (SF)	0,151	-0,053	Negativo
7	Soja inoculada con roya Esperanza (SF)	<b>0,789</b>	<b>0,585</b>	<b>Positivo</b>
8	Soja con bacteriosis Esperanza (SF)	0,117	-0,087	Negativo
9	Kudzu Sin Roya Pergamino	0,105	-0,099	Negativo
10	Kudzu Sin Roya Pergamino	0,181	-0,023	Negativo
11	Guandú con Roya Misiones	<b>0,651</b>	<b>0,457</b>	<b>Positivo</b>
12	Soja con Septoria Esperanza (SF)	0,166	-0,038	Negativo
13	Mucuna Con Roya Misiones	<b>0,507</b>	<b>0,303</b>	<b>Positivo</b>
14	Trebol blanco Misiones	0,372	0,168	Negativo
15	Caupí Misiones	0,219	0,015	Negativo
16	Lotus Misiones	0,282	0,078	Negativo
17	Soja con roya Esperanza (SF)	<b>0,858</b>	<b>0,654</b>	<b>Positivo</b>
18	1 disco/1 hoja Esperanza (SF)	0,172	-0,032	Negativo
19	2 discos de la misma hoja Esperanza (SF)	0,164	-0,040	Negativo
20	3 discos de la misma hoja Esperanza (SF)	0,162	-0,042	Negativo
21	2 discos/2 hojas Esperanza (SF)	<b>0,537</b>	<b>0,333</b>	<b>Positivo</b>
22	3 discos/3 hojas Esperanza (SF)	<b>0,516</b>	<b>0,312</b>	<b>Positivo</b>
23	Soja con roya púst.vieja Misiones	<b>0,787</b>	<b>0,583</b>	<b>Positivo</b>
24	Soja con roya esporas frescas Misiones	<b>0,603</b>	<b>0,399</b>	<b>Positivo</b>

Absorvancia blanco x 3 = 0,068 X 3 = 0,204

(X) Absorvancia muestra - (Absorvancia blanco x 3) = > 0,204 Positivo

Muestra 2: 1,936 – 0,204 = 1,732 > 0,204 - POSITIVO

Muestra 3: 0,779– 0,204 = 0,575 > 0,204 - POSITIVO

Muestra 4: 0,417– 0,204 = 0,213 > 0,204 - POSITIVO

Muestra 5: 0,130– 0,204 = -0,074 < 0,204 - NEGATIVO

## Interpretación de los resultados:

Las muestras que resultaron positivas para roya de la soja fueron:

- Soja con síntomas de roya (3, 4, 7 y 17), de Esperanza (Santa Fe) y de Misiones (23 y 24).
- Hospedantes alternativos, Guandú (11) y Mucuna (13), del INTA Cerro Azul de Misiones.
- Soja con dos discos de dos hojas (21), tres discos de tres hojas (22) resultaron positivas, mientras que la soja con un disco de una hoja (18) resultó negativa. Esto indicaría que sería más conveniente utilizar dos o tres discos de diferentes hojas para detectar la infección de roya.

La experiencia nos indica que es mejor la opción de dos discos de dos hojas, ya que cuando se colocan 3 discos de 3 hojas se hace muy engorroso el trabajo por la cantidad excesiva de material a colocar en los microtubos.

Las muestras que resultaron **negativas** para roya de la soja provenían de:

- Hojas de soja con poca roya (baja severidad) y disco tomado fuera de la zona de la pústula (5).
- Hojas con síntomas de mildiu (6), bacteriosis (8) y Septoria (12). Esto confirma que no existen reacciones cruzadas, o sea que la reacción es específica para roya de la soja.
- Hospedantes alternativos de roya de la soja que no manifestaban síntomas de la enfermedad, kudzu de Pergamino (9 y 10), trébol blanco (14), caupí (15) y lotus (16) de Misiones.
- Muestras compuestas de uno (18), dos (19) y tres discos (20) de la misma hoja, utilizadas para detectar diferencias entre tamaños de muestras.

Los resultados positivos de las muestras 23 y 24 nos demuestran que el método detecta infecciones nuevas y viejas.

**Cuadro 4**

Muestra	Tipo de Muestra (Hospedante-Localidad)	Absorvancia	Indice (x)	Resultado
1	Blanco	0,085	0,255	
2	Control Positivo	2,976	2,721	POSITIVO
3	Soja fresca con mucha roya	0,892	0,637	POSITIVO
4	Soja vieja con mucha roya (Misiones)	1,072	0,817	POSITIVO
5	Soja fresca con poca roya (con pústula)	0,641	0,386	POSITIVO
6	Soja fresca con poca roya (sin pústula)	0,109	-0,146	Negativo
7	Hoja con poca roya (con pústula)	0,465	0,210	Negativo
8	Hoja con poca roya (sin pústula)	0,460	0,205	Negativo
9	Hoja con poca roya (con pústula)	0,692	0,437	POSITIVO
10	Hoja con poca roya (sin pústula)	0,626	0,371	POSITIVO
11	Hoja con poca roya (con pústula)	0,843	0,588	POSITIVO
12	Hoja con poca roya (sin pústula)	0,297	0,042	Negativo
13	Hoja con poca roya (con pústula)	0,355	0,100	Negativo
14	Hoja con poca roya (sin pústula)	0,165	-0,090	Negativo
15	1hoja/1disco	0,190	-0,065	Negativo
16	2 discos de la misma hoja	<b>0,610</b>	<b>0,355</b>	<b>POSITIVO</b>
17	1hoja/1disco	0,212	-0,043	Negativo
18	2 discos de la misma hoja	<b>0,584</b>	<b>0,329</b>	<b>POSITIVO</b>
19	1hoja/1disco	0,145	-0,110	Negativo
20	2 discos de la misma hoja	0,125	-0,130	Negativo
21	1hoja/1disco	0,151	-0,104	Negativo
22	2 hojas/1 disco de c/u	0,365	0,110	Negativo
23	1hoja/1disco	0,140	-0,115	Negativo
24	2 hojas/1 disco de c/u	0,139	-0,116	Negativo
25	1hoja/1disco	0,142	-0,113	Negativo
26	2 hojas/1 disco de c/u	0,369	0,114	Negativo
27	Hoja con pústula vieja	0,114	-0,141	Negativo
28	Hoja con pústula vieja	0,227	-0,028	Negativo
29	Hoja con pústula vieja	0,292	0,037	Negativo
30	Hoja con pústula muerta	0,655	0,400	Negativo
31	Hoja con pústula muerta	0,178	-0,077	Negativo
32	Hoja con pústula muerta	0,438	0,183	Negativo
33	Kudzu sin síntomas – Pergamino	0,145	-0,110	Negativo
34	Kudzu sin síntomas – Pergamino	0,193	-0,062	Negativo
35	Soja sana invernáculo	0,146	-0,109	Negativo
36	Soja sana invernáculo	0,137	-0,118	Negativo
37	Maleza	0,136	-0,119	Negativo

Absorvancia blanco x 3 = 0,085 X 3 = 0,255

(X) Absorvancia muestra - (Absorvancia blanco x 3) = > 0,255 Positivo

Muestra 2: 2,976 – 0,255 = 2,721 > 0,255 - POSITIVO

Muestra 3: 0,892 – 0,255 = 0,637 > 0,255 - POSITIVO

Muestra 4: 1,072 – 0,255 = 0,817 > 0,255 - POSITIVO

Muestra 5: 0,641 – 0,255 = 0,386 > 0,255 - POSITIVO

## Interpretación de los resultados:

Se evaluaron muestras de diferentes tamaños, 1 o 2 discos de una misma hoja y 1 o 2 discos de diferentes hojas de soja.

Las muestras 3 y 4 resultaron positivas y correspondían a soja proveniente del INTA Cerro Azul, Misiones, demostrando la posibilidad de usar el método con muestras frescas (3) o viejas (herborizadas) (4).

Las muestras 5-14 correspondían a las alternativas de hojas con baja severidad de roya tomando 1 disco de la zona de la pústula y otro disco de la misma hoja, pero alejado de la zona de la pústula. Los resultados fueron variables encontrándose casos donde las muestras 9-10 dieron positivas para el disco tomado de la pústula y para el disco tomado fuera de la pústula (que es lo que se desea/espera de este método). Sin embargo las muestras 5-6 y 11-12 dieron positivas para el disco tomado de la zona de la pústula, pero negativo para el disco tomado fuera de la zona de la pústula. En otros casos ambos discos fueron negativos (7-8 y 13-14).

En cuanto al tamaño de las muestras los pares 15-20 correspondían a 1 disco de una hoja y dos discos de la misma hoja. Los resultados de las muestras 15-16 y 17-18 fueron positivos para dos discos y negativos para un disco (indicando la conveniencia de usar muestras con dos discos de la misma hoja para detectar la presencia de la roya). En el par 19-20 ambas fueron negativas (indicando la ausencia de la enfermedad en las mismas).

También en relación al tamaño de las muestras los pares 21-26 correspondían a un disco de una hoja y dos discos de dos hojas diferentes. Los resultados de todas las muestras fueron negativos, indicando la ausencia de la enfermedad, por lo tanto no se pudieron sacar conclusiones con respecto a este parámetro.

La ventaja de utilizar dos discos en lugar de uno es económica porque reduce el número de muestras a evaluar y por lo tanto el costo de la evaluación.

Otras muestras que resultaron **negativas** para roya de la soja provenían de:

-Kudzu, de Pergamino, sin síntomas de roya (33 y 34), hojas de soja sanas (35 y 36) y maleza no hospedante (37).

Los resultados de las muestras 27, 28 y 29 con discos tomados de pústulas viejas dieron negativo, del mismo modo que las muestras 30, 31 y 32 con pústulas muertas. Estos resultados no permiten confirmar la posibilidad de utilizar muestras con infecciones viejas para la detección de la roya de la soja por este método.

**Cuadro 5**

Muestra	Tipo de Muestra (Hospedante-Localidad)	Absorvancia	(x)	Resultado
1	Blanco	0,137		
2	Control Positivo	<b>2,784</b>	<b>2,373</b>	<b>POSITIVO</b>
3	Soja vieja con mucha roya (Misiones)	<b>1,155</b>	<b>0,744</b>	<b>POSITIVO</b>
4	Soja fresca con poca roya (con pústula)	0,571	0,160	Negativo
5	Soja fresca con poca roya (sin pústula)	0,415	0,004	Negativo
6	Hoja con poca roya (con pústula)	0,595	0,184	Negativo
7	Hoja con poca roya (sin pústula)	0,366	-0,045	Negativo
8	Hoja con poca roya (con pústula)	0,692	0,281	Negativo
9	Hoja con poca roya (sin pústula)	0,149	-0,262	Negativo
10	Hoja con poca roya (con pústula)	0,72	0,309	Negativo
11	Hoja con poca roya (sin pústula)	0,671	0,260	Negativo
12	Hoja con poca roya (con pústula)	<b>0,852</b>	<b>0,441</b>	<b>POSITIVO</b>
13	Hoja con poca roya (sin pústula)	0,467	0,056	Negativo
14	1hoja/1 disco	0,33	-0,081	Negativo
15	2 discos de la misma hoja	0,839	0,428	Negativo
16	1hoja/1 disco	0,576	0,165	Negativo
17	2 discos de la misma hoja	0,649	0,238	Negativo
18	1hoja/1 disco	0,407	-0,004	Negativo
19	2 discos de la misma hoja	0,358	-0,053	Negativo
20	1hoja/1 disco	0,223	-0,188	Negativo
21	2 discos de la misma hoja	0,494	0,083	Negativo
22	1hoja/1 disco	0,248	-0,163	Negativo
23	2 discos de la misma hoja	0,287	-0,124	Negativo
24	1hoja/1 disco	0,393	-0,018	Negativo
25	2 hojas/1 disco de c/u	0,293	-0,118	Negativo
26	1hoja/1 disco	0,259	-0,152	Negativo
27	2 hojas/1 disco de c/u	0,579	0,168	Negativo
28	1hoja/1 disco	0,322	-0,089	Negativo
29	2 hojas/1 disco de c/u	0,301	-0,110	Negativo
30	1hoja/1 disco	0,278	-0,133	Negativo
31	2 hojas/1 disco de c/u	0,254	-0,157	Negativo
32	1hoja/1 disco	0,173	-0,238	Negativo

$$\text{Absorvancia blanco} \times 3 = 0,137 \times 3 = 0,411$$

$$(x) \text{ Absorvancia muestra} - (\text{Absorvancia blanco} \times 3) = > 0,411 \text{ Positivo}$$

$$\text{Muestra 2: } 2,784 - 0,411 = 2,373 > 0,411 - \text{POSITIVO}$$

$$\text{Muestra 3: } 1,155 - 0,411 = 0,744 > 0,411 - \text{POSITIVO}$$

$$\text{Muestra 4: } 0,571 - 0,411 = 0,160 < 0,411 - \text{NEGATIVO}$$

$$\text{Muestra 5: } 0,415 - 0,411 = 0,004 < 0,411 - \text{NEGATIVO}$$

**Cuadro 5 (continuación)**

Muestra	Tipo de Muestra (Hospedante-Localidad)	Absorvancia	(x)	Resultado
33	2 hojas/1 disco de c/u	0,216	<b>-0,195</b>	<i>Negativo</i>
34	Poroto Roya Uromyces Salta	0,154	<b>-0,257</b>	<i>Negativo</i>
35	Poroto Roya Uromyces Salta	0,219	<b>-0,192</b>	<i>Negativo</i>
<b>36</b>	Poroto Roya Uromyces Salta	0,181	<b>-0,230</b>	<i>Negativo</i>
37	Poroto Roya Phakopsora Salta	<b>0,936</b>	<b>0,525</b>	<b>POSITIVO</b>
38	Poroto Roya Phakopsora Salta	<b>1,126</b>	<b>0,714</b>	<b>POSITIVO</b>
39	Poroto Roya Phakopsora Salta	<b>0,916</b>	<b>0,505</b>	<b>POSITIVO</b>
40	Poroto Roya Phakopsora Salta	<b>1,009</b>	<b>0,598</b>	<b>POSITIVO</b>
41	Poroto Roya Phakopsora Salta	<b>0,913</b>	<b>0,502</b>	<b>POSITIVO</b>
42	Poroto Roya Phakopsora Salta	<b>0,859</b>	<b>0,448</b>	<b>POSITIVO</b>
43	Poroto Roya Phakopsora Salta	<b>0,893</b>	<b>0,482</b>	<b>POSITIVO</b>
44	Poroto Roya Phakopsora Salta	<b>0,875</b>	<b>0,464</b>	<b>POSITIVO</b>
45	Poroto Roya Phakopsora Salta	<b>0,84</b>	<b>0,429</b>	<b>POSITIVO</b>
46	Poroto Roya Phakopsora Salta	<b>0,881</b>	<b>0,470</b>	<b>POSITIVO</b>
47	Soja Roya Herborizada Salta	0,554	<b>0,143</b>	<i>Negativo</i>
48	Soja Roya Herborizada Salta	0,601	<i>0,190</i>	<i>Negativo</i>
49	Soja Roya Herborizada Salta	0,751	<i>0,340</i>	<i>Negativo</i>
50	Soja Roya Herborizada Salta	0,693	<i>0,282</i>	<i>Negativo</i>
51	Soja Roya Tucumán	<b>1,462</b>	<b>1,051</b>	<b>POSITIVO</b>
52	Soja Roya Tucumán	<b>1,515</b>	<b>1,104</b>	<b>POSITIVO</b>
53	Soja Roya Tucumán	<b>1,383</b>	<b>0,982</b>	<b>POSITIVO</b>
54	Soja Roya Tucumán	<b>1,256</b>	<b>0,845</b>	<b>POSITIVO</b>
55	Soja Roya Santiago del Estero	0,721	<b>0,310</b>	<i>Negativo</i>
56	Soja Roya Santiago del Estero	<b>1,191</b>	<b>0,780</b>	<b>POSITIVO</b>
57	Soja Roya Santiago del Estero	<b>1,217</b>	<b>0,806</b>	<b>POSITIVO</b>
58	Soja Roya Santiago del Estero	<b>1,054</b>	<b>0,643</b>	<b>POSITIVO</b>
59	Hoja con pústula vieja	0,16	<i>-0,251</i>	<i>Negativo</i>
60	Hoja con pústula vieja	0,191	<i>-0,220</i>	<i>Negativo</i>
61	Hoja con pústula muerta	0,14	<i>-0,271</i>	<i>Negativo</i>
62	Hoja con pústula muerta	0,574	<i>0,163</i>	<i>Negativo</i>
<b>63</b>	Soja sana invernáculo	0,135	<i>-0,276</i>	<i>Negativo</i>
64	Maleza	0,139	<i>-0,272</i>	<i>Negativo</i>

Absorvancia blanco x 3 = 0,137 X 3 = 0,411

(x) Absorvancia muestra - (Absorvancia blanco x 3) = > 0,411 Positivo

Muestra 2: 2,784 – 0,411 = 2,373 > 0,411 - POSITIVO  
Muestra 3: 1,155 – 0,411 = 0,744 > 0,411 - POSITIVO  
Muestra 4: 0,571 – 0,411 = 0,160 < 0,411 - NEGATIVO  
Muestra 5: 0,415 – 0,411 = 0,004 < 0,411 . NEGATIVO

## Interpretación de los resultados:

Esta prueba fue orientada a:

- 1- Evaluar muestras de diferentes tamaños, 1 o 2 discos de una misma hoja y 1 o 2 discos de diferentes hojas de soja.
- 2- Confirmar diagnósticos de roya de la soja en poroto de Salta (primera detección en el país).
- 3- Analizar hojas de soja con pústulas uredosóricas viejas y muertas.

La muestra 3, con roya y herborizada resultó positiva y correspondía a soja proveniente del INTA Cerro Azul, Misiones. Otras muestras positivas fueron. 12 (hoja de soja con poca roya y de la zona con síntomas), 37-46 (hojas de poroto de Salta con roya); 51-54 (hojas de soja de Tucumán con roya) y 56-58 (hojas de soja con roya de Santiago del Estero).

Las muestras 4-13 correspondían a las alternativas de hojas con baja severidad de roya tomando 1 disco de la zona de la pústula y otro disco de la misma hoja, pero alejado de la zona de la pústula. Solamente la 12 resultó positiva.

En cuanto al tamaño de las muestras los pares 14-23 correspondían a 1 disco de una hoja y dos discos de la misma hoja. Los resultados de las mismas fueron negativos en todos los casos, indicando ausencia de la enfermedad.

También en relación al tamaño de las muestras los pares 24-33 correspondían a un disco de una hoja y dos discos de dos hojas diferentes. Los resultados todas las muestras fueron negativos indicando la ausencia de la enfermedad.

Las muestras de hojas de poroto con síntomas de roya comun (*Uromyces spp*) resultaron **negativas** confirmando que no existen reacciones cruzadas con otros patógenos (34, 35 y 36).

Los resultados de las muestras con discos tomados de pústulas viejas (59 y 60) y pústulas muertas (61 y 62) fueron negativos. Estos resultados no permiten confirmar la posibilidad de utilizar muestras con infecciones viejas y/o muertas para la detección de la roya de la soja por este método.

**Cuadro 6**

Muestra	Tipo de Muestra (Hospedante-Localidad)	Absorvancia	(x)	Resultado
1	Blanco	0,078		
2	Control Positivo	<b>1,994</b>	<b>1,760</b>	<b>POSITIVO</b>
3	Kudzu La Plata	<b>0,855</b>	<b>0,621</b>	<b>POSITIVO</b>
4	Kudzu La Plata	<b>0,898</b>	<b>0,664</b>	<b>POSITIVO</b>
5	Kudzu La Plata	<b>0,946</b>	<b>0,712</b>	<b>POSITIVO</b>
6	Kudzu La Plata	<b>0,957</b>	<b>0,723</b>	<b>POSITIVO</b>
7	Pergamino Inoc. Invern.	0,355	0,121	<i>Negativo</i>
8	Pergamino Inoc. Invern.	0,186	-0,048	<i>Negativo</i>
9	Salta Inoc. Invern.	0,157	-0,077	<i>Negativo</i>
10	Salta Inoc. Invern.	<b>0,775</b>	<b>0,541</b>	<b>POSITIVO</b>
11	Salta Inoc. Invern.	<b>0,741</b>	<b>0,507</b>	<b>POSITIVO</b>
12	Tucumán Inoc. Invern.	<b>0,653</b>	<b>0,419</b>	<b>POSITIVO</b>
13	Tucumán Inoc. Invern.	<b>1,024</b>	<b>0,790</b>	<b>POSITIVO</b>
14	Tucumán Inoc. Invern.	<b>0,942</b>	<b>0,708</b>	<b>POSITIVO</b>
15	Pergamino Herborizado	0,070	0,070	<i>Negativo</i>
16	Pergamino Herborizado	0,089	0,089	<i>Negativo</i>
17	Pergamino Herborizado	0,078	0,078	<i>Negativo</i>
18	Salta Herborizado	0,088	0,088	<i>Negativo</i>
19	Salta Herborizado	0,095	0,095	<i>Negativo</i>
20	Salta Herborizado	0,091	0,091	<i>Negativo</i>
21	Tucumán Herborizado	0,085	0,085	<i>Negativo</i>
22	Tucumán Herborizado	0,083	0,083	<i>Negativo</i>
23	Tucumán Herborizado	0,083	0,083	<i>Negativo</i>

Absorvancia blanco x 3 =  $0,078 \times 3 = 0,234$

(x) Absorvancia muestra - (Absorvancia blanco x 3) =  $> 0,234$  Positivo

Muestra 2:  $1,994 - 0,234 = 1,760 > 0,234$  - POSITIVO

Muestra 3:  $0,855 - 0,234 = 0,619 > 0,234$  - POSITIVO

Muestra 4:  $0,898 - 0,234 = 0,664 > 0,234$  - POSITIVO

Muestra 7:  $0,355 - 0,234 = 0,121 < 0,234$  - NEGATIVO

### Interpretación de los resultados:

Esta prueba fue orientada a:

- 1- Confirmar el diagnóstico visual de la roya de la soja en Kudzu de La Plata (primera detección en la provincia de Buenos Aires).
- 2- Evaluar el método con hojas herborizadas.
- 3- Evaluar el método con hojas inoculadas en invernáculo con roya de la soja.

Los resultados positivos de las muestras de Kudzu de La Plata confirmaron la detección de la enfermedad en la provincia de Buenos Aires (3-6).

Las muestras herborizadas de Pergamino, Tucumán y Salta dieron negativas (15-23). El motivo de estos resultados puede ser el deficiente estado físico de las muestras utilizadas.

Las muestras de hojas de soja provenientes de plantas inoculadas dieron negativo (7-9) y positivo para las muestras 10-14.

La probable explicación de estos resultados es la cantidad de esporas utilizadas para la inoculación donde se disponía de mayor cantidad de las mismas en las muestras de Salta y Tucumán, mientras que en las de Pergamino no ocurría lo mismo, por la baja severidad de la enfermedad en la zona.

**Cuadro 7**

Muestra	Tipo de Muestra (Hospedante-Localidad)	Absorvancia	(x)	Resultado
1	Blanco	0,116	0,348	
2	Control Positivo	<b>2,593</b>	<b>2,245</b>	<b>POSITIVO</b>
3	Kudzu La Plata	<b>0,724</b>	<b>0,376</b>	<b>POSITIVO</b>
4	Kudzu La Plata	<b>0,820</b>	<b>0,472</b>	<b>POSITIVO</b>
5	Pergamino invernáculo inoculado	0,120	-0,228	<i>Negativo</i>
6	Pergamino invernáculo inoculado	0,115	-0,233	<i>Negativo</i>
7	Pergamino invernáculo inoculado	0,136	-0,212	<i>Negativo</i>
8	Salta invernáculo inoculado	0,135	-0,213	<i>Negativo</i>
9	Salta invernáculo inoculado	0,135	-0,213	<i>Negativo</i>
10	Salta invernáculo inoculado	0,134	-0,214	<i>Negativo</i>
11	Tucumán invernáculo inoculado	<b>0,939</b>	<b>0,591</b>	<b>POSITIVO</b>
12	Tucumán invernáculo inoculado	<b>0,816</b>	<b>0,468</b>	<b>POSITIVO</b>
13	Tucumán invernáculo inoculado	<b>0,773</b>	<b>0,425</b>	<b>POSITIVO</b>
14	Salta herborizado con mucha roya	<b>0,679</b>	<b>0,331</b>	<b>POSITIVO</b>
15	Tucumán herborizado con mucha roya	<b>0,960</b>	<b>0,612</b>	<b>POSITIVO</b>
16	Misiones herborizado con mucha roya	<b>0,879</b>	<b>0,531</b>	<b>POSITIVO</b>
17	Poca roya, disco pústula	<b>0,742</b>	<b>0,394</b>	<b>POSITIVO</b>
18	Poca roya, disco sin pústula	0,303	-0,045	<i>Negativo</i>
19	Poca roya, disco pústula	0,600	0,252	<i>Negativo</i>
20	Poca roya, disco sin pústula	0,242	-0,106	<i>Negativo</i>
21	Poca roya, disco pústula	<b>0,773</b>	<b>0,425</b>	<b>POSITIVO</b>
22	Poca roya, disco sin pústula	0,381	0,033	<i>Negativo</i>
23	Poca roya, disco pústula	<b>0,853</b>	<b>0,505</b>	<b>POSITIVO</b>
24	Poca roya, disco sin pústula	0,560	0,212	<i>Negativo</i>
25	Poca roya, disco pústula	<b>0,805</b>	<b>0,457</b>	<b>POSITIVO</b>
26	Poca roya, disco sin pústula	0,246	-0,102	<i>Negativo</i>
27	1 disco 1 hoja	0,224	-0,124	<i>Negativo</i>
28	2 discos misma hoja	0,213	-0,135	<i>Negativo</i>
29	1 disco 1 hoja	0,177	-0,171	<i>Negativo</i>
30	discos misma hoja	0,224	-0,124	<i>Negativo</i>
31	1 disco 1 hoja	0,344	-0,004	<i>Negativo</i>
32	2 discos misma hoja	0,243	-0,105	<i>Negativo</i>

Absorvancia blanco x 3 = 0,116 X 3 = 0,348

(x) Absorvancia muestra - (Absorvancia blanco x 3) = > 0,348 Positivo

Muestra 2: 2,593 – 0,348 = 2,245 > 0,348 - POSITIVO

Muestra 3: 0,724 – 0,348 = 0,376 > 0,348 - POSITIVO

Muestra 4: 0,820 – 0,348 = 0,472 > 0,348 - POSITIVO

Muestra 5: 0,120 – 0,348 = -0,228 < 0,348 . NEGATIVO

**Cuadro 7 (continuación)**

Muestra	Tipo de Muestra (Hospedante-Localidad)	Absorvancia	(x)	Resultado
33	1 disco 1 hoja	0,266	-0,082	<i>Negativo</i>
34	2 discos misma hoja	<b>0,666</b>	<b>0,318</b>	<i>Negativo</i>
35	1 disco 1 hoja	<b>0,711</b>	<b>0,363</b>	<b>POSITIVO</b>
<b>36</b>	2 discos misma hoja	0,407	0,059	<i>Negativo</i>
37	1 disco 1 hoja	0,652	0,304	<i>Negativo</i>
38	2 discos de 2 hojas	0,190	-0,158	<i>Negativo</i>
39	1 disco 1 hoja	0,136	-0,212	<i>Negativo</i>
40	2 discos de 2 hojas	0,593	0,245	<i>Negativo</i>
41	1 disco 1 hoja	<b>0,844</b>	<b>0,496</b>	<b>POSITIVO</b>
42	2 discos de 2 hojas	<b>0,745</b>	<b>0,397</b>	<b>POSITIVO</b>
43	1 disco 1 hoja	0,232	-0,116	<i>Negativo</i>
44	2 discos de 2 hojas	<b>0,680</b>	<b>0,332</b>	<b>POSITIVO??</b>
45	1 disco 1 hoja	<b>0,669</b>	<b>0,321</b>	<i>Negativo</i>
46	2 discos de 2 hojas	<b>0,738</b>	<b>0,390</b>	<b>POSITIVO</b>
47	Poroto Salta con roya común	0,295	-0,053	<i>Negativo</i>
48	Poroto Salta con roya común	0,547	0,199	<i>Negativo</i>
49	Misiones sin roya	0,191	-0,157	<i>Negativo</i>
50	Misiones sin roya	0,203	-0,145	<i>Negativo</i>
51	Soja Chaco	<b>0,707</b>	<b>0,359</b>	<b>POSITIVO</b>
52	Soja Chaco	0,637	0,289	<i>Negativo</i>
53	Soja Formosa	<b>0,912</b>	<b>0,564</b>	<b>POSITIVO</b>
54	Soja Corrientes	<b>0,827</b>	<b>0,479</b>	<b>POSITIVO</b>
55	Vigna Corrientes	0,095	-0,253	<i>Negativo</i>
56	Dolichos lab lab Corrientes	0,148	-0,200	<i>Negativo</i>
57	Mucuna Corrientes	<b>0,698</b>	<b>0,350</b>	<b>POSITIVO</b>
58	Guandú Corrientes	0,153	-0,195	<i>Negativo</i>
59	Dolichos sp. Chaucha mojarra Corrientes	0,148	-0,200	<i>Negativo</i>
60	Crotalaria Corrientes	0,178	-0,170	<i>Negativo</i>
61	Mucuna rayada Corrientes	0,360	0,012	<i>Negativo</i>
<b>62</b>	Soja guacha Corrientes	<b>0,672</b>	<b>0,324</b>	<i>Negativo</i>

Absorvancia blanco x 3 = 0,116 X 3 = 0,348

(x) Absorvancia muestra - (Absorvancia blanco x 3) = > 0,348 Positivo

Muestra 2: 2,593 – 0,348 = 2,245 > 0,348 - POSITIVO

Muestra 3: 0,724 – 0,348 = 0,376 > 0,348 - POSITIVO

Muestra 4: 0,820 – 0,348 = 0,472 > 0,348 - POSITIVO

Muestra 5: 0,120 – 0,348 = -0,228 < 0,348 . NEGATIVO

## **Interpretación de los resultados:**

Esta prueba fue orientada a:

- Evaluar muestras de diferentes tamaños, 1 o 2 discos de una misma hoja y 1 o 2 discos de diferentes hojas de soja.
- Evaluar diferentes hospedantes alternativos de roya de la soja.
- Confirmar diagnóstico visual de roya de la soja en Kudzu de La Plata (primera detección en la provincia de Buenos Aires).
- Evaluar el método con hojas herborizadas.
- Evaluar el método con hojas inoculadas en invernáculo con roya de la soja.

Los resultados positivos de las muestras de Kudzu de La Plata confirmaron la detección de la enfermedad en la provincia de Buenos Aires (3-4).

Las muestras de hojas de soja provenientes de plantas inoculadas con esporas de diferentes orígenes dieron negativo para las 5, 6 y 7 de Pergamino y 8, 9 y 10 de Salta, mientras que dieron positivo para las inoculadas con esporas de Tucumán (11, 12 y 13).

La probable explicación de estos resultados es la cantidad de esporas utilizadas para la inoculación donde se disponía de mayor cantidad de las mismas en las muestras de Tucumán, mientras que en las de Pergamino no ocurría lo mismo, por la baja severidad de la enfermedad en la zona.

Las muestras herborizadas de Salta (14), Tucumán (15) y Misiones (16) dieron positivas demostrando la posibilidad de usar el método con muestras herborizadas.

Las muestras 17-26 correspondían a las alternativas de hojas con baja severidad de roya tomando 1 disco de la zona de la pústula y otro disco de la misma hoja, pero alejado de la zona de la pústula.

Los resultados fueron variables encontrándose casos donde las muestras 19-20 dieron negativas para el disco tomado de la pústula y para el disco tomado fuera de la pústula, indicando ausencia de la enfermedad, mientras que en los restantes pares 17-18, 21-22, 23-24 y 25-26 dieron positivas para el disco tomado de la zona de la pústula, pero negativo para el disco tomado fuera de la zona de la pústula. Esto podría deberse al uso de hojas con muy bajos niveles de enfermedad.

Las muestras de soja de Chaco (51), Formosa (53), y Corrientes (54) fueron positivas, mientras que la muestra de Mucura (hospedante alternativo) de Corrientes (57) también resultó positiva y las de otros hospedantes alternativos resultaron negativas (58-62).

En cuanto al tamaño de las muestras los pares 27-36 correspondían a 1 disco de una hoja y dos discos de la misma hoja. Los resultados de las mismas fueron negativos indicando la ausencia de la roya, con excepción del par 35-36 donde la muestra con un disco dio positiva mientras que la de dos discos fue negativa (resultado no lógico).

También en relación al tamaño de las muestras los pares 37-46 correspondían a un disco de una hoja y dos discos de dos hojas diferentes. Los resultados de las muestras 43-44 y 45-46 demostrarían que con dos discos de dos hojas se obtiene resultado positivo mientras que cuando se incluyó un solo disco fue negativo, indicando que la probabilidad de detectar la roya se incrementa cuando la muestra incluye discos de dos hojas diferentes.

Sin embargo en los restantes los resultados fueron dispares, donde los pares 37-38 y 39-40 fueron negativos para ambos (1 y 2 discos) y positivos para ambos en el par 41-42.

### **8.1.7. Conclusiones del método**

El método de Elisa es usado para la identificación de organismos patógenos y por lo tanto para el diagnóstico de las enfermedades que ellos causan. En el caso de la roya de la soja, la empresa Enviroligix ha desarrollado el método con el anticuerpo del agente causal de la misma y la ventaja de su uso es el diagnóstico temprano de la enfermedad que permite tomar decisiones de manejo con anticipación para evitar pérdidas de significancia antes de que la enfermedad cause daños importantes.

Este método de Elisa ya ha sido validado para el diagnóstico de la roya de la soja en los EEUU. El presente estudio se realizó en la Argentina para validar el mismo con el patógeno causal de la roya de la soja presente en nuestro país, que podría diferir con respecto al hallado en otros países.

#### **a y b - Resultados en soja y hospedantes alternativos con y sin síntomas de roya de la soja**

En todos los casos las muestras de soja y de hospedantes alternativos de roya de la soja de diferentes regiones del país dieron positivas para las que tenían síntomas y negativas para las que no presentaban síntomas de roya de la soja.

Los resultados positivos de las muestras de Kudzu de La Plata confirmaron la detección de la enfermedad en la provincia de Buenos Aires. Es la primera vez que se presenta la roya en Kudzu fuera de la región norte del país (Misiones), y es de importancia para la epidemiología de la enfermedad en el área sojera de la Pampa Húmeda.

Los resultados positivos de las muestras de poroto de la provincia de Salta confirmaron la detección de la enfermedad en ese cultivo a campo por primera vez en el país. Este hecho es de importancia para la epidemiología de la enfermedad en el área sojera del noroeste del país.

#### **c - Muestras de hospedantes no alternativos (malezas).**

En todos los casos las muestras de hospedantes no alternativos de roya de la soja dieron resultado negativo.

#### **d - Muestras de soja con síntomas de otras enfermedades.**

Las muestras con síntomas de otras enfermedades de soja similares a los de la roya, como mildiu, bacteriosis y Septoria dieron negativas, comprobándose que no existen reacciones cruzadas con otros organismos, o sea que la reacción es específica para roya de la soja.

Las muestras de hojas de poroto con síntomas de roya común (*Uromyces* spp) resultaron negativas, **confirmando que no existen reacciones cruzadas con otros patógenos.**

#### **e - Discos de tejidos con síntomas y sin síntomas**

Los resultados de la primera evaluación fueron positivos para ambas situaciones, con discos de la zona con síntomas y fuera de esa zona (cuadro 1), en la segunda evaluación fueron negativos para ambas (cuadro 2), en la tercera evaluación resultó positiva para tejidos con síntomas y negativo fuera de la pústula.

En las siguientes evaluaciones los resultados fueron variables, donde algunas muestras fueron positivas para las dos; otras negativas para las dos, y otras positivas para discos de las zonas con síntomas y negativas para las zonas sin síntomas.

La variabilidad en los resultados puede deberse al uso de hojas con muy bajo nivel de severidad (en muchos casos solamente una pústula por hoja) que hace difícil la detección en zonas alejadas a la misma.

#### **f - Tamaño de la muestra**

Los resultados de dos pares fueron positivos para dos discos de la misma hoja y negativos para un disco, indicando la conveniencia de usar muestras con dos discos de la misma hoja para detectar la presencia de la roya. En varios pares en ambas situaciones los resultados fueron negativos, indicando la ausencia de la enfermedad en las mismas.

La ventaja de utilizar dos discos en lugar de uno es económica porque reduce el número de muestras a evaluar y por lo tanto el costo de la evaluación.

En cuanto al tamaño de las muestras los resultados de algunas muestras demostraron que con dos discos de dos hojas se obtuvo resultado positivo mientras que cuando se incluyó un solo disco fue negativo, indicando que la probabilidad de detectar la roya se incrementa cuando la muestra incluye discos de dos hojas diferentes. Sin embargo se obtuvieron algunos resultados dispares, donde ambos fueron negativos o positivos.

#### **g. Infecciones viejas y nuevas**

En general los resultados nos indican que el método detecta infecciones nuevas y viejas., aunque hubo excepciones en las cuales las muestras herborizadas (viejas) fueron negativas para roya, pero asumimos que se debe al mal estado físico de las muestras.

Esta alternativa se tomó en consideración por la posibilidad de recibir muestras con varios días de extracción para evaluar por este método.

En síntesis, los ensayos realizados con el método de Elisa desarrollado para la detección de la roya de la soja, han mostrado que dicho método es apropiado y confiable para diagnosticar la enfermedad y para ser utilizado por laboratorios que cuenten con el equipamiento adecuado.

Hasta el momento sólo se reconocía como método efectivo el PCR, a diferencia del método de las tiras que puede ser realizado directamente a campo

## **8.II. Desarrollo del método de las “tiritas” para la detección temprana de la Roya de la Soja en la Argentina**

Conforme al interés por desarrollar el método de las “tiritas” en la Argentina, INTEA implementó las acciones mediante las capacidades técnicas del INTA Pergamino, con el equipo de investigadores integrado por los Ings. Antonio Ivancovich y Grisela Botta, quienes utilizaron los protocolos enviados por la empresa Envirologix de los EEUU para ensayar la metodología.

### **8.II.1. Evaluación del método de las tiritas - Protocolo 1**

Objetivos:

- Desarrollar artificialmente dos niveles diferentes de infección de roya de la soja (con alta y baja concentración de esporas en la inoculación).
- Determinar las sensibilidades del método sobre hojas de soja con lesiones cloróticas y/o síntomas poco visibles, previo al desarrollo de pústulas.

#### **8.II.1.a. Materiales**

- Cámaras húmedas a 20°C y 100% HR.
- Cámaras de crecimiento a 22°C y 12 horas de fotoperíodo.
- 44 plantas sanas.
- Microtubos para recolectar las esporas desde hojas infectadas y para cuantificación de las mismas.
- Aspersores para inocular esporas de roya y para lavar el exceso de esporas en las hojas inoculadas.
- Microscopio y hematócrito (para contar esporas).

#### **8.II.1.b. Metodología desarrollada en INTA Pergamino**

-Se inocularon 20 plantas de soja que se usaron como fuente de inóculo (esporas) para las inoculaciones de las 44 plantas. Esa soja fue sembrada 2 semanas y media antes de las 44 plantas usadas para evaluar las tiritas, y 4 semanas y media antes de las inoculaciones. Ambos juegos de plantas fueron mantenidos en forma aislada para evitar contaminaciones.

-Se sembraron semillas de soja para obtener 44 plantas que fueron inoculadas y luego evaluadas con las tiritas a diferentes períodos de tiempo posteriores a la inoculación (diariamente). Las inoculaciones se efectuaron con dos concentraciones diferentes de esporas (baja: 100.000 esporas por cc; y alta: 500.000 esporas por cc).

-Se inocularon cuatro plantas, dos con cada concentración de esporas (alta y baja) durante once días consecutivos, para lograr diferentes niveles de infección.

-El protocolo original indicaba que la evaluación con las tiritas debía realizarse a partir del día 11, con la aparición de los primeros síntomas. Sin embargo, y debido a las condiciones ambientales de este ensayo los primeros síntomas se observaron a los 28 días, por lo tanto las evaluaciones con las tiritas se realizaron en ese momento.

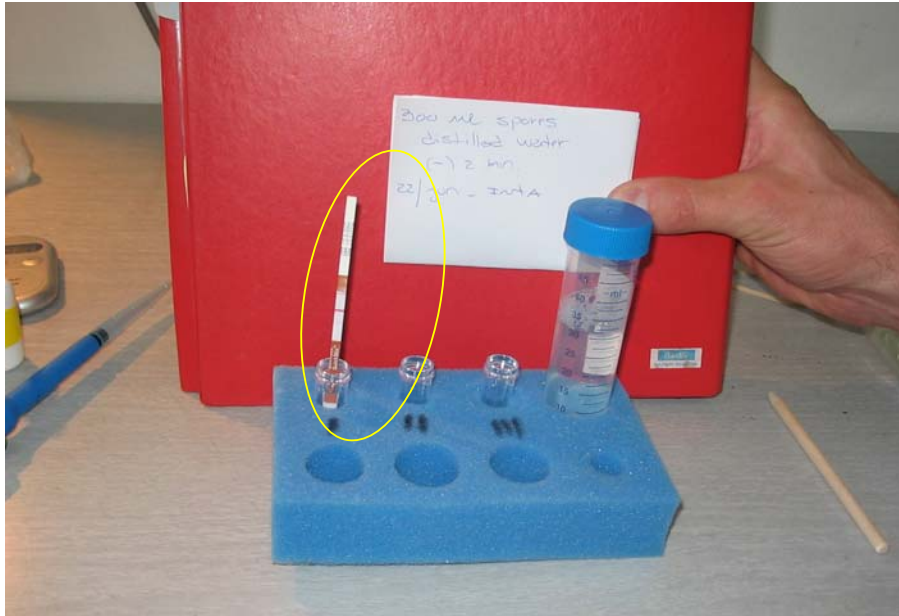
#### **8.II.1.c. Evaluaciones con las “tiritas”**

Se utilizaron microtubos identificados donde se colocaron dos discos de tejido foliar de aproximadamente 10 mm de diámetro, obtenidos por presión de la tapa del microtubo sobre la hoja (tipo sacabocados). Se trató de lograr parte de la hoja con síntomas de roya de la soja.

Se maceró el tejido con un pestle (pequeño objeto punzante) en el microtubo con 12 gotas de solución buffer de extracción, hasta obtener un líquido verdoso, evitando contaminaciones entre muestras.

Posteriormente se insertaron las tiritas en los microtubos, se dejaron durante 10 minutos en los mismos en contacto con el líquido y se tomó la lectura de las mismas (foto 10).

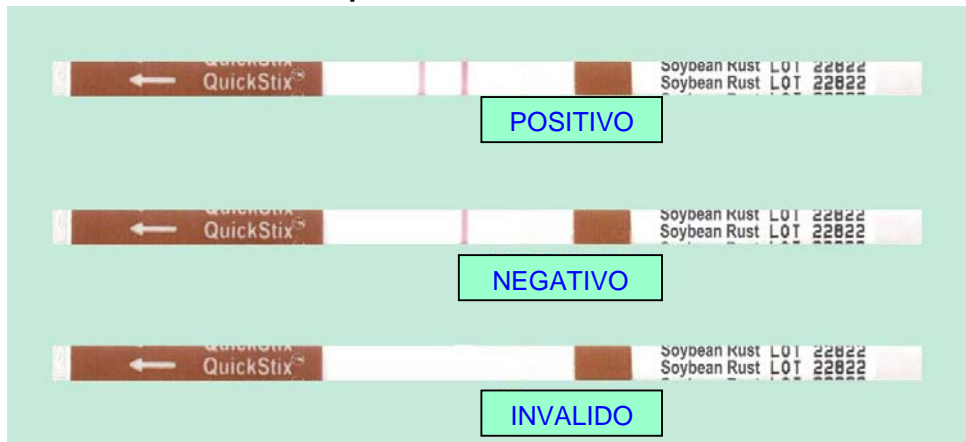
**Foto 10 – Método de las Tiritas**



#### **8.II.1.d. Interpretación de los resultados**

Existen tres posibilidades en cuanto a las reacciones, 1- que no se observe marca alguna sobre las tiritas, lo que indica que las mismas no funcionan correctamente (en ese caso se descartan las tiritas), 2- que se observe solamente la línea control, lo que indica reacción negativa (ausencia del agente causal de la roya de la soja), y 3- que se observe la línea control y por debajo de la misma otra línea similar, lo que indica reacción positiva (presencia del agente causal de la roya de la soja) (foto 11)

**Foto 11: Reacciones posibles de las tiritas**



### **8.II.1.e. Resultados**

En ambas concentraciones de inoculación (baja y alta), las plantas inoculadas en los días 1, 2, 3 y 4 presentaban síntomas y pústulas de roya de la soja. Solamente las inoculadas el primer día se utilizaron como control positivo para la evaluación con las tiritas (fotos 12 y 13).

En las evaluaciones con alta concentración de esporas las plantas inoculadas en los días 5 y 6 presentaban síntomas y pocas pústulas, las de los días 7 y 8 presentaban síntomas leves pero sin pústulas (foto 14). Las inoculadas en los días 9-11 no presentaban síntomas de roya de la soja.

Los resultados de las tiritas fueron positivos para el control positivo y para las plantas inoculadas desde el día 5 al 7, mientras que las plantas inoculadas el día 8 dieron un resultado dudoso (marca muy débil en la tirita).

Los resultados de las tiritas en las plantas inoculadas en los días 9-11 fueron negativos (foto 15).

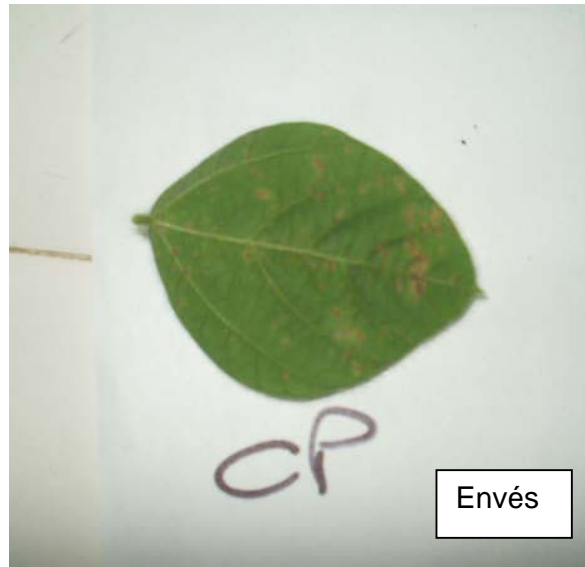
En las evaluaciones de las plantas inoculadas con baja concentración de esporas las plantas inoculadas en los días 5 y 6 presentaban síntomas y pocas pústulas, las del día 7 presentaban síntomas leves pero sin pústulas.

Las inoculadas en los días 8-11 no presentaban síntomas de roya de la soja.

Los resultados de las tiritas fueron positivos para el control positivo y para las plantas inoculadas desde el día 5 al 7, mientras que fueron negativos para las inoculadas en los días 8-11 (foto 16).

La única diferencia observada entre las inoculaciones con baja y alta concentración de esporas se detectó en las evaluaciones del día 8, donde con alta concentración de esporas se presentan síntomas, mientras que con baja concentración no se observan síntomas (fotos 15 y 16).

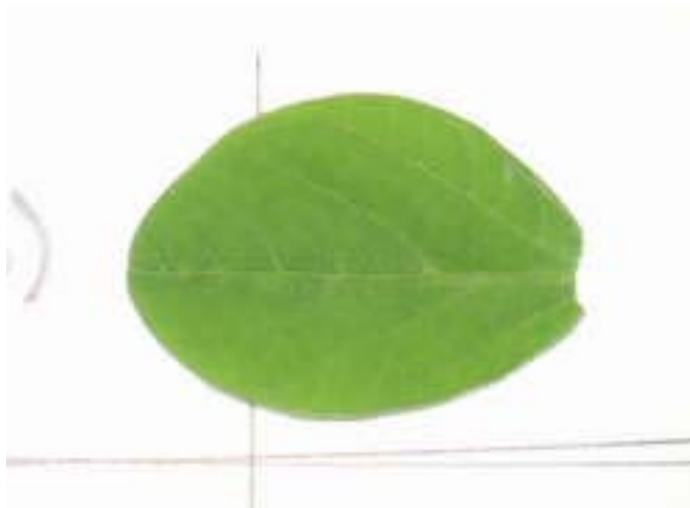
**Foto 12. Día 1 - Control POSITIVO (con síntomas y pústulas)**



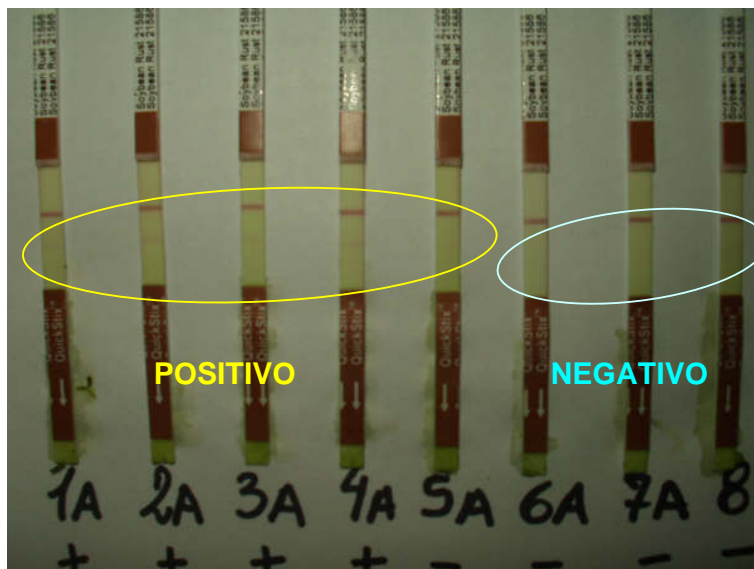
**Foto 13. Día 1 – Control POSITIVO (con síntomas y pústulas)**



**Foto 14. Día 7 – Sin síntomas de roya**

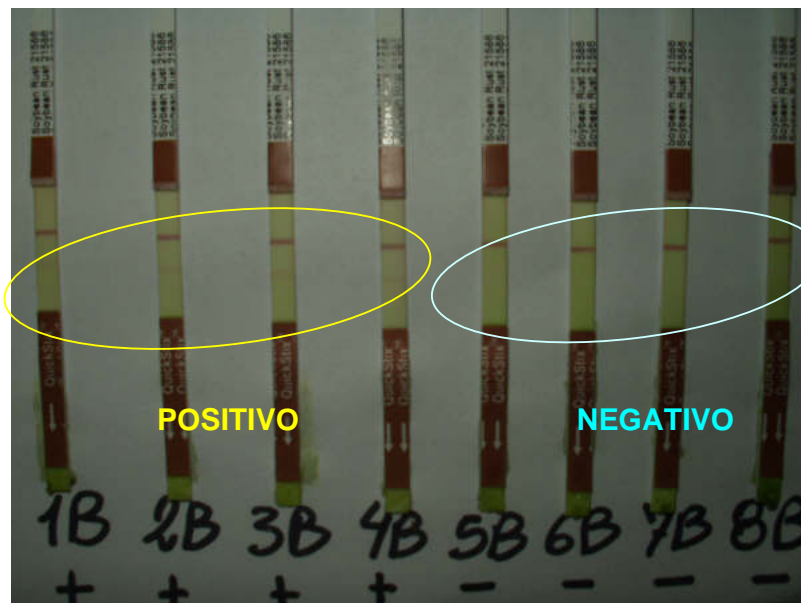


**Foto 15. Dosis alta concentración de esporas**



- 1A: Primer día de inoculación (control positivo)
- 2A: Inoculada el día 5 (con síntomas y pocas pústulas (1-3))
- 3A: Inoculada el día 6 (con síntomas y pocas pústulas (1-3))
- 4A: Inoculada el día 7 (con síntomas leves y sin pústulas)
- 1A-4A - Reacción Positiva (ver línea roja inferior)
- 5A: Inoculada el día 8 (con síntomas muy leves y sin pústulas)  
Reacción DUDOSA (ver línea roja inferior muy débil)
- 6A: Inoculada el día 9 (sin síntomas)
- 7A: Inoculada el día 10 (sin síntomas)
- 8A: Inoculada el día 11 (sin síntomas)
- 6A-8A - Reacción Negativa (sin línea roja inferior)

**Foto 16 - Dosis baja concentración de esporas**



- 1B: Primer día de inoculación (control positivo)**
- 2B: Inoculada el día 5 (con síntomas y pocas pústulas (1-3))**
- 3B: Inoculada el día 6 (con síntomas y pocas pústulas (1-3))**
- 4B: Inoculada el día 7 (con síntomas leves y sin pústulas.**
- 1B-4B - Reacción Positiva (ver línea roja inferior)**
- 5B: Inoculada el día 8 (sin síntomas)**
- 6B: Inoculada el día 9 (sin síntomas)**
- 7B: Inoculada el día 10 (sin síntomas)**
- 8B: Inoculada el día 11 (sin síntomas)**
- 5B-8B - Reacción Negativa (sin línea roja inferior)**

Obs: En general se nota que la línea de reacción o “Test Line” -que es la que confirma la presencia del patógeno- es de una intensidad o definición muy tenue, lo cual es previsible dado que en su gran mayoría, las muestras presentaban síntomas leves, lo que se correlaciona directamente con la concentración del antígeno presente, más cercana al límite inferior de detección de la tira (su intensidad varía directamente con la concentración del antígeno en la muestra). En determinadas situaciones que pueden dar “lecturas” muy dudosas, será recomendable realizar más de una prueba.

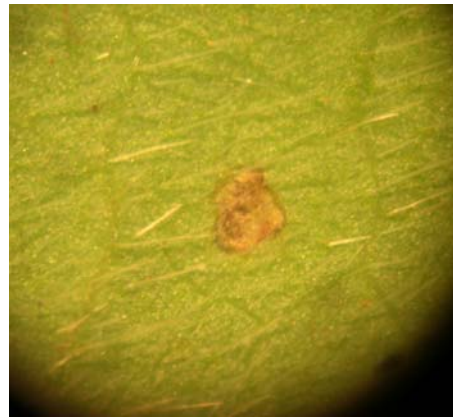
## 8.II.2. Validación del método de las tiritas - Protocolo 2

### Objetivos:

Determinar la sensibilidad del método sobre hojas de soja con lesiones cloróticas y/o síntomas poco visibles, previo al desarrollo de pústulas (fotos 17 y 18)



*Foto 17: Vista de la hoja*



*Foto 18: Vista de la pústula*

### 8.II.2.a. Metodología desarrollada en INTA Pergamino e INTA Cerro Azul de Misiones.

En ambos lugares, INTA Cerro Azul (Misiones) e INTA Pergamino se evaluaron 13 y 10 hojas (respectivamente) con bajos niveles de severidad de roya de la soja. Para cada muestra se analizaron: 1- discos de la zona de la pústula, 2- discos tomados fuera de esa zona. En ambos casos se procedió a usar el método de las tapitas en microtubos, y 3- tejidos de la misma hoja, pero analizados por el método de la bolsita.

#### a) De las “tapitas de microtubos” (Eppendorf)

-Extracción de discos de tejidos de hojas utilizando las tapitas de microtubos Eppendorf (similar a un sacabocados). 1- De la zona de la hoja con síntomas (+) y 2- de zonas alejadas de las mismas (-), con la finalidad de evaluar la sensibilidad del método para detectar infecciones poco visibles y/o no visibles en las hojas de soja. (foto 19)

**Foto 19: Muestreo con “tapitas de microtubos”**



Se extrae un disco del tejido foliar a analizar con la tapita Del microtubo (Eppendorf) y se coloca dentro del mismo.

-Agregado de 12 gotas de buffer de extracción.

-Maceración de los discos con pequeños bastones plásticos, denominados “pestles” hasta la obtención de un líquido verdoso.

-Colocación de las tiritas dentro de los microtubos con pleno contacto con el líquido obtenido durante 10 minutos hasta observar tipo de reacción obtenida.

**b) De las “bolsitas”**

De las mismas hojas evaluadas en microtubos se extrajeron tejidos de 2 cm x 2 cm y se los colocó en bolsitas provistas por el kit, Se maceró el tejido con un palillo o con una moneda (foto 20). Una vez extraído el líquido verdoso se lo ubicó en los microtubos.

Finalmente se colocaron las tiritas en los microtubos correspondientes a cada uno de los tratamientos anteriores, y se los dejó en contacto por 10 minutos, luego de los cuales se leyeron los resultados.

**Foto 20 - Uso de las “bolsitas”**



Se coloca la hoja a analizar en una bolsita especial y se le agrega una solución buffer



Se macera el tejido con un palillo de madera

### **8.II.3. Conclusiones**

El procedimiento completo (obtención de la muestra, macerado, etc.) llevó aproximadamente 5 minutos para cada muestra.

Los resultados de las muestras obtenidas en la zona de la pústula dieron todas positivas, mientras que los de fuera de la zona de la pústula dieron positivos y negativos. Las muestras analizadas en las bolsas dieron casi todas positivas (fotos 21 a 26).

Es factible que los fitopatólogos y/o personas con experiencia en el diagnóstico visual de la roya de la soja opten por utilizar el método de las tiritas con muestras de hojas con síntomas de la enfermedad, y seleccionen el área de tejido sospechosa, para evaluar las mismas con el método de la tapita en microtubos y confirmar así su diagnóstico. Mientras que aquellas personas sin experiencia o sin el tiempo necesario para analizar las muestras con detalles (bajo lupa, etc.) es probable que empleen el método de las bolsitas que les permite trabajar con muestras de hojas de mayor tamaño y por ende con mayor posibilidad de detectar la enfermedad.

De acuerdo a estos resultados concluimos que este método es efectivo para la detección temprana de roya de la soja, bajo niveles de infección muy leves a campo.

Foto 21: Misiones - Resultado en discos de la zona de la pústula (+)

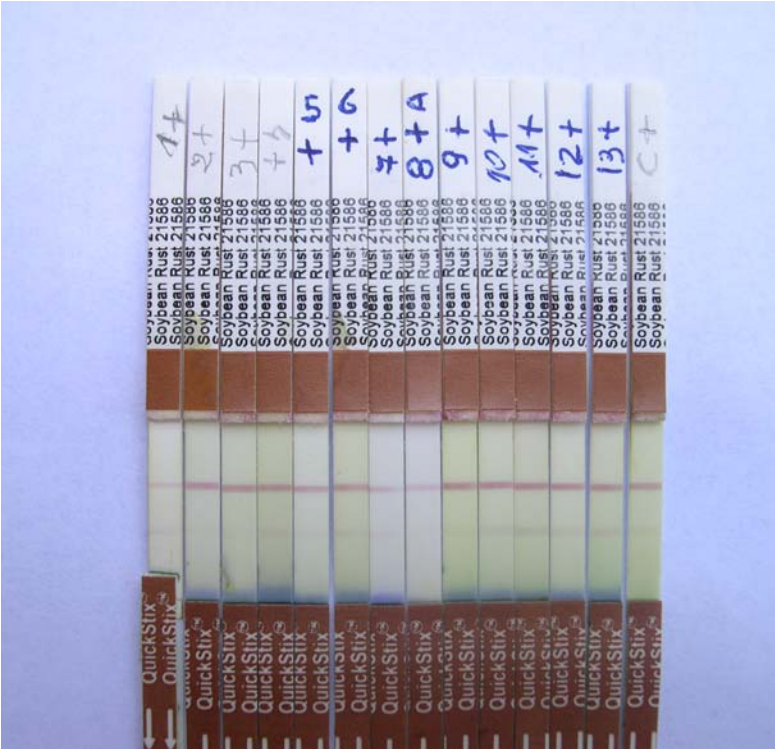
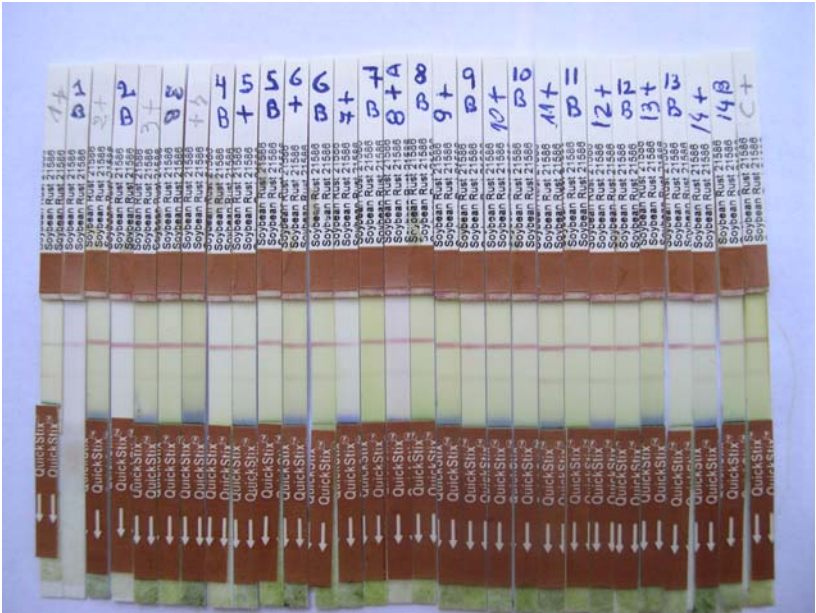
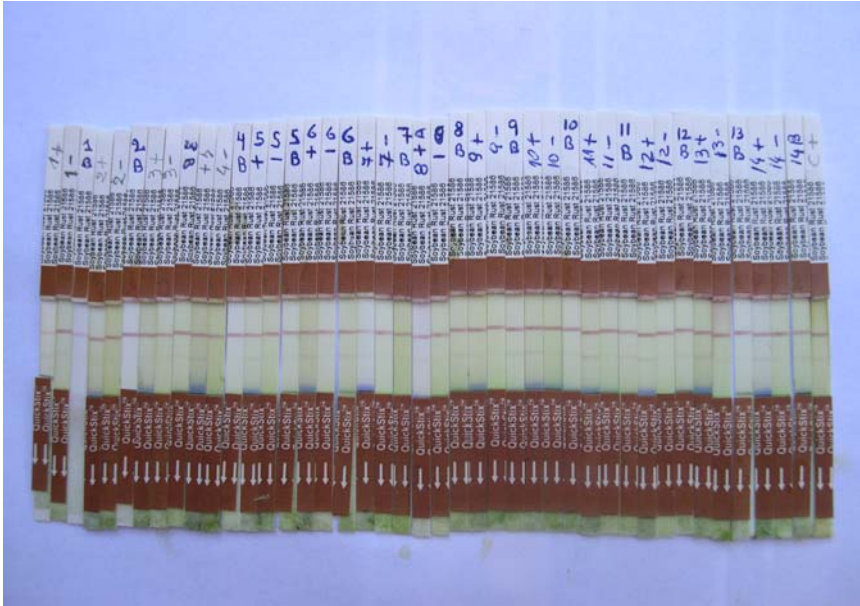


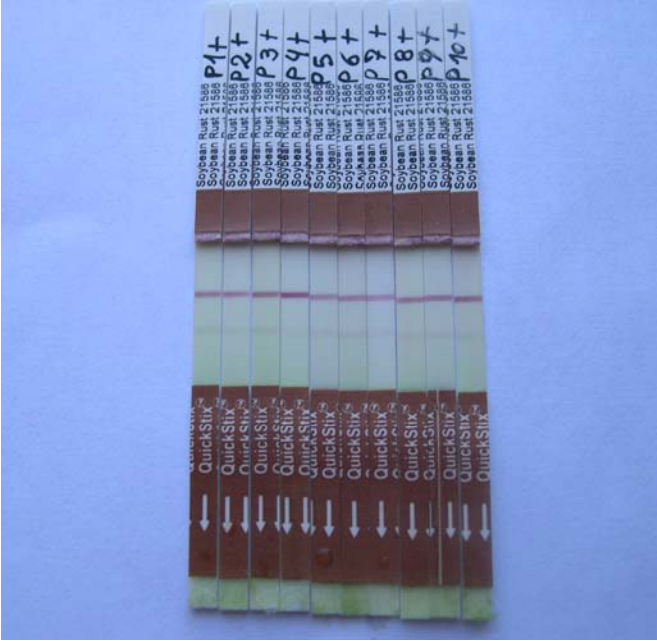
Foto 22: Misiones - Resultado con discos de la zona de la pústula (+) y con las bolsitas (B)



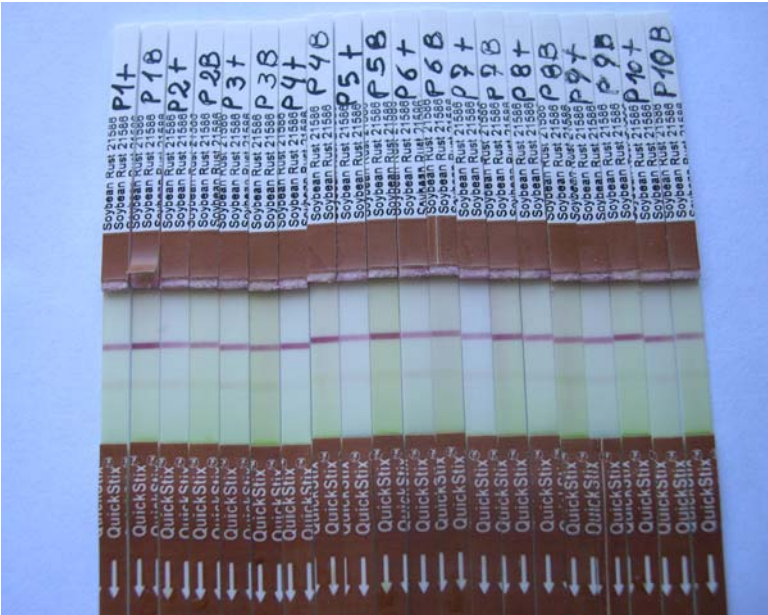
**Foto 23: Misiones - Resultado con discos de la zona de la pústula (+), fuera de la pústula (-) y con las bolsitas (B)**



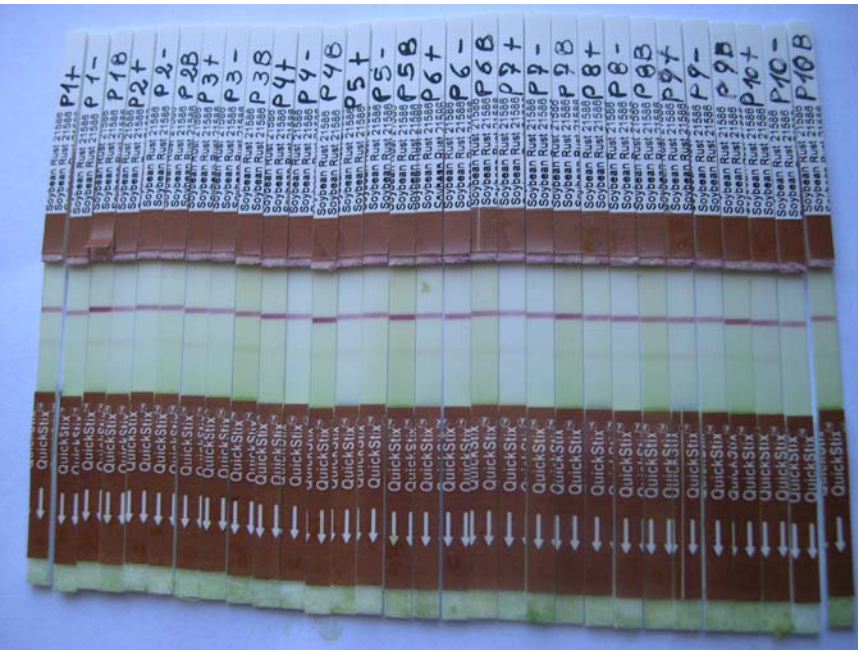
**Foto 24: Pergamino - Resultado en discos de la zona de la pústula (+)**



**Foto 25: Pergamino - Resultado con discos de la zona de la pústula (+) y con las bolsitas (B)**



**Foto 26: Pergamino - Resultado con discos de la zona de la pústula (+), fuera de la pústula (-) y con las bolsitas (B)**



## **9. ANALISIS DE COSTOS BENEFICIOS DE LA APLICACIÓN DE LA METODOLOGIA DE DIAGNOSTICO.**

Se había señalado anteriormente que el nuevo método de detección de la roya tendría las siguientes ventajas:

- a. Mayor anticipación en la detección de la presencia de la roya.
- b. Mayor disponibilidad de tiempo para organizar los aspectos logísticos del control químico.
- c. Asistir al diagnóstico preciso, desalentando "aplicaciones preventivas".
- d. Contribuir a la determinación del momento óptimo de control de la enfermedad, a los efectos de minimizar los daños en el cultivo de soja.

Teniendo en cuenta los atributos esperados, se intentó cuantificar los alcances específicos de esta metodología, dentro de un conjunto de conocimientos y prácticas aplicadas para el manejo de la enfermedad.

La nueva técnica de diagnóstico no cambia ni invalida la forma o método de muestreo a campo, se mantiene el convencional y se obra bajo la premisa de que el INTA fija las pautas a seguir en cuanto a metodología de muestreo, lo único que varía (o se agrega) es el uso de las tiras ante situaciones en donde la sintomatología es dudosa o difícil de observar aún con lupa (infecciones leves e incipientes)

El monitoreo se debe intensificar cuando la roya se presenta a una distancia de 150 km del sitio de referencia. No se debería manejar por fecha ni por estado fenológico del cultivo porque alienta a realizar aplicaciones de fungicidas totalmente preventivas, lo que no invalida que se hagan monitoreos independientemente de ello ante la presencia cercana de la roya.

Con alta severidad de ataque de la enfermedad en áreas cercanas (150 km) y buenas condiciones para la roya (mas de 6 horas de rocío y temperaturas moderadas, 20-25°C) el riesgo de elevadas pérdidas económicas puede llegar entre 7 a 10 días. Por ello interesa cuantificar el "factor tiempo", es decir en cuanto se podría anticipar el diagnóstico preciso de la enfermedad, tanto para facilitar la oportunidad y operatividad del control químico, como para alentar las buenas prácticas de control (sólo las necesarias).

## 9.I. Estimación del costo-beneficio de la metodología.

La técnica de diagnóstico basada en el uso de las tiras de flujo lateral, es **complementario** de las observaciones visuales, de los sistemas de alarma y de otros métodos de laboratorio como el PCR, por lo tanto se descarta que se pueda lograr una reducción o sustitución de costos propios del diagnóstico, como son fundamentalmente los de asistencia profesional, desplazamientos, servicios de laboratorios, etc.

Para poder estimar el costo-beneficio del método de diagnóstico rápido, se parte de la base que cada tira de flujo lateral, puesta en Argentina, más los márgenes de comercialización, llegaría al usuario (precio al público) a un valor aproximado de 3,90 a 4 dólares.

Definir la “unidad de muestreo” resulta sumamente dificultoso, al menos hasta lograr mayor experiencia en el gran cultivo con este método, de hecho puede llegar a ser muy variable, dependiendo del estado y uniformidad del cultivo y en definitiva del criterio profesional para establecer cuál es la más “representativa” del sembradío.

Por de pronto hay criterios técnicos que recomiendan tomar entre 20 a 30 hojas por cada lote para realizar las observaciones, si los síntomas son muy evidentes visualmente, no justifica el uso de las tiras, pero a la vez se puede inferir que se ha llegado tarde con el diagnóstico y posiblemente los daños en el cultivo resulten irrecuperables.

Contrariamente, en aquellas situaciones en las que sólo se ven hojas “dudosas”, es donde el método de las tiras presta la mayor practicidad y utilidad, bastaría con emplear una o dos tiras para determinar la presencia de la enfermedad y en función de ello complementar y/o aplicar las técnicas que la situación requiera.

Conforme a la experiencia y conocimientos de la enfermedad, se podría llegar a realizar hasta 5 a 6 muestreos en el período más crítico del cultivo, que por lo general se extiende entre los 35 a 50 días y puede comprender desde fines del período vegetativo hasta el estado fenológico R5/R6. Por lo tanto, se puede proyectar una “media” de muestreos de tres evaluaciones por lote.

Asumiendo una serie de supuestos ante la falta de experiencia con la utilización del método de las tiras en el gran cultivo, relacionados con ciertos indicadores o parámetros inherentes a la producción nacional de soja, surgen los siguientes datos (cuadro 1) con la salvedad de que no deben interpretarse como la media o el potencial de uso del método, sólo se trata de una estimación muy cauta de sus posibilidades de aplicación o bien el trazado de un escenario probable en el corto plazo, bajo la condición de que la roya de la soja mantenga su potencial peligrosidad :

**Cuadro 1: Simulación de uso de las Tiras**

Parámetros	Estimaciones	Proyecciones
1. Area sembrada en el país (has)	16.500.000	
2. Area potencialmente afectada por la roja (has)	60%	9.900.000
3. % del área afectada que podría utilizar las tiras como método de detección (has)	5 %	495.000
4. Unidad de muestreo estimada (# de hectáreas por lote) (1)	400	1.237
5. Número de folíolos a analizar con las tiras en cada unidad de muestreo (2)	3	3.711
6. Frecuencia de muestreos por semana	1	
7. Promedio de semanas durante las cuáles se harán los muestreos (3)	3	<b>11.133</b>



**Costo de la metodología ( a \$ 12 cada tira): \$ 133.600**

Tiras utilizadas

**Observaciones:**

(1) La "unidad de muestreo" (400 has), se estima por:

- La elevada uniformidad en el desarrollo que presenta los cultivos en prácticamente todas las regiones.
- La "extensión" de los ambientes por regiones (ausencia de microclimas).
- Los tiempos reales de "las capacidades técnicas" (el método debe estar en manos de expertos).

(2) Dado que el método de la Tiras ofrece resultados cualitativos, el número de muestras a analizar con el mismo debería ser mínimo.

(3) Si bien el período crítico de aparición de la enfermedad puede llegar a ser amplio (desde los estados vegetativos previos a floración hasta llenado de grano), la cantidad de semanas se ajusta a lo que sería la "situación promedio" se espera que ocurran con frecuencia situaciones en que se inicien los muestreos muy tarde (por no haber alarma previa) o bien se decida hacer control químico al primer o segundo muestreo.

## 9.II. Interpretaciones sobre las ventajas del método:

La producción nacional de soja se realiza en 16,5 millones de has. y no menos de un 60% de la superficie cultivada está expuesta al ataque de la roya, es decir cerca de de 10 millones de hectáreas.

Cabe aclarar que el rendimiento medio de soja a nivel nacional es de 2,3 tn/ha, si bien en la pampa húmeda los rindes superan las 3 tn/ha., en las regiones NOA-NEA los promedios se encuentran entre las 1,5 a 2 tn/ha., en estas zonas la mayor incidencia de ataque de roya se debe a su cercanía de Bolivia, Paraguay y Brasil.

Según los ensayos del INTA, que se corresponden con las informaciones que han brindado diferentes unidades experimentales en los últimos tiempos sobre la incidencia de la enfermedad, se pueden perder en promedio 0,46 tn/ha.

Con la finalidad de intentar una cuantificación de los posibles beneficios a lograr mediante el uso de las tiras de flujo lateral, como lo es el detectar y anticipar el diagnóstico del ataque de roya de la soja y consecuentemente disponer de mayor tiempo para el ordenamiento logístico de las medidas de control químico, se trabajó bajo los siguientes supuestos:

- Que en tan sólo medio millón de hectáreas se utilizaría el método de las tiras (3 % del área cultivada y el 5 % del área afectada por la roya, ver cuadro 1);
- Que en dicha superficie se aplican tecnologías avanzadas y se obtienen rendimientos sensiblemente superiores a la media<sup>1</sup>;
- Que por la utilización del método de las tiras en estados avanzados del cultivo, se logre evitar una merma productiva del 5 % (aproximadamente un tercio del promedio de pérdidas);
- Que por la utilización del método de las tiras en estados tempranos del cultivo, se logre evitar una merma productiva del 10 % (aproximadamente dos tercios del promedio de pérdidas).

---

<sup>1</sup> Se parte del convencimiento que en los cultivos manejados con alto nivel tecnológico, se logran rendimientos medios superiores a las 3 ton/ha.

implicaría las siguientes ventajas:

Los supuestos señalados plantean dos situaciones probables, la primera es que aparezca un ataque tardío de la enfermedad (en R3 o más) y en el que el método (por todo lo antedicho) contribuya a “salvar” el 5 % del rendimiento, lo que equivale a una potencial pérdida de 0,15 toneladas/ha.

Si ello se cumpliera en la mitad del área monitoreada (de medio millón de has consideradas), corresponderían a una producción total promedio de 37.500 toneladas, que a un precio neto de U\$S 150/tonelada, representan un valor de 5,62 millones de dólares

Para la segunda situación, que es el caso de “salvar” una pérdida del 10% del rendimiento -es decir 0,3 toneladas/ha.- por detectar a tiempo ataques tempranos de roya (R1 o anterior) en la mitad del área monitoreada, correspondería a una producción total promedio de 75.000 toneladas, que representan un valor aproximado de 11,25 millones de dólares.

Conforme a lo estimado en el cuadro 1, los beneficios mencionados para las dos situaciones se lograrían con un “costo adicional” (por la utilización del método de tiras), cercano a los U\$S 44.500.-

En definitiva, sobre un costo “extra” de U\$S 44.500, según las variantes y supuestos establecidos, el uso de la metodología de las tiras complementada con los restantes métodos de diagnóstico y control, daría un beneficio de U\$S 5,6 a 11,2 millones de dólares.

Para tener una idea de la dimensión o relación costo-beneficio del uso oportuno de las tiras, sería de 1:126 para el primer caso, y de 1:252 en el segundo caso.

Por otra parte, si por haber hecho un diagnóstico preciso en el área monitoreada de medio millón de has., se lograra reducir las aplicaciones de tipo “preventivo” en tan sólo el 2 % de los casos (10.000 has), y considerando que el costo promedio de los diferentes fungicidas recomendados para controlar la roya de la soja es del orden de los \$ 55.- por hectárea (aproximadamente 1,2 qq de soja), el sector productivo se tendría un beneficio en los costos de \$ 550.000.-

### 9.III. Conclusiones

- El uso de la tiras como método complementario de diagnóstico de la roya de la soja, ha cumplido satisfactoriamente con los objetivos propuestos en los “test” y ensayos realizados, conforme a los protocolos establecidos.
- Se ha comprobado que las tiras de flujo lateral permiten identificar a la enfermedad directamente a campo en forma rápida, simple y práctica, sus resultados son cualitativos, es decir que determinan la presencia o no de la roya de la soja, pero no miden la intensidad del ataque.
- Las pruebas realizadas permiten afirmar que las tiras de flujo lateral no presentan reacciones cruzadas con enfermedades que pueden confundirse con la roya de la soja, caso de *Cercospora sojina*, *Cercospora kikuchii*, *Xanthomonas campestris* pv *glycinea*, *Peronospora manshurica*, *Septoria glycines* y *Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea*.
- Las tiras han mostrado la capacidad de identificar a la roya aún cuando las lesiones cloróticas en los tejidos resultan muy dificultosas distinguir con lupa, lo que permite anticipar y facilitar la diagnosis, precisar los resultados y favorecer el “Just In Time” de toda la logística del control químico.
- Se infiere que el costo del diagnóstico basado en las tiras de flujo lateral es irrelevante, en función de las prestaciones y alcances que ofrece.
- La simplicidad de uso del método de las tiras no requiere contar con personal altamente capacitado ni equipamiento adicional, aún así se aconseja su utilización por personal técnico experto.
- Dentro de la cadena agroindustrial de la soja, los principales y más directos beneficiarios del método de diagnóstico basado en el uso de las tiras de flujo lateral, serán los agentes de los sistemas de asistencia técnica, las empresas de servicios de aplicación de agroquímicos y los productores de soja.
- La tira de flujo lateral no fue desarrollada para sustituir otros métodos convencionales de monitoreo, es una herramienta más y complementaria como técnica de diagnóstico de la roya de la soja y los resultados de las tiras deben interpretarse en el contexto de otras informaciones de campo y laboratorio.

## **10. ESTRATEGIAS FUTURAS**

INTEA S.A., En su condición de empresa beneficiaria del presente Estudio Exploratorio y conforme a los promisorios resultados alcanzados con las pruebas y test realizados con el nuevo método de diagnóstico -fundamentalmente con el formato denominado de “flujo lateral” o de las “tiritas”- asume el compromiso de alentar su uso mediante acciones de promoción y difusión destinadas a los potenciales usuarios del método de diagnóstico, conformada principalmente por los actores del sistema de asistencia técnica/profesional del cultivo de la soja en le país.

Paralelamente, INTEA evaluará y definirá su participación en la faz técnica y comercial, aspecto fundamental para desarrollar el mercado de dicho “producto-servicio”, pudiendo asumir en forma directa, indirecta o mediante la orientación y asistencia a terceros a fin de disponer con una representación comercial que asegure la logística de distribución y/o el “mix” de marketing, con la mayor eficiencia, seguridad y confiabilidad.

Será fundamental que el proceso comercial se encuentre subordinado al sistema privado de asistencia técnica y este a su vez capacitado y orientado por los servicios técnicos y organismos públicos competentes, para que los beneficios de la metodología puedan ser apropiados por los diferentes actores de la cadena de valor de la soja, principalmente productores, profesionales, la industria de agroquímicos, servicios logísticos (distribuidores, aplicadores, etc.), acopiadores y exportadores.

### **Agradecimientos:**

*Para llevar adelante las diferentes actividades del presente estudio, se contó con la asistencia experta y los invalorable aportes de profesionales y especialistas del ámbito público y privado, quienes mediante su idoneidad, dedicación y compromiso, hicieron posible el desarrollo del plan de trabajo trazado y alcanzar las metas previstas.*

*Cabe destacar en particular, a los siguientes participantes y colaboradores:*

- *Dr. Stephen Károlyi (Envirologix, Inc.)*
- *Téc. Emilce Martínez (INTA EEA Pergamino)*
- *Téc. Juan José Lanzillota (INTA EEA Pergamino)*
- *Ing. Agr. Grisela Botta (INTA EEA Pergamino)*
- *Sra. Andrea Rubio (INTA EEA Pergamino)*
- *Lic. Juliana Iglesias (INTA EEA Pergamino)*
- *Ing. Agr. Mónica Rivadaneira (INTA EECT Yuto)*
- *Lic. Adrián de Lucía (INTA EEA Cerro Azul)*
- *Lic. Silvina Fariza (INTA EEA Cerro Azul)*
- *Téc. Agr. Jorge Blaschik (INTA EEA Cerro Azul)*
- *Ing. Agr. Roxana Maumary (Fac. de Agronomía y Vet. de Esperanza, S. Fe)*
- *Ing. Agr. Carlos Pastor (Consultor privado)*

*A todos ellos, el mayor reconocimiento y gratitud.*

**INTEA S.A.**

## ANEXO I

### Costos Alternativos para el Control de Roya Asiática de la Soja <sup>2</sup>

Tabla 1: Tratamientos probables para el control de la roya de la soja

Tratamiento	Aplicaciones		Principio Activo
	N°	Opciones	
1	1	triazol	Tebuconazole
2	1	mezcla (triazol + estrobilurina)	Pyraclostrobin + Epoxiconazole
3	2	triazol / mezcla	Tebuconazole + (Pyraclostrobin + Epoxiconazole)
4	2	mezcla / mezcla	(Pyraclostrobin + Epoxiconazole) * 2
5	3	triazol / mezcla / mezcla	Tebuconazole + (Pyraclostrobin + Epoxiconazole) * 2

La metodología utilizada para el cálculo del costo de cada tratamiento de control, incluye el gasto incurrido por la compra del fungicida más el costo de aplicación mediante pulverización terrestre realizada con maquinaria propia. Los precios de referencia son los correspondientes al mes de marzo de 2005, con un valor del dólar de \$2,98 y del litro de gasoil a \$1,5. Para los resultados que se muestran en la Tabla 2 se consideró el precio del quintal de soja a \$ 45,6.

Tabla2: Costo del control químico de la roya de la soja (\$/ha y q/ha). Marzo 2005.

Tratamiento	Principio Activo	Dosis	Precio producto	Costo de Aplicación	Costo Tratamiento	
		(l/ha)	(\$l)	(\$/ha)	(\$/ha)	(q/ha)
1	Tebuconazole	0,290	87	14	39	0,8
2	Pyraclostrobin + Epoxiconazole	0,500	106	14	67	1,4
3	Tebuconazole + (Pyraclostrobin + Epoxiconazole)	0,290 + 0,500	87 + 106	28	107	2,2
4	(Pyraclostrobin + Epoxiconazole) * 2	2 * 0,500	106	28	135	2,8
5	Tebuconazole + (Pyraclostrobin + Epoxiconazole) * 2	0,290 + 0,500 * 2	87 + 106	43	174	3,6

Los costos de los distintos tratamientos evaluados para el control químico de la roya varían entre 39 y 173 \$/ha (entre uno y tres tratamientos). Expresado en quintales de soja, los valores se encuentran entre 0,8 y 3,6 q/ha. Dichos montos deberían sumarse a los costos de producción/ha o bien, restarlos de los márgenes brutos/ha del cultivo de soja.

<sup>2</sup> Fuente: EEA INTA Paraná - Rodríguez M., Formento A., Engler P., Cancio, R.

### **Definiciones de Umbral de Daño Económico y Umbral de Acción<sup>3</sup>**

El **Umbral de Daño Económico (UDE)** es un valor de intensidad de la enfermedad que causa pérdidas económicas en el cultivo equivalente al costo de aplicación del fungicida. Como el UDE es una relación de indiferencia que debemos evitar que se exceda, es necesario emplear el término **Umbral de Acción (UDA)**.

Cuando la roya alcance el **UDA** se debe proceder de inmediato a la aplicación de fungicida para su control. El umbral de daño económico (**UDE**) nunca deberá ser excedido a lo largo del desarrollo del cultivo. Por eso, dependiendo de la susceptibilidad del cultivar y de las condiciones climáticas podrá haber, en algunas situaciones, 1 ó 2 pulverizaciones.

En un caso, el **UDE** corresponde a una severidad foliar de roya, en el estadios fenológicos siguientes a V6, significando que para una severidad de 5,7 % se obtiene un pérdida de US\$ 15 /ha. En otro caso, una severidad de roya del 20 % determina un daño de 439 kg/ha con una pérdida correspondiente de US\$ 65,88 /ha. (Carmona y Reis)

---

<sup>3</sup> Marcelo Carmona, Facultad de Agronomía UBA y Erlei Melo Reis (Univ. Passo Fundo - Brasil)