



Instituto
Nacional de
Investigación
Agropecuaria

URUGUAY

JORNADA DE DIVULGACIÓN

**RESULTADOS EXPERIMENTALES
EN SANIDAD DEL CULTIVO DE TOMATE**



PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCCIÓN HORTICOLA
Serie Actividades de Difusión N° 630
24 de Noviembre, 2010

LAS BRUJAS



Resultados Experimentales en Sanidad del Cultivo de Tomate

JORNADA DE DIVULGACIÓN

**Programa Nacional de Investigación en Producción Hortícola
Estación Experimental "Wilson Ferreira Aldunate" – INIA Las Brujas
24 de noviembre de 2010**

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr., M.Sc. Enzo Benech- Presidente

Ing. Agr., Dr. Mario García -Vicepresidente



Ing. Agr. José Bonica

Dr. Alvaro Bentancur



Ing. Agr., MSc. Rodolfo M. Irigoyen

Ing. Agr. Mario Costa



SUMARIO**1 - IDENTIFICACIÓN DE RAZAS DE XANTHOMONAS SPP. CAUSANTES DE LA “MANCHA BACTERIANA” DEL TOMATE EN URUGUAY Y EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO A COBRE, ESTREPTOMICINA Y KASUGAMICINA**

Montelongo, M. J.; Pérez-Faggiani, E.; González, P.; Maeso, D.Pág. 1

2 - MOMENTOS DE APLICACIÓN DE FUNGICIDAS CUPRICOS PARA EL CONTROL DE MANCHA BACTERIANA DEL TOMATE. TEMPORADA 2009-2010.

Responsable: Diego Maeso. Colaboradores: Wilma Walasek, Alfredo Fernández.....Pág. 5

3 - EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE PRONÓSTICO “TOMCAST” PARA EL CONTROL DE TIZÓN TEMPRANO (*Alternaria tomatophila*) EN TOMATE. TEMPORADA 2009-10.

Responsable: Diego Maeso. Colaboradores: Jorge Arbolea, Alfredo Fernández.....Pág. 13

4 - EVALUACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL DEL USO DE PLAGUICIDAS EN SISTEMAS DE PRODUCCION HORTÍCOLAS: ESTUDIO DE CASOS

Responsables: Saturnino Núñez, Diego Maeso, Stella Zerbino, Noelia Casco, Paula Conde (INIA). Carmen Ciganda, Lucía Graña, Yanet Pedrazzi (MSP).Pág. 21

5 - AVANCES EN EL USO DE FEROMONAS SEXUALES PARA EL CONTROL DE POLILLA DEL TOMATE *Tuta absoluta*.

Ing. Agr. Jorge Paullier. Ing. Agr. Saturnino NúñezPág. 33

6 - ESTUDIOS DE LIBERACIÓN Y DEGRADACIÓN DE LA FEROMONA SEXUAL DE TUTA ABSOLUTA EN SEPTOS Y SU RELACIÓN CON LA ATRACTIVIDAD EN INVERNÁCULOS.

Carolina Sellanes, Facundo Ibañez, Andrés González, Saturnino Núñez.....Pág. 43

7 - PERMANENCIA DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, AGENTE CAUSAL DEL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE EN SUELO Y RASTROJO.

Responsable: Diego Maeso. Colaboradores: Wilma Walasek, Alfredo Fernández.Pág. 53

8 - PERMANENCIA DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, AGENTE CAUSAL DEL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE EN ELEMENTOS DE ENTUTORADO.

Responsable: Diego Maeso. Colaborador: Wilma Walasek.Pág. 57

9 - USO DE DESINFECTANTES PARA EL CONTROL DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN AGUA DE RIEGO.

Responsables: Diego Maeso, Wilma Walasek y Alfredo Fernández.Pág. 59

10 - INFLUENCIA DE LOS RÉGIMENES DE RIEGO EN EL DESARROLLO DE EPIDEMIAS DE CANCRO BACTERIANO EN TOMATE

Responsables: Diego Maeso, Jorge Arbolea y Claudio García.

Colaboradores: Alfredo Fernández y Wilma Walasek.....Pág. 65

11 - CONTROL BIOLÓGICO DE CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE CON EXTRACTO DE PROPÓLEO.

Zignago Paulos A.; Silvera Pérez E.; González Rabelino P.Pág. 77

IDENTIFICACIÓN DE RAZAS DE *XANTHOMONAS* SPP. CAUSANTES DE LA “MANCHA BACTERIANA” DEL TOMATE EN URUGUAY Y EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD *IN VITRO* A COBRE, ESTREPTOMICINA Y KASUGAMICINA

Montelongo, M. J.¹; Pérez-Faggiani, E.²; González, P. ¹; Maeso, D.²

¹Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay. masejoni@fagro.edu.uy

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay anualmente se plantan cerca de 900 ha de tomate, 80% a campo y el 35% de la producción se destina a la industria. Una de las enfermedades más importantes en el cultivo a campo es la mancha bacteriana, causada por bacterias del género *Xanthomonas* y cuyos cultivos hospederos son el tomate (*Solanum lycopersicum*) y el pimiento (*Capsicum annuum* L.). Cuatro especies de *Xanthomonas* causan esta enfermedad: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri* y se han definido cinco razas (T1, T2, T3, T4 y T5) de acuerdo a su relación patogénica con determinadas plantas indicadoras. La raza T1 corresponde a *X. euvesicatoria*; T2 a *X. vesicatoria* y *X. gardneri* y las razas T3, T4 y T5 corresponden a *X. perforans*.

Estas bacterias se transmiten a través de semilla, pueden sobrevivir en restos de cultivos o plantas espontáneas. El desarrollo de la enfermedad es favorecido por temperaturas entre 20 y 30°C, alta humedad y lluvias asociadas a vientos fuertes. La enfermedad causa pérdidas económicas directas por disminución en la cantidad y calidad de frutos. El manejo en Uruguay, se basa en aplicaciones semanales de productos cúpricos, mancozeb y antibióticos (principalmente kasugamicina), pero el control muchas veces es ineficiente. Esto podría explicarse por el modo de acción de los productos, por la existencia de cepas resistentes y por condiciones ambientales muy favorables para el desarrollo de la enfermedad.

El Programa Nacional de Investigación en Producción Hortícola de INIA, busca desarrollar cultivares locales con cierto grado de resistencia durable a esta enfermedad, para lo cual es necesario conocer las características de las *Xanthomonas* spp. presentes en el país.

OBJETIVOS

Crear una colección de bacterias del género *Xanthomonas*, con aislamientos realizados a partir de plantas de tomate enfermas, provenientes de las principales zonas de producción de Uruguay.

Identificar las razas de *Xanthomonas* spp. que causan la “Mancha Bacteriana” del tomate en Uruguay.

Evaluar la sensibilidad a cobre, estreptomycin y kasugamicina *in vitro*, de los aislamientos de *Xanthomonas* spp. causantes de la “Mancha Bacteriana” del tomate en Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante 2007-2010 se realizaron aislamientos de *Xanthomonas* spp. a partir de muestras de tomate (hojas y frutos) con síntomas de la enfermedad, provenientes de las principales zonas de producción del país (Canelones, Colonia, San José y Salto).

Para conocer la raza de los distintos aislamientos, se inocularon por infiltración de suspensión bacteriana (5×10^8 ufc.ml⁻¹) plantas indicadoras de *Solanum lycopersicum* (Bonny Best, Hawaii 7998, Florida 216), *Solanum pennellii* y *S. pennellii* x Hawaii 7998. Se determinaron las razas según la combinación de los resultados en las distintas indicadoras (reacción de hipersensibilidad o sensibilidad) (Tabla N°1).

Tabla N°1: Identificación de razas según reacción en plantas indicadoras

		Plantas indicadoras				
		Bonny Best	Hawaii 7998	Florida 216	<i>S. pennellii</i>	<i>L. pennellii</i> x H7998
Especie	Raza	Reacción*				
<i>X. euvesicatoria</i>	T1	S	RH	S	S	S
<i>X. vesicatoria</i> <i>X. gardneri</i>	T2	S	S	S	S	S
<i>X. perforans</i>	T3	S	S	RH	RH	RH
	T4	S	S	S	RH	RH
	T5	S	S	S	S	RH

*RH: Reacción de hipersensibilidad; S: Sensibilidad

Para evaluar la sensibilidad a cobre, estreptomycin y kasugamicina *in vitro*, se sembraron 5µl de suspensión bacteriana de 5×10^8 ufc.ml⁻¹ de cada aislamiento, en Nutriente Agar Dextrosa (NAD), suplementado con distintas concentraciones de sulfato de cobre (50, 100, 200, 300 y 400 ppm), estreptomycin (10, 25, 50, 100 y 200 ppm) y kasugamicina (40, 80, 150, 200 y 300 ppm). Como testigo se utilizó el medio de cultivo NAD. Se incluyeron dos repeticiones por aislamiento/dosis. Luego de 48 horas a 28°C se registró la presencia de colonias.

RESULTADOS

Se creó una colección de 86 aislamientos de *Xanthomonas* spp., a partir de muestras de tomate con síntomas de la Mancha bacteriana, provenientes de las principales zonas de producción del país: Canelones (55), Colonia (3), San José (8) y Salto (20); de fruto (56) y de hojas (30).

De acuerdo los resultados obtenidos en este trabajo, las razas más frecuentes en tomate en Uruguay corresponden a T3 (48%) y T1 (28), similar a lo que ocurre en Estados Unidos y Brasil. No se encontró relación entre zona de origen de los aislamientos con las razas.

El 88% de aislamientos presentaron resistencia *in vitro* a 200 ppm de sulfato de cobre. El 24% y 28% de los aislamientos fueron resistentes a 100 y 10 ppm de estreptomina, respectivamente. El 10% y 100% presentaron resistencia a 200 y 100 ppm de kasugamicina, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

BOUZAR, H.; JONES, J.B.; SOMODI, G.C.; STALL, R.E.; DAOUZLI, N.; LAMBE, R.C.; FELIX-GASTELUM, R.; TRINIDAD-CORREA, R. 1996. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper fields of Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18(1):75-77.

BOUZAR, H.; JONES, J.B.; STALL, R.E.; HODGE, N.C.; MINSAVAGE, G.V.; BENEDICT, A.A.; ALVAREZ, A.M. 1994. Physiological, chemical, serological, and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology*, 84(7):663-671.

JONES, J. B.; LACY, G. H.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. 2004. Reclassification of the *Xanthomonads* Associated with Bacterial Spot Disease of Tomato and Pepper. *Systematic and applied microbiology*. 27: 755-762

JONES, J.B.; STALL, R.E.; SCOTT, J.W.; SOMODI, G.C.; BOUZAR, H.; HODGE, N.C. 1995. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease*, 79(4):395-398.

MAESO, D.; NÚÑEZ, S.; NÚÑEZ, P.; MIERES, I.; CONDE, P.; DUARTE, F.; BRUNO, A. 2005. Evaluación del impacto ambiental de los plaguicidas en la Producción hortifrutícola (Parte 2. Cultivos hortícolas) (en prensa)

MARTIN, H. L.; HAMILTON, V. A.; KOPITKE, R. A. 2004. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. *Plant. Dis.* 88:921-924.

O'GARRO, L. W. 1998. Bacterial spot of tomato and pepper on four East Caribbean islands: races, their abundance, distribution, aggressiveness, and prospects for control. *Plant Disease* 82:864-870.

PERNEZNY, K.; NAGATA, R.; HAVRANEK, N.; SANCHEZ, J. 2008. Comparison of two culture media for determination of the copper control with copper bactericidas. *Crop Protection* 27: 256–262

QUEZADO-DUVAL, A. M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE, R. P. JR.; CAMARGO, L. E. A. 2003. Sensibilidade a cobre, estreptomina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira*. 21 (4) 670-675.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LEITE, R. P. JR.; LOPES, C.A.; LIMA, M. F.; CAMARGO, L. E. A. 2005. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. *Acta Horticulturae* 695.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LEITE, R. P. JR.; TRUFFI, D.; CAMARGO, L. E. A. 2004. Outbreaks of Bacterial Spot Caused by *Xanthomonas gardneri* on Processing Tomato in Central-West Brazil. Plant disease. 88: 157 - 161

SAHIN, F.; MILLER, S. A. 1996. Characterization of Ohio Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Causal Agent of Bacterial Spot of Pepper. Plant Disease. 80:773-778.

URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS. 2010. Encuestas Hortícolas 2009, Zonas Sur y Litoral Norte (en línea) Consultado nov. 2010. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,98,O,S,0,MNU;E;39;6;MNU>.

MOMENTOS DE APLICACIÓN DE FUNGICIDAS CUPRICOS PARA EL CONTROL DE MANCHA BACTERIANA DEL TOMATE. TEMPORADA 2009-2010.

Responsable: Diego Maeso.

Colaboradores: Wilma Walasek, Alfredo Fernández.

INTRODUCCIÓN

La mancha bacteriana del tomate causada por *Xanthomonas* spp. es una de las enfermedades más importantes del cultivo a campo provocando pérdida de área foliar, muerte de flores, manchado de fruto y, cuando el ataque es muy severo, la muerte de la planta. Para su control normalmente se realizan múltiples aplicaciones de productos a base de cobre, muchas veces en forma semanal, solos o en mezcla con otros fungicidas o antibióticos. Los trabajos experimentales que se han venido realizando en INIA LB desde hace ya algunos años han demostrado la posibilidad de racionalizar el control del tizón temprano mediante el sistema de pronóstico *Tomcast*. Sin embargo, esta estrategia de aplicaciones debe ser complementada para cubrir el control de mancha bacteriana, el cual debería estar basado en la ocurrencia de condiciones favorables para la enfermedad. Para ello se han llevado a cabo durante el período 2007-2009 experimentos en los que efectuando las aplicaciones de productos a base de cobre según la ocurrencia de lluvias se obtuvo un control similar al logrado con aplicaciones semanales con un número menor de intervenciones. Tomando en cuenta que en alguna de las temporadas evaluadas la enfermedad atacó en forma temprana, se comenzaron experimentos con la finalidad de conocer si el control de esta enfermedad puede ser mejorado al comenzar las aplicaciones de cúpricos desde el almácigo.

Metodología.

Localización: Campo experimental, INIA Las Brujas.

Fechas de almácigo: 30/11/2009.

Fecha de trasplante: 21/1/10.

Distancia de plantación: 1,50 x 0,50 m.

Diseño experimental: Bloques al azar con cuatro repeticiones.

Parcela: Tres surcos de seis metros de largo, tomate industria sin entutorar.

Aplicaciones: Con máquina de mochila. Gasto 600 l./há en máxima expansión de follaje.

Variedad: Loica.

Enfermedad: Mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.).

TRATAMIENTOS

Aplicaciones de cobre en:

1. Almacigo, semanales y en cultivo trasplantado previo a la ocurrencia de lluvias.
2. En cultivo trasplantado previamente a la ocurrencia de lluvias.
3. Almacigo semanales y semanales en cultivo trasplantado.
4. Cultivo trasplantado semanales.
5. Sin aplicaciones de cobre.
6. Almacigo semanales.

Los tratamientos 1, 3 y 6 recibieron tres aplicaciones de cobre en almacigo (24, 31/12/09, y 7/1/10).

El control de enfermedades a hongos se realizó siguiendo el sistema de pronóstico Tomcast utilizando únicamente clorotalonil (Bravo 500, 3 l/há). El compuesto a base de cobre utilizado en el experimento fue Kop-hidróxido (hidróxido de cobre) a la dosis de 3 kg/ha. El control de insectos, ácaros, etc. fue el mismo para todos los tratamientos y se realizó en forma independiente a los tratamientos.

Registro de condiciones climáticas:

Los datos climáticos usados para el cálculo de las unidades diarias de Tomcast que definieron las aplicaciones para el control de tizón temprano provenían de una estación con sensores en el cultivo a 30 cm. del suelo situada en INIA LB. Los pronósticos de lluvia de la Dirección Nacional de Meteorología se consultaban a través del vínculo con la página <http://www.inia.org.uy/online/site/25017811.php>.

Evaluaciones:

De daños a follaje: Se realizaron cinco evaluaciones de daños a follaje por mancha bacteriana en 2010 (23/3, 30/3, 6/4, 20/4, 27/4 y 5/5) usando una estimación visual del porcentaje de área foliar afectada por planta en 10 plantas del surco central de cada parcela.

De rendimientos: Se evaluó el peso, el número de frutos obtenidos por parcela en dos cosechas (21/4 y 6/5/2010) y el número de frutos afectado por enfermedades.

RESULTADOS

Aplicaciones

Las aplicaciones realizadas aparecen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Aplicaciones realizadas **luego de trasplante** en los diferentes tratamientos. Temporada 2009-10.

Tratamientos	Febrero				Marzo								Abril						Total		
	11	12	18	25	3	5	12	17	19	23	26	31	9	12	16	20	23	27		30	
1 y 2. Pre-lluvias		X	X	X	X			X				X		X	X			X			9
3 y 4. Semanal.	X		X	X		X	X		X		X	X	X		X		X		X		12
5 y 6. Sin tratar.																					0
Fungicidas Tomcast (18 DSV).				X						X			X			X					4

Las aplicaciones durante el almácigo (tratamientos 1, 3 y 6) se hicieron en las siguientes fechas: 24/12, 31/12/09, 7/1 y 14/1/10.

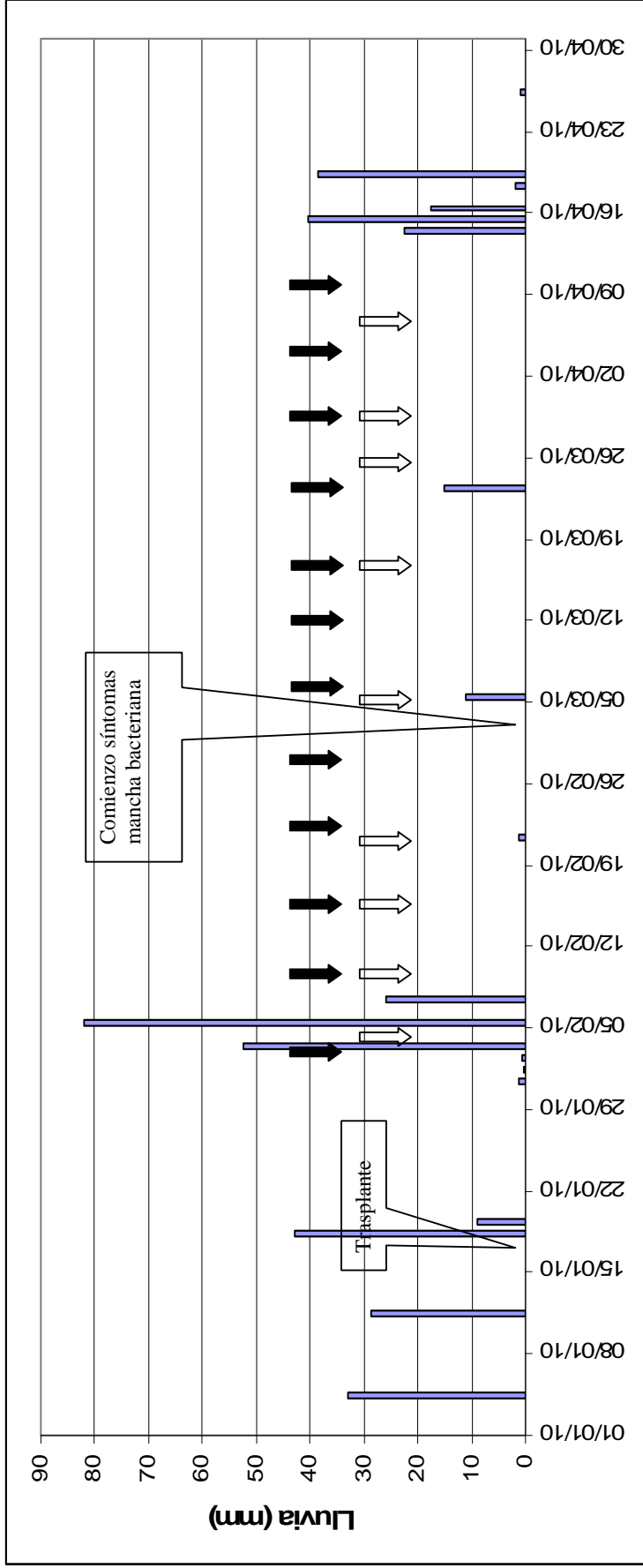


Figura 1. Registro de precipitaciones y aplicaciones durante el ensayo 2010.

 Tratamientos 3 y 4
  Tratamientos 1 y 2

Evaluaciones de daños al follaje:

Los primeros ataques de mancha bacteriana se observaron a mediados de marzo y aquellos de tizón temprano a fines de abril.

En el cuadro 2 se muestran los resultados de las evaluaciones de daños al follaje por mancha bacteriana por planta.

Cuadro 2. Área foliar afectada con mancha bacteriana (por planta) ¹.

Tratamiento	23/03	30/03	06/04	20/04	27/04	5/5	AUDPC ²
1. En almácigo y pre-lluvias en cultivo trasplantado.	1.8 a ³	5.5 a	5.3 a	8.7 a	12.1 a	20.0 a	365 a
2. Pre-lluvias cultivo trasplantado.	1.7 a	5.0 a	4.6 a	16.0 ab	21.8 ab	19.8 a	501 a
3. En almácigo y semanal en cultivo trasplantado.	1.7 a	3.7 a	6.4 a	16.9 ab	20.7 ab	19.3 a	511 a
4. Semanal en cultivo trasplantado.	2.2 a	5.8 a	8.6 a	17.8 b	29.8 b	34.2 a	688 a
5. Testigo sin tratar.	8.0 b	22.6 b	31.1 b	49.6 c	67.8 c	75.8 b	1853 b
6. Solo en almácigo.	8.5 b	29.2 b	37.4 b	48.1 c	65.2 c	72.9 b	1922 b
Coefficiente de variación (%)	39	25	21	16	20	19	15

¹ Promedio del área foliar afectada por la enfermedad por planta (%). Valores corregidos por $\arcsen\sqrt{\%}$ para efectuar análisis estadístico.

²AUDPC = Área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

³ Las medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba Duncan al 5%.

Cuadro 3. Área foliar afectada con tizón temprano¹.

Tratamiento	20/04/2010	27/04/2010	AUDPC ²
1. En almácigo y pre-lluvias en cultivo trasplantado.	2.75 a	11.1 a	46 a
2. Pre-lluvias cultivo trasplantado.	5.10 ab	14.4 ab	75 ab
3. En almácigo y semanal en cultivo trasplantado.	3.95 ab	14.9 ab	65 ab
4. Semanal en cultivo trasplantado.	6.85 b	15.2 ab	96 b
5. Testigo sin tratar.	7.48 b	15.8 ab	105 b
6. Solo en almácigo.	7.56 b	16.9 b	109 b
Coefficiente de variación (%)	29	20	26

¹ Promedio del área foliar afectada por la enfermedad por planta (%). Valores corregidos por $\arcsen\sqrt{\%}$ para efectuar análisis estadístico.

²AUDPC = Área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

³ Las medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba Duncan al 5%.

Rendimientos:

En el cuadro 3 se muestran los rendimientos obtenidos en número y peso totales por hectárea y en el cuadro 4 los porcentajes adjudicados a lesiones en frutos.

Cuadro 3. Rendimientos totales en número y toneladas por hectárea.

Tratamiento	Rendimiento total ¹	
	Número (miles/há)	Peso ton/há
1. En almácigo y pre-lluvias en cultivo trasplantado	267	16,04
2. Pre-lluvias cultivo trasplantado.	392	23,50
3. En almácigo y semanal en cultivo trasplantado.	353	21,83
4. Semanal en cultivo trasplantado.	325	18,54
5. Testigo sin tratar.	311	16,21
6. Solo en almácigo.	270	14,04
Coeficiente de variación	27	29

¹ NS, sin diferencias significativas en el ANOVA.

Cuadro 4. Descarte de frutos por enfermedades.

Tratamiento	Porcentaje de frutos descartados por ¹ :		
	Total	Mancha Bacteriana	Antracnosis
1. En almácigo y pre-lluvias en cultivo trasplantado.	4.0	2.2	0.3
2. Pre-lluvias cultivo trasplantado.	11.3	2.7	2.0
3. En almácigo y semanal en cultivo trasplantado.	6.0	1.7	0.9
4. Semanal en cultivo trasplantado.	7.5	2.6	0.4
5. Testigo sin tratar.	10.8	2.3	3.4
6. Solo en almácigo.	9.0	2.5	2.3
Coeficiente de variación	19.0	33	58.0

¹ NS, sin diferencias significativas en el ANOVA.

COMENTARIOS

- Se confirmó el efecto de la aplicación de productos a base de cobre en el control de mancha bacteriana.
- Nuevamente se observa que es posible realizar estas aplicaciones previamente a la ocurrencia de precipitaciones basándose en los pronósticos de lluvia sin perder eficacia en el control.
- Finalmente, si bien se observa una tendencia a que los tratamientos que incluían aplicaciones durante la etapa de almácigo presentaran un mejor control, ésta no es muy clara, por que deberá ser estudiada más en detalle.
- Como en otras oportunidades se observa un efecto secundario de las aplicaciones de cobre sobre el control de tizón temprano.
- Los rendimientos obtenidos no deben ser tomados en cuenta en el análisis ya que fueron muy bajos debido a causas ajenas a las variables estudiadas en el experimento.

EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE PRONÓSTICO “TOMCAST” PARA EL CONTROL DE TIZÓN TEMPRANO (*Alternaria tomatophila*) EN TOMATE. TEMPORADA 2009-10.

Responsable: Diego Maeso.

Colaboradores: Jorge Arboleya, Alfredo Fernández.

INTRODUCCIÓN

El tizón temprano del tomate o “alternaria”, causado por el hongo *Alternaria tomatophila* (ex.*Alternaria solani*), es una de las enfermedades foliares más importantes del cultivo a campo. Para su control normalmente se realizan múltiples aplicaciones de funguicidas, algunas de ellas innecesarias. Desde hace ya un tiempo se ha desarrollado en los EEUU un sistema de pronóstico conocido con el nombre de TOMCAST (asociación de las palabras **Tomato** y **cast** en inglés, o sea tomate y pronóstico) el cual ha sido validado e implementado en ese país. Con los datos climáticos se calculan valores de severidad de enfermedad diarios (DSV) los cuales se suman y las aplicaciones se recomiendan cada vez que se supere un umbral de acumulación de DSV (variable según regiones y productos usados). El uso de este sistema fue validado en trabajos de investigación previos en INIA LB, encontrándose un adecuado control de tizón temprano aún espaciando las aplicaciones con un umbral de 18 DSV. Los trabajos que se presentan a continuación buscan conocer si se puede lograr un control aceptable comenzando las aplicaciones luego de la aparición de síntomas y a su vez ver estudiar la complementación de este sistema con aplicaciones de cobre para el control de mancha bacteriana.

Localización: Campo experimental, INIA Las Brujas.

Fecha de almácigo: 30/11/2009.

Fecha de transplante: 27/1/10.

Distancia de plantación: 1,50 x 0,50 m.

Parcela: Tres surcos de seis metros de largo, tomate industria sin entutorar.

Aplicaciones: Con máquina de mochila. Gasto 600 l/há en máxima expansión de follaje.

Variedad: Loica.

Diseño experimental: Bloques al azar con cuatro repeticiones.

Enfermedades: Tizón temprano (*Alternaria tomatophilla*) y efecto sobre mancha bacteriana y enfermedades de fruto y bacterianas.

Tratamientos

Tomcast acumulación 18 unidades.

1. Aplicación inicial previa a la aparición de síntomas, clorotalonil + hidróxido de cobre.
2. Aplicación inicial con síntomas incipientes (5% de follaje afectado), clorotalonil + hidróxido de cobre.
3. Aplicación inicial con enfermedad instalada (10% de follaje afectado), clorotalonil + hidróxido de cobre.
4. Ídem 2, solo clorotalonil. Las aplicaciones de cúpricos pre-lluvia.
5. Ídem 3, solo clorotalonil. Las aplicaciones de cúpricos pre-lluvia.
6. Testigo sin tratar. Aplicaciones de cúpricos pre-lluvia.

Las aplicaciones se realizaron cuando se alcanzó una acumulación de 18 unidades Tomcast (“disease severity values” o DSV) desde la aplicación anterior. Las unidades diarias (DSV) se calcularon en base a temperatura y horas con follaje mojado. Las aplicaciones Kop-hidróxido (hidróxido de cobre) a 3 kg/ha para el control de mancha bacteriana se hicieron de diferente forma en los tratamientos. En los tratamientos 1, 2, y 3 se realizaron junto a las de fungicidas recomendadas por Tomcast mientras que en los tratamientos 4, 5 y 6 se efectuaron cuando existió pronóstico de lluvia.

Registro de condiciones climáticas:

Los datos climáticos usados para el cálculo de las unidades diarias que definieron las aplicaciones provenían de una estación meteorológica ubicada en el cultivo con sensores a 30 cm. del suelo. Debido a desperfectos en el sensor de hoja mojada de dicho instrumento, a partir de fines de marzo la ocurrencia de hoja mojada fue estimada en base a humedad relativa superior a 90%.

Productos:

Los tratamientos evaluados recibieron aplicaciones de: Bravo 500 (clorotalonil) 3,0 l/ha para el control de tizón temprano (cuadro 2) y de Kop-hidróxido (hidróxido de cobre) a 3 kg/ha. El control de insectos, ácaros, etc. fue el mismo para todos los tratamientos y se realizó en forma independiente a los tratamientos.

Evaluaciones:

De daños a follaje: Se realizaron seis evaluaciones de daños a follaje por tizón temprano (23/3, 30/3, 6/4, 20/4, 27/4 y 5/5). Se registró el porcentaje de área foliar dañada por la enfermedad en cada planta y también se realizaron evaluaciones sobre daños por mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) usando una estimación visual del porcentaje de área foliar afectada por planta.

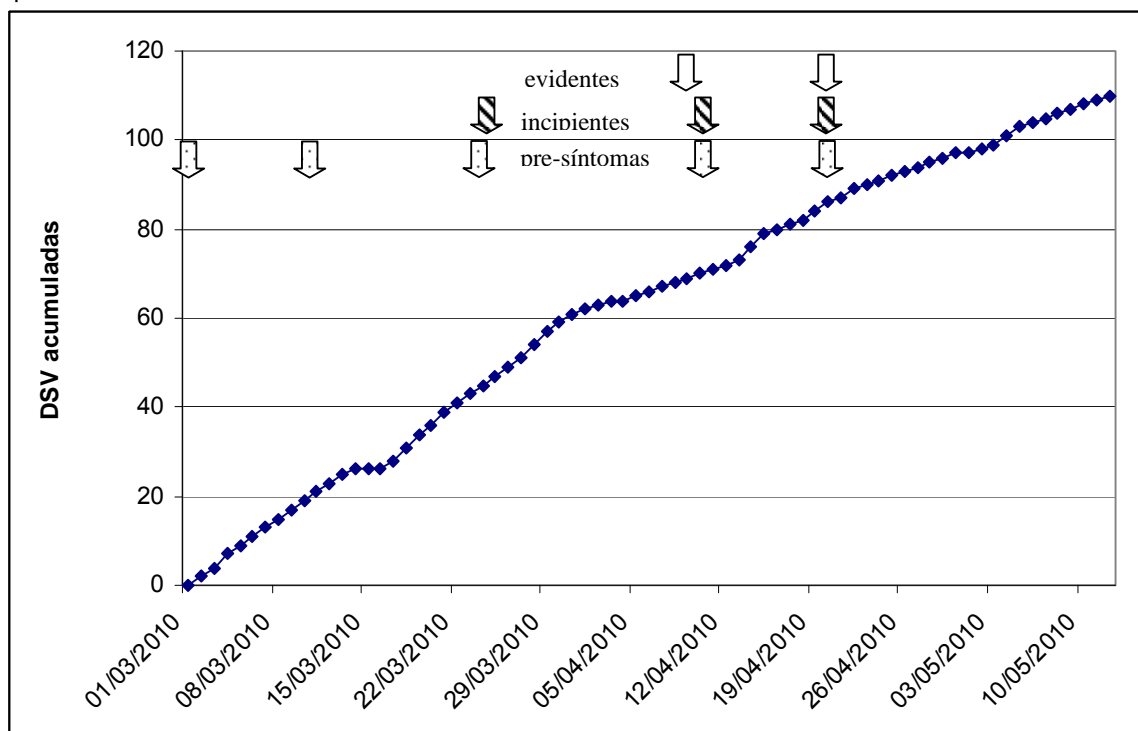
De rendimientos: Se evaluó el peso y número de frutos obtenidos por parcela en cuatro cosechas (26/4, 6/5, 17/5 y 27/5/2010). También se registró el número de frutos en cada cosecha afectados por otras enfermedades.

RESULTADOS

Evolución de las unidades de severidad TOMCAST.

En la figura 1 se muestra la evolución de las unidades TOMCAST (DSV) en relación con las aplicaciones efectuadas.

Figura 1. Evolución de las unidades diarias Tomcast acumuladas y su relación con las aplicaciones efectuadas.



Aplicaciones

Las aplicaciones realizadas así como los productos usados aparecen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Aplicaciones realizadas en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Febrero	Marzo						Abril						TOTAL		
	25	3	10	17	23	24	31	6	8	9	12	16	20	27	C ¹	K ₂
1. aplicación inicial pre-síntomas, con cúpricos.	C+K		C+K		C+K				C+K				C+K		5	5
2. aplicación inicial a sínts. incipientes, con cúpricos.						C+K			C+K				C+K		3	3
3 aplicación inicial con enfermedad instalada, complementadas con cúpricos.								C+K					C+K		2	2
4. aplicación inicial a sínts. incipientes, cúpricos pre-lluvia.	K	K		K		C	K		C	K	K	K	C	K	3	8
5 aplicación inicial con enfermedad instalada, cúpricos pre-lluvia.	K	K		K			K	C		K	K	K	C	K	2	8
6. Testigo sin tratar., cúpricos pre-lluvia	K	K		K			K			K	K	K		K	0	8

¹ C= Clorotalonil, ²K= Hidróxido de cobre.

Evaluaciones de daños al follaje:

En el cuadro 2 se muestran los resultados de las evaluaciones de área foliar afectada por tizón temprano y en el cuadro 3 las de mancha bacteriana asociada.

Cuadro 2. Área foliar afectada con tizón temprano. Temporada 2010.

Tratamiento	06/04	20/04	27/04	AUDPC ¹
1. aplicación inicial pre-síntomas, con cúpricos.	6.9 ab	11.7 ab	14.2 a	665 a
2. aplicación inicial a sínts. incipientes, con cúpricos.	6.8 ab	17.6 ab	18.5 a	699 a
3 aplicación inicial con enfermedad instalada, complementadas con cúpricos.	12.8 bc	20.4 bc	22.1 a	831 a
4. aplicación inicial a sínts. incipientes, cúpricos pre-lluvia.	6.0 a	9.3 a	16.8 a	862 a
5 aplicación inicial con enfermedad instalada, cúpricos pre-lluvia.	13.3 bc	17.0 ab	22.5 a	895 a
6. Testigo sin tratar.	18.4 c	30.35 c	42.2 b	1187 b
CV Coeficiente de variación (CV%)	28	20	22	17

¹ AUDPC = Área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

² Las medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba Duncan al 5%.

Porcentajes transformados por arc sen[√]% para el análisis estadístico.

Cuadro 3. Área foliar afectada con mancha bacteriana. Temporada 2010.

Tratamiento	20/04	27/04	AUDPC ¹
1. aplicación inicial pre-síntomas, con cúpricos.	19.6 ² b	26.6 b	779 b
2. aplicación inicial a sínts. incipientes, con cúpricos.	33.5 c	49.9 d	1214 c
3 aplicación inicial con enfermedad instalada, complementadas con cúpricos.	30.0 c	37.9 c	1206 c
4. aplicación inicial a sínts. incipientes, cúpricos pre-lluvia.	11.6 a	14.5 a	514 a
5 aplicación inicial con enfermedad instalada, cúpricos pre-lluvia.	9.5 a	12.3 a	465 a
6. Testigo sin tratar cúpricos pre-lluvia.	13.9 ab	15.0 a	465 a
Coeficiente de variación (CV%)	15	10	22

¹ AUDPC = Área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

² Las medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba Duncan al 5%.

Porcentajes transformados por arc sen[√]% para el análisis estadístico.

Rendimientos:

En el cuadro 4 se muestran los rendimientos totales obtenidos en número y peso por hectárea y en el cuadro 6 los porcentajes adjudicados a lesiones en frutos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Cuadro 4. Rendimiento total en número y toneladas por hectárea.

Tratamiento	Rendimiento total ¹	
	Peso ton/há	Número (miles/há)
1. aplicación inicial pre-síntomas, con cúpricos.	46	538
2. aplicación inicial a sínts. incipientes, con cúpricos.	41	474
3 aplicación inicial con enfermedad instalada, complementadas con cúpricos.	43	480
4. aplicación inicial a sínts. incipientes, cúpricos pre-lluvia.	48	558
5 aplicación inicial con enfermedad instalada, cúpricos pre-lluvia.	46	486
6. Testigo sin tratar, cúpricos pre-lluvia.	49	563
Coeficiente de variación (CV%)	13	14

¹ NS. Sin diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 5. Descarte de frutos por enfermedades.

Tratamiento	Porcentaje de frutos descartados por:		
	Total	Bacterias	Antracnosis
1. aplicación inicial pre-síntomas, con cúpricos.	3.6	0.9	1.2
2. aplicación inicial a sínts. incipientes, con cúpricos.	2.8	0.8	0.5
3 aplicación inicial con enfermedad instalada, complementadas con cúpricos.	1.8	0.5	0.5
4. aplicación inicial a sínts. incipientes, cúpricos pre-lluvia.	2.2	0.4	0.6
5 aplicación inicial con enfermedad instalada, cúpricos pre-lluvia.	2.9	1.1	0.9
6. Testigo sin tratar.	1.8	1.1	0.1
Coeficiente de variación (CV%)	54	69	70

¹ NS. Sin diferencias estadísticamente significativas.

COMENTARIOS

- 1) En esta temporada la severidad del tizón temprano no fue relativamente muy alta, se llegó a fin de cultivo en el testigo con únicamente un 40% de superficie foliar afectada.
- 2) Bajo esas circunstancias todas las alternativas del sistema TOMCAST comparadas lograron controlar la enfermedad obteniéndose únicamente diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo sin tratar.
- 3) Tal como ocurrió en las temporadas anteriores los valores numéricos de mejor control se obtuvieron en aquellas alternativas que comenzaron las aplicaciones preventivamente o con síntomas incipientes, por esa razón no sería recomendable diferir mucho en el tiempo el comienzo de las aplicaciones de fungicidas.
- 4) En esta temporada al igual que en las anteriores se evidencia la necesidad de complementar el control de mancha bacteriana usando una estrategia de aplicaciones diferente a las indicadas por Tomcast. Esto se observa claramente en el mejor control de mancha bacteriana presentado por los tratamientos en que las aplicaciones de cúpricos se hicieron previo a las lluvias (tratamientos 4, 5 y 6).
- 5) No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los rendimientos obtenidos coincidiendo con lo establecido en 1).

EVALUACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL DEL USO DE PLAGUICIDAS EN SISTEMAS DE PRODUCCION HORTÍCOLAS: ESTUDIO DE CASOS

Responsables

Saturnino Núñez, Diego Maeso, Stella Zerbino, Noelia Casco, Paula Conde (INIA)
Carmen Ciganda, Lucía Graña, Yanet Pedrazzi (MSP)

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo es resultado de un proyecto financiado por el Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT) del CONICYT ejecutado entre los años 2007 y 2009.

El objetivo perseguido fue la evaluación del impacto ambiental derivado del uso de plaguicidas en diferentes sistemas hortícolas y frutícolas mediante el estudio de casos. Como antecedente directo tiene un trabajo realizado por INIA entre los años 2004 y 2005 en el cual el impacto ambiental del uso de plaguicidas fue evaluado a través de dos enfoques: 1) uso de índices categóricos y 2) aplicación de modelos de destino en cuencas de pequeñas corrientes de agua. Los valores calculados fueron contrastados con valores de referencia (toxicidad para organismos vivos) y determinaciones de plaguicidas en suelo y agua. Debido a algunas limitaciones que se observaron en esos estudios, fundamentalmente debido a la diversidad de situaciones, se decidió continuar trabajando en el tema mediante el análisis de casos estudiando a fondo parámetros que pudieran estar influenciados por el manejo de plaguicidas en predios representativos de los sistemas a evaluar: producción convencional, integrada y orgánica.

En este repartido se presentará la información obtenida en cultivos hortícolas la cual en algunos casos se comparará con la correspondiente de cultivos frutícolas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se dividió en las siguientes áreas:

1) Estimación y determinación de residuos de plaguicidas en suelo y agua.

Se aplicaron modelos de estimación de niveles de plaguicidas en suelo de acuerdo al uso en cada predio. Teniendo en cuenta que el laboratorio donde se realizaron los análisis de residuos de plaguicidas en suelo no contaba con los protocolos necesarios para detectar muchos de los plaguicidas utilizados por los productores (p.ej. ditiocarbamatos y nuevos plaguicidas como neonicotinoides, fisiológicos y spinosoides), se consideró que como primer aproximación, la aplicación de modelos matemáticos que supusieran la “peor situación” de residuos de plaguicidas, nos permitiría, mediante la comparación con los LC 50 de organismos indicadores como las lombrices de tierra, conocer si en esa “peor situación” era esperable algún impacto sobre estos organismos indicadores. En el caso que se detectara alguna situación de riesgo, se aplicarían modelos más realistas.

Para ello se incluyeron los plaguicidas utilizados durante los dos meses previos a la cosecha. Como “peor situación” se consideró el nivel de residuo esperado inmediatamente de aplicado el plaguicida, sin tener en cuenta la degradación del mismo de acuerdo a los días de aplicación. Para ello el modelo matemático aplicado fue el siguiente:

$((\text{Dosis i.a./ha} * (1 - \text{intercepción del cultivo})) / 100 * 5\text{cm de profundidad} * \text{densidad de suelo})$

Los valores obtenidos se comparan con valores de tabla de los LC50 de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra).

Paralelamente se tomaron muestras de suelo y agua de reservorios para riego y se enviaron a dos laboratorios para su análisis: Laboratorio de Calidad de Alimentos-Calidad de productos de la Facultad de Agronomía (para la detección de cobre) y Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química (plaguicidas en general).

2) Estudios preliminares acerca de efectos sobre la salud del productor y de sus trabajadores.

Estos estudios estuvieron a cargo de la Dirección de Higiene Ocupacional del Ministerio de Salud Pública. En una primera etapa se preparó un protocolo médico en el cual se establecieron los análisis a efectuar y la encuesta sanitaria. El análisis principal fue la determinación de la variación de los niveles de la enzima colinesterasa, muy relacionados con la aplicación de insecticidas fosforados, a productores/aplicadores y población control. Se realizaron análisis de niveles de colinesterasa y exámenes médicos generales a un total de 58 trabajadores rurales relacionados con predios horti-frutícolas en estudio.

3) Determinación de biodiversidad en suelo/follaje.

En los predios seleccionados mediante distintas herramientas de muestreo se realizaron relevamientos de fauna aérea y de suelo en dos momentos del ciclo del cultivo. Se determinó el número de individuos perteneciente a cada grupo taxonómico y se calculó para cada muestreo el índice de diversidad de Shannon..

RESULTADOS

Se colectó la información correspondiente al número de aplicaciones y tipo de plaguicidas utilizados. Debido a que el Programa de Producción Integrada fue discontinuado durante la ejecución de este trabajo los productores seleccionados como ejemplo de este sistema de producción no siguieron estrictamente las normas del programa, por lo tanto las diferencias esperadas respecto a los ejemplos de producción convencional se debieron más bien a decisiones propias de cada productor y no a la forma de trabajo del sistema. A pesar de esto si analizamos el número de aplicaciones de plaguicidas, en general los productores convencionales realizaron mayor número de aplicaciones que los integrados y orgánicos. En cuanto al tipo de productos utilizados, en general la mayor diferencia se encontró entre los productores del sistema orgánico del resto, ya que los únicos productos usados por ellos fueron cobre, azufre, aceite y mezcla sulfocálcica y tabaco. En tomate, los productores seleccionados como ejemplos de producción integrada no utilizaron productos acordes con este sistema, por lo cual no se detectaron las diferencias esperadas en este aspecto (productos más selectivos, menos tóxicos y más amigables con el medio ambiente). En base a este resultado la comparación entre sistemas de producción

(convencional, integrado y orgánico) perdió su vigencia, por lo tanto los índices de impacto ambiental se determinaron tomando en cuenta el uso de plaguicidas no por sistema sino por predio.

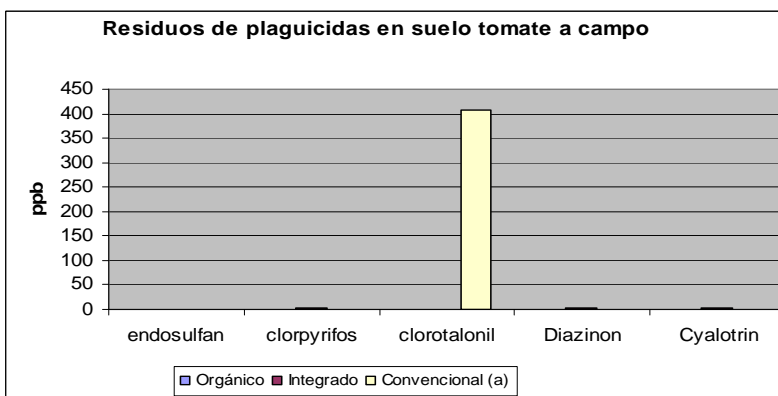
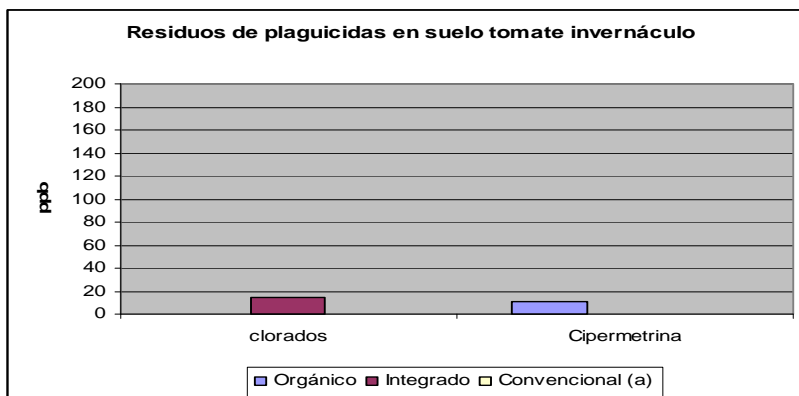
Otro factor que distorsionó los resultados en invernáculo de tomate fue que el productor seleccionado como convencional debió abandonar su cultivo por un ataque inmanejable de mosca blanca, por eso los resultados obtenidos en ese predio perdieron su valor como representativo de ese sistema de producción.

NÚMERO DE APLICACIONES SEGÚN TIPO DE PLAGUICIDA UTILIZADO SEGÚN CULTIVO Y SISTEMA DE PRODUCCIÓN

Tomate	Campo			Invernáculo		
	Convencional	Integrada	Orgánica	Convencional	Integrada	Orgánica
INSECTICIDAS	10	8	0	1	3	4
Aceite mineral	1	0	0	0	0	0
Neonicotinoides	0	3	0	0	0	0
Fosforados	7	0	0	0	0	0
Pirroles	1	0	0	1	0	0
Fisiológicos	0	1	0	0	2	0
Piretroides	1	3	0	0	0	0
Spinosoides	0	1	0	0	1	0
Botánicos	0	0	0	0	0	4
FUNGICIDAS	24	17	0	5	4	2
Azufrados	0	0	0	0	0	2
Phthalimidas	1	3	0	0	0	0
Estrobirulinas	0	0	0	0	2	0
Grupo Clorotalonil	10	0	0	0	0	0
IBE	0	0	0	1	2	0
Dithiocarbamatos	2	6	0	2	0	0
Cupricos	11	8	0	2	0	0
OTROS	6	0	5	0	0	0
Ascofol	0	0	5	0	0	0
yodo	6	0	0	0	0	0

1) Estimación y determinación de residuos de plaguicidas en suelo y agua.

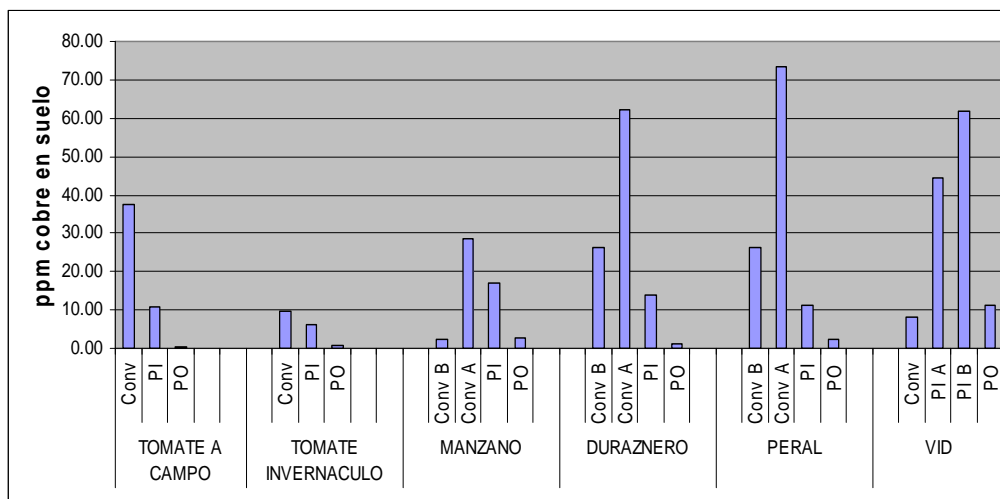
Los niveles de residuos de plaguicidas detectados en suelo fueron prácticamente despreciables, no obstante, debe destacarse que no fue posible la detección de varios grupos de plaguicidas utilizados por los productores por la falta de protocolos de análisis por parte del laboratorio de análisis al cual se enviaron las muestras.



Es de destacar que a pesar de que los insecticidas clorados no se usan en el país desde hace más de 30 años, en la mayoría de los suelos analizados se detectaron metabolitos de este grupo de plaguicidas. Esto coincide con lo que se conoce sobre este tipo de insecticidas en cuanto a su persistencia.

A excepción del clorotalonil en suelo de tomate a campo, todos los plaguicidas detectados se encuentran en niveles inferiores a las 10ppb. En ningún caso los niveles encontrados pueden ser considerados riesgosos si los comparamos con los LC 50 de lombrices de tierra.

Llama la atención de que en el caso del productor orgánico de tomate se detectaron residuos de cipermetrina. El productor mencionado ha comentado que en el predio lindero se había cultivado soja, por lo tanto una posibilidad de este hallazgo puede ser la existencia de deriva desde ese cultivo.



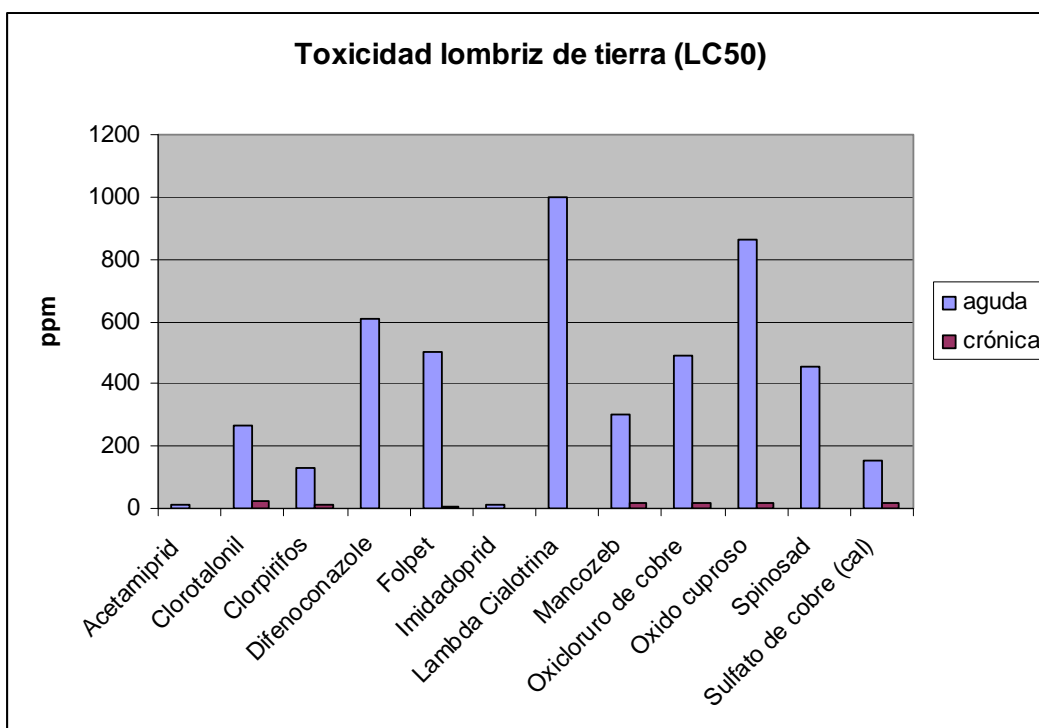
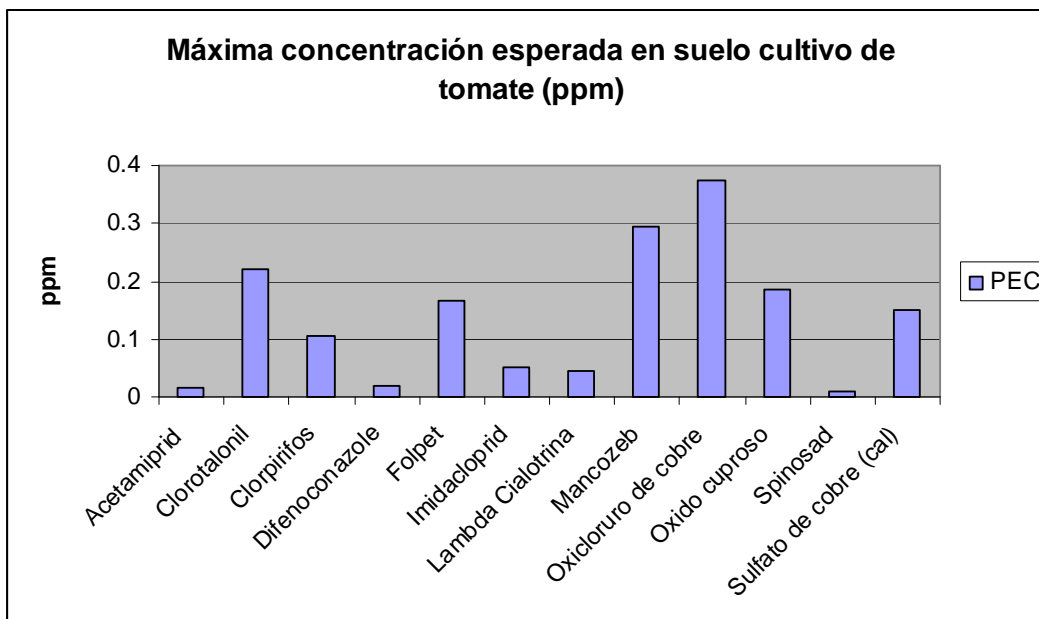
Los análisis de cobre realizados en suelo mostraron un comportamiento totalmente distinto al de los plaguicidas sintéticos. Se detectó su presencia en todas las muestras, y en algunos casos, a niveles que según la bibliografía pueden ser tóxicos para ciertos microorganismos de suelo.

Los mayores niveles no fueron encontrados en los predios de producción orgánica donde se usan corrientemente plaguicidas cúpricos. Independientemente del sistema de producción evaluado, los mayores niveles de cobre en suelo se detectaron en los cultivos perennes, lo que se debería a su uso reiterado durante muchos años en el mismo terreno y los tratamientos pre-primaverales de cobre.

Respecto a los análisis de residuos de cobre en reservas de agua, entre diciembre de 2007 a febrero de 2008 se muestrearon todos aquellos productores que disponían de reservas de agua como polders, tajamares y pozos escavados. De 11 predios analizados solo se detectó cobre en el productor convencional de viña. La cantidad detectada fue de 0,029 mg de Cu/ litro de agua.

Comparación de residuos de plaguicidas detectados respecto a modelos de predicción de concentración ambiental (PEC).

Los siguientes gráficos permiten realizar las comparaciones respectivas. En todos los casos los niveles estimados de residuos de plaguicidas, son al menos 100 veces inferiores a aquellos correspondientes a los LC50 del organismo indicador. Puede observarse que la mayoría de los plaguicidas utilizados no fueron detectados en los análisis químicos practicados, probablemente por las restricciones técnicas citadas anteriormente. No obstante existen varios plaguicidas, aunque en niveles muy bajos, que de acuerdo a la encuesta no fueron utilizados durante los últimos meses por los productores y se detectaron en los análisis químicos. Estos plaguicidas fueron fundamentalmente clopirifos, endosulfan, diazinon, clorotalonil y metilparation, los que en general tiene una vida media en el suelo relativamente larga. El caso más extremo es el de los insecticidas clorados, los que no se usan desde hace más de 30 años y aun se detectan residuos en suelo.

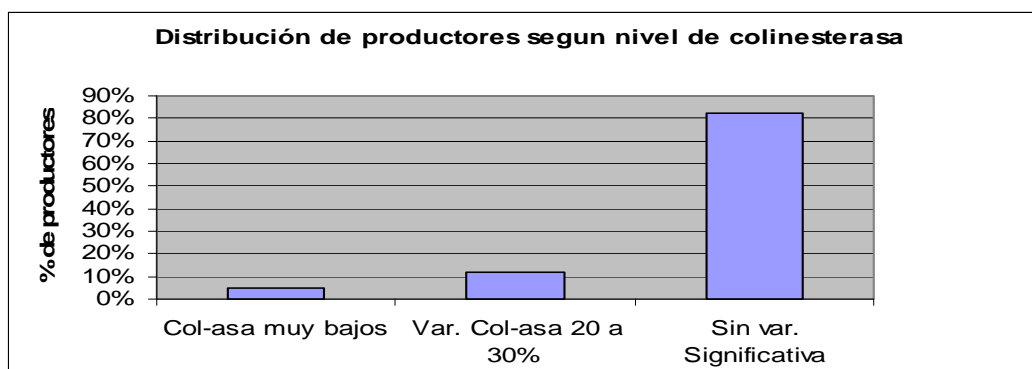
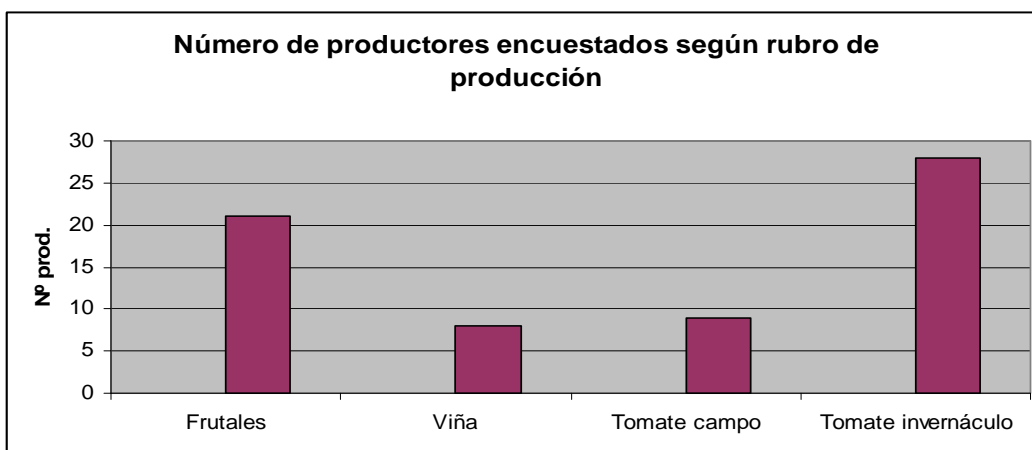


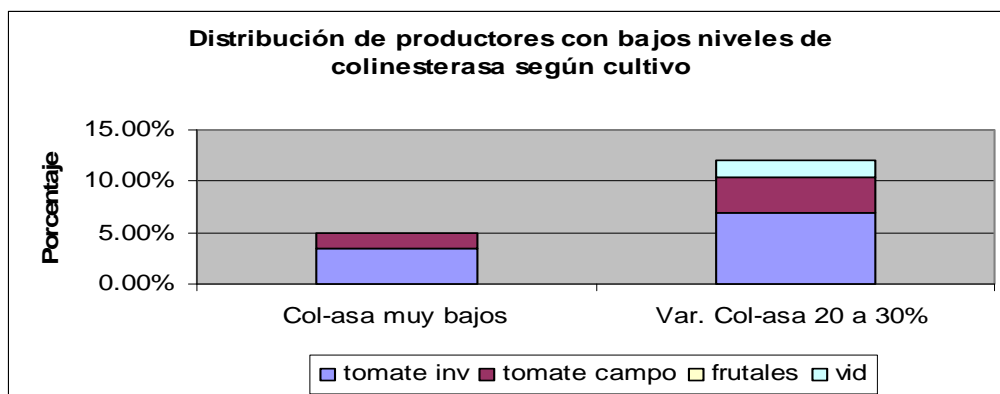
2) Estudios preliminares acerca de efectos sobre la salud del productor y de sus trabajadores.

La variación en los niveles de acetilcolinesterasa en sangre es un indicador de los niveles de exposición a insecticidas fosforados y carbamatos. De acuerdo a ello se analizó el nivel de esta enzima durante el período de exposición a estos plaguicidas (febrero 2008) y durante un período de no exposición (julio 2008). En total se analizaron de 58 trabajadores y o productores, en once predios.

A nivel de muchos países, se considera que las variaciones de acetilcolinesterasa entre los períodos de exposición y no exposición deben ser inferiores al 20%. Variaciones entre 20 y 30% deben ser consideradas potencialmente peligrosas, mientras que variaciones superiores al 30% debe procederse a la eliminación total de la exposición al plaguicida.

En los análisis de la variación de los niveles de acetilcolinesterasa se encontraron variaciones de esta enzima superiores al 30% en un 5% de los casos analizados (58). Mientras que se detectaron variaciones de entre un 20 a 30% en un 15% de los casos analizados. La mayoría correspondía a trabajadores o productores rurales vinculados a invernáculos.





3) Determinación de biodiversidad en suelo/follaje.

Biodiversidad en follaje

En las colectas realizadas mediante trampas de succión durante el período de mayor presión de uso de plaguicidas (diciembre-enero) se encontró en general mayor abundancia de artrópodos y valores más altos del índice de diversidad de Shannon en los predios donde se sigue el sistema de producción orgánica.

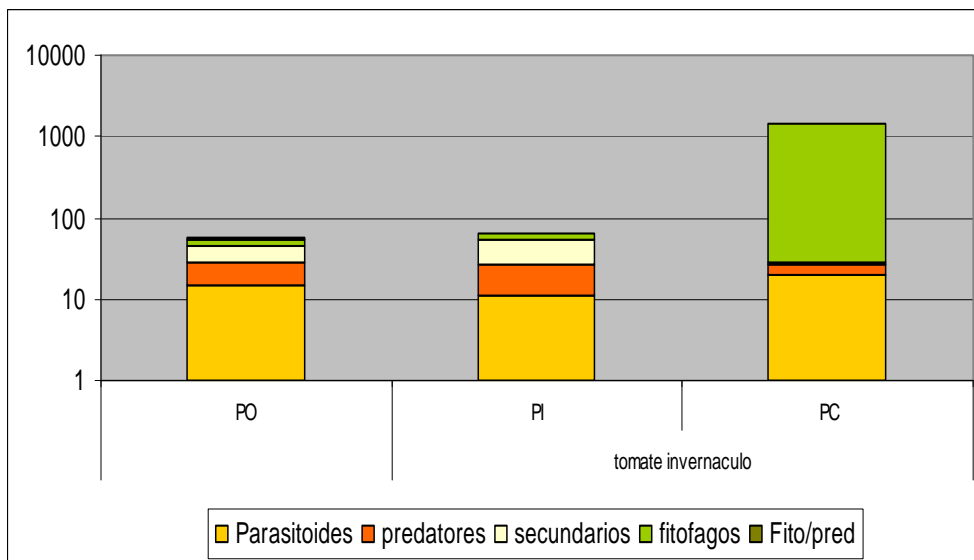
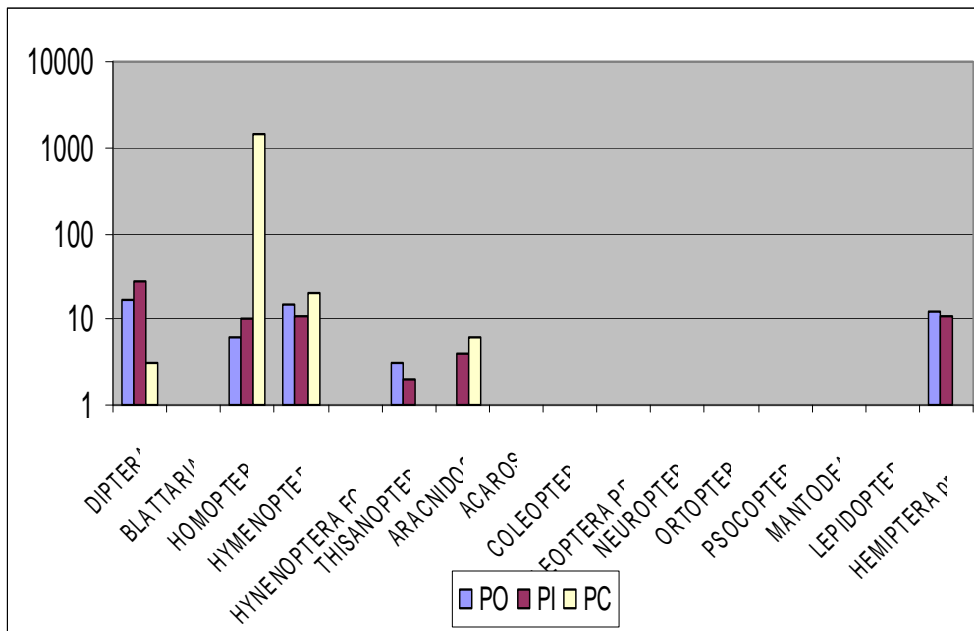
Por su parte, los predios que siguen el sistema de producción integrada presentaron valores intermedios de estos parámetros respecto a los de producción orgánica y convencional. No obstante, en algún caso en particular se registraron mejores valores en predios de producción convencional que de producción integrada. Estos casos específicos concuerdan con el hecho de que el productor convencional realizó menor número de aplicaciones de plaguicidas que el productor integrado. Las tendencias anteriormente discutidas son bastante más claras en cultivos perennes que en cultivos anuales.

DETERMINACIÓN DE MORFOESPECIES AEREAS (EPYGEAS) SEGÚN CULTIVO Y SISTEMA DE PRODUCCIÓN

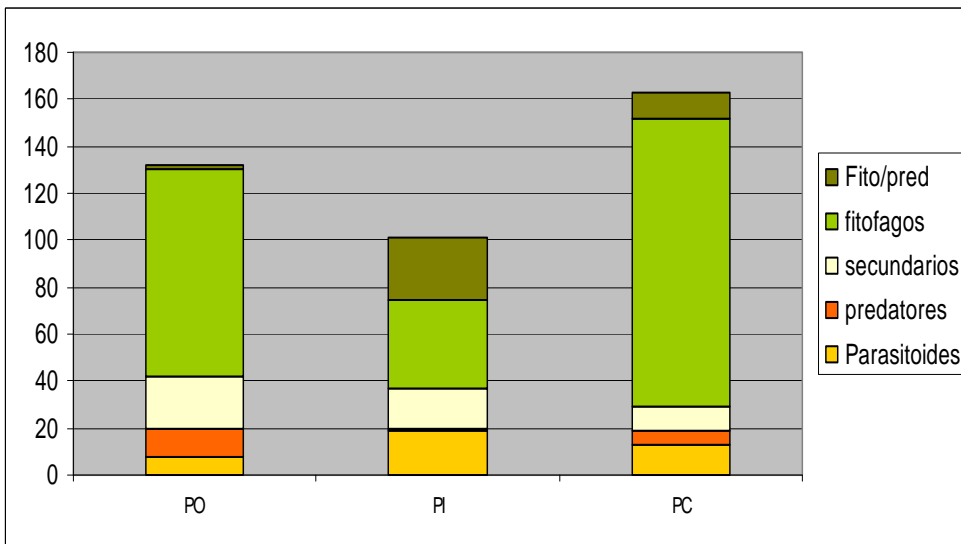
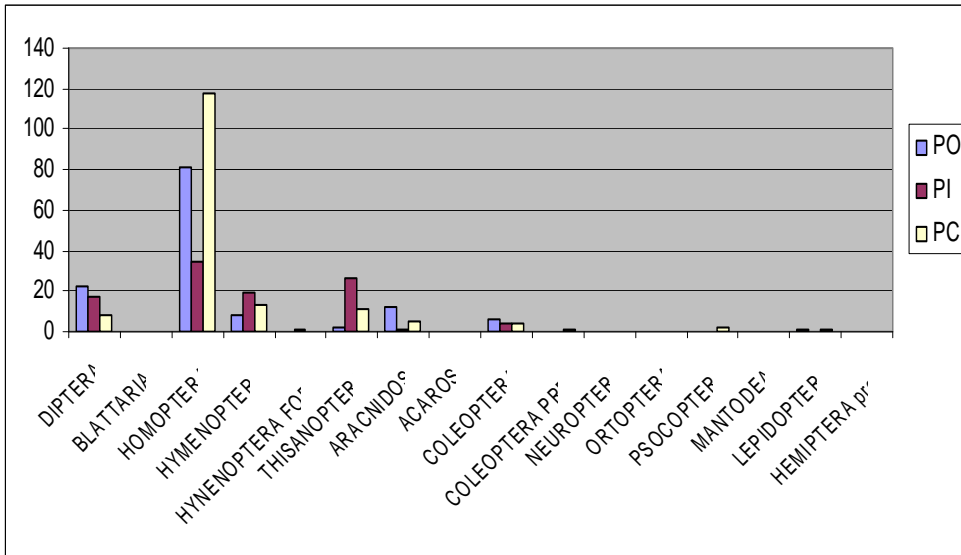
Rubro	Sistema	Nº total artrópodos	Riqueza (Nº de morfoespecies)	Diversidad Índice de Shannon
Tomate campo	O	133	22	1.97
	I	105	23	2.05
	C	169	22	1.4
Tomate invernáculo	O	77	22	2.07
	I	76	17	1.98
	C	1434	8	0.45

Desde el punto de vista de los distintos grupos identificados y su clasificación según grupos funcionales, existe prevalencia de parasitoides y predadores en los sistemas de producción orgánica. Esta tendencia fue mucho mas clara en los cultivos perennes que en tomate.

Tomate invernáculo:



Tomate campo:



PO. Producción orgánica
 PI. Producción integrada
 PC. Producción convencional

SISTEMA DE Biodiversidad en suelo

En el caso de los estudios realizados sobre la macrofauna del suelo, los predios bajo producción orgánica mostraron mayor abundancia de individuos, sin embargo esto no se reflejó en valores más altos del índice de diversidad. De acuerdo a las tendencias observadas es probable que la macrofauna del suelo sea mas afectada por el manejo de suelo que por los plaguicidas utilizados.

DETERMINACIÓN DE MORFOESPECIES EN SUELO (HIPOGEAS) SEGÚN CULTIVO Y PRODUCCIÓN

Rubro	Sistema	Densidad	Riqueza	Diversidad
-------	---------	----------	---------	------------

		Ind/m2	Nº de morfoespecies	Indice de Shannon
Tomate campo	O	84	15	2.28
	I	48	6	1.5
	C	56	15	2.58
Tomate invernáculo	O	546	14	0.96
	I	212	8	0.98
	C	54	4	1.16

AVANCES EN EL USO DE FEROMONAS SEXUALES PARA EL CONTROL DE POLILLA DEL TOMATE *Tuta absoluta*.

Ing. Agr. Jorge Paullier
Ing. Agr. Saturnino Núñez

INTRODUCCIÓN

Tuta absoluta es una de las principales plagas del tomate. Afecta los rendimientos comerciales de los cultivos y la calidad de los frutos, determinando en general el empleo de insecticidas químicos como método de control. La utilización no siempre racional de los insecticidas, evidenciado por la falta de oportunidad y la alta frecuencia de intervenciones, tiene como consecuencias el aumento de residuos tóxicos, mayores riesgos para la salud humana y el consecuente impacto ambiental negativo. El uso indiscriminado del control químico, ha hecho que en varios países se detectaran problemas de resistencia a distintos grupos de insecticidas.

En la búsqueda de métodos alternativos al control químico, las feromonas son una técnica compatible, selectiva y que no afecta el medio ambiente.

Las feromonas sexuales son los compuestos químicos producidos por las hembras del insecto, mediante los cuales los machos de la especie las encuentran y ocurre la fecundación.

Se han logrado sintetizar compuestos similares que causan el mismo efecto de atracción sobre los machos. La feromona sexual de *T. absoluta* ha sido identificada como una mezcla 9:1 de acetato de (E,Z,Z)-3,8,11- tetradecatrienilo (16) y acetato de (E,Z)-3,8- tetradecadienilo (3) respectivamente (Griepink 1996).

Los usos de las feromonas sexuales sintetizadas artificialmente son fundamentalmente dos: el monitoreo de poblaciones usando trampas de feromonas y el control de la plaga mediante la alteración del comportamiento de adultos.



Trampa de feromonas



Dispositivo con emisor de feromonas para control

Dentro de los usos de las feromonas sexuales para el control se tienen básicamente dos estrategias: la confusión sexual y los atracticidas. Estas técnicas de control con sus peculiaridades tienen en común que utilizan las feromonas sexuales sintéticas para interrumpir el ciclo reproductivo de los insectos.

ANTECEDENTES

En INIA Las Brujas se está trabajando en el desarrollo de un método en base a feromonas sexuales para el control de la polilla del tomate, evaluándose la eficacia en condiciones de producción de tomate bajo invernáculo.

Las investigaciones desarrolladas por el equipo de entomología de INIA Las Brujas en el periodo 2007 – 2008 concluyeron que:

- El efecto atrayente de los emisores de feromonas tiene una duración de al menos 105 días.
- El uso de la técnica logra inhibir las capturas del insecto en las trampas de feromonas.
- Una densidad de 32.000 emisores por hectárea, con 0,2 mg de feromona por emisor, redujo significativamente las capturas en trampas de feromonas con respecto al testigo, siendo superior al 96% hasta los 78 días, cayendo a 92% a los 106 días de su instalación.

Posteriormente los trabajos de investigación de las temporadas 2008 – 09 consistieron en evaluar el control de polilla a escala comercial con feromonas sexuales a una densidad de 32.000 emisores por hectárea comparado con un cultivo orgánico de tomate protegido con tres aplicaciones de insecticida Neem. Se concluyó que:

- En ambos tratamientos los niveles de daño de polilla fueron similares y se mantuvieron bajos durante todo el ciclo de cultivo no superando el 2%.
- El uso de feromonas fue comparable al control alcanzado con las aplicaciones del insecticida Neem.

Durante el año 2009 se evaluó la liberación de la feromona sexual de los emisores, según distintas dosis y solventes utilizados en la formulación, y su relación con la atractividad en invernáculos de tomate. Estos trabajos se llevaron a cabo en el marco de la pasantía realizada por la Lic. Qca. Carolina Sellanes.

Se analizaron los emisores formulados con la feromona en distintos solventes: hexano y diclorometano, y en dos concentraciones de feromona por emisor: 0,1 mg y 0,2 mg. Se determinó la concentración remanente de feromona en los emisores luego de ser expuestos en condiciones de invernáculo durante: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 105 días. Cada tratamiento estaba constituido por seis emisores, de los cuales dos se destinaron a su análisis químico y cuatro a la evaluación de su atractividad en el campo.

En general se observó una disminución estadísticamente significativa de la feromona remanente durante el período de exposición en el invernáculo.

Para la evaluación de la atractividad de los emisores de feromonas luego de los diferentes períodos de exposición en el campo, estos fueron instalados durante dos semanas en trampas tipo delta en cuatro invernáculos diferentes (repeticiones). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos. Debe destacarse sin embargo que el período de evaluación fue muy tardío (invierno) razón por la cual las capturas fueron muy bajas. Por este motivo los emisores fueron retirados del campo y conservados a temperaturas -18°C para su posterior re-evaluación.

En función de estos antecedentes se definieron tres líneas de investigación para develar las siguientes incógnitas: 1) ¿Efecto de la confusión sexual de adultos de *T. absoluta* sobre la disminución de daños al cultivo? 2) ¿Manteniendo los 32.000 emisores por hectárea la inhibición de las capturas es afectada por la disminución de dosis de feromona por emisor? 3) ¿De que manera afecta las capturas la disminución de la feromona en los emisores luego de distintos períodos de exposición en el campo?

Experimento 1

Objetivo

Evaluar el nivel de daño de polilla en cultivos de tomate con y sin confusión sexual de polilla.

Metodología

En cuatro macrotúneles experimentales aislados mediante malla antiáfidos, de 36 metros cuadrados cada uno, que partieron de poblaciones similares de polilla, se instalaron los tratamientos a ser evaluados. Dos macrotúneles correspondieron a la aplicación de feromonas sexuales a razón de 32.000 emisores por hectárea cargados con 0,2 mg de feromonas y los otros dos no fueron tratados utilizándose como testigos. El ensayo se desarrolló en la Estación Experimental INIA Las Brujas en un cultivo de tomate de otoño de 2010.

De manera de lograr niveles poblacionales de polilla similares, se liberaron polillas en los cuatro macrotúneles realizando una inoculación con pupas a razón de diez parejas por macrotúnel.

La determinación de los niveles de la plaga se llevó a cabo mediante las siguientes técnicas de muestreo:

- Conteo de capturas en trampas de feromonas tipo delta ubicadas en la hilera central de cada macrotúnel.

- Monitoreo del daño, determinando el número de larvas vivas de polilla presentes por planta. Se evaluaron diez plantas en cada macrotúnel y en cada planta se observaron los folíolos de las diez hojas superiores.



Minado de las hojas por la larva de polilla

Al inicio del ensayo se realizó una primera evaluación de daño y a principios de junio se realizó la evaluación final de daño, contabilizándose el número de larvas vivas de polilla en las hojas.

Características del ensayo:

Variedad	Michel
Fecha de transplante	3 de marzo de 2010
Instalación del ensayo – Fin del ensayo	5/4/10 – 3/6/10
Nº de emisores	32.000 / ha

Resultados y Discusión

En el siguiente cuadro se presentan las evaluaciones del número de larvas vivas promedio por planta para cada uno de los macrotúneles.

Fecha	Número de larvas de polilla/ planta			
	c/feromonas	c/feromonas	s/feromonas	s/feromonas
Abril 7	0,2	0,2	0,2	0,2
Junio 3	1,9	2,2	4,0	4,2

En el próximo cuadro se indican los valores de captura de adultos de polilla en trampas de feromonas en cada uno de los macrotúneles.

Fecha	Capturas de polilla/ trampa			
	c/feromonas	c/feromonas	s/feromonas	s/feromonas
Mayo 31	0	1	9	7

En la evaluación final se registró una población de larvas 50% menor en los macrotúneles tratados con feromonas en relación a los no tratados (testigo).

Experimento 2

Objetivo

Evaluar el efecto de la disminución de la cantidad de feromona por emisor, manteniendo la densidad de ellos en 32.000 /ha, sobre la inhibición de las capturas en trampas de feromonas.

Metodología

En cuatro macrotúneles experimentales de 36 metros cuadrados cada uno con cultivo de tomate con un muy alto nivel de ataque de polilla, se instalaron los tratamientos a ser evaluados. En los cuatro macrotúneles la aplicación de emisores fue a razón de 32.000 /ha difiriendo cada macrotúnel en la dosis de feromonas formulada por emisor. Los tratamientos evaluados fueron: 0,2 mg, 0,1 mg, 0,05 mg y testigo sin tratar. El ensayo se desarrolló en la Estación Experimental INIA Las Brujas en un cultivo de tomate de otoño de 2010.

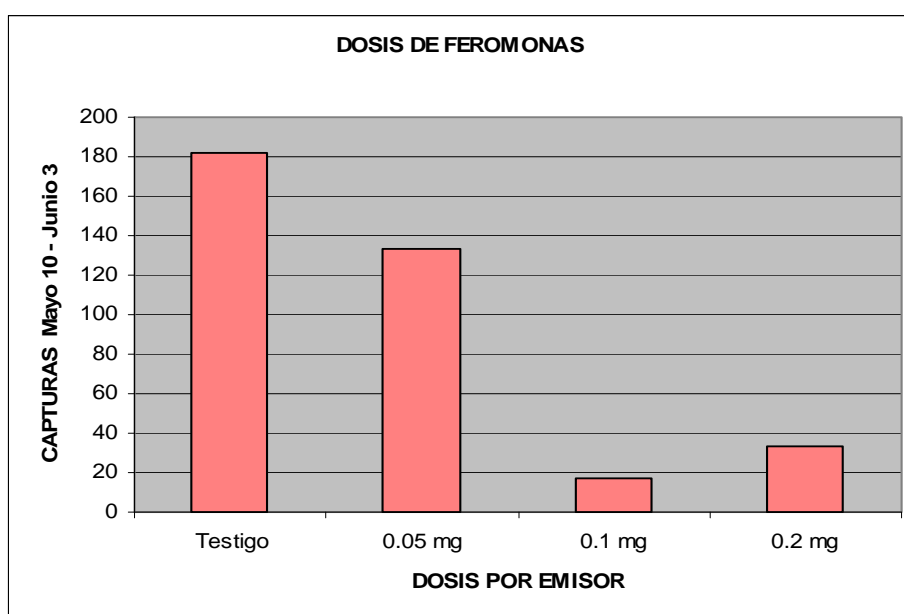
La determinación de la eficiencia de los tratamientos se realizó mediante el conteo de capturas en trampas de feromonas tipo delta ubicadas en la hilera central de cada uno de los macrotúneles. Se instalaron dos trampas de feromonas por macrotúnel.

Características del ensayo:

Variedad	Michel
Instalación del ensayo – Fin del ensayo	10/5/10 – 3/6/10
Nº de emisores	32.000 / ha

Resultados y Discusión

En el siguiente gráfico se observa el nivel de capturas promedio acumuladas en trampas de feromonas en los distintos tratamientos.



Los valores de las capturas obtenidos tanto en el testigo como a la dosis de 0,05 mg fueron claramente superiores a los registrados en los tratamientos a las dosis de 0,1 mg y 0,2 mg. Entre estos dos últimos tratamientos no existen diferencias claras, incluso las capturas son algo menores en el tratamiento con 0,1mg. Estos resultados sugieren que puede existir la posibilidad de reducir la dosis de feromonas por emisor de 0,2 a 0,1 mg, sin que se vea afectada la inhibición de las capturas de adultos.

Experimento 3

Objetivo

Determinar el efecto de la disminución de la feromona en los emisores luego de distintos períodos de exposición en el campo sobre las capturas de adultos.

Metodología

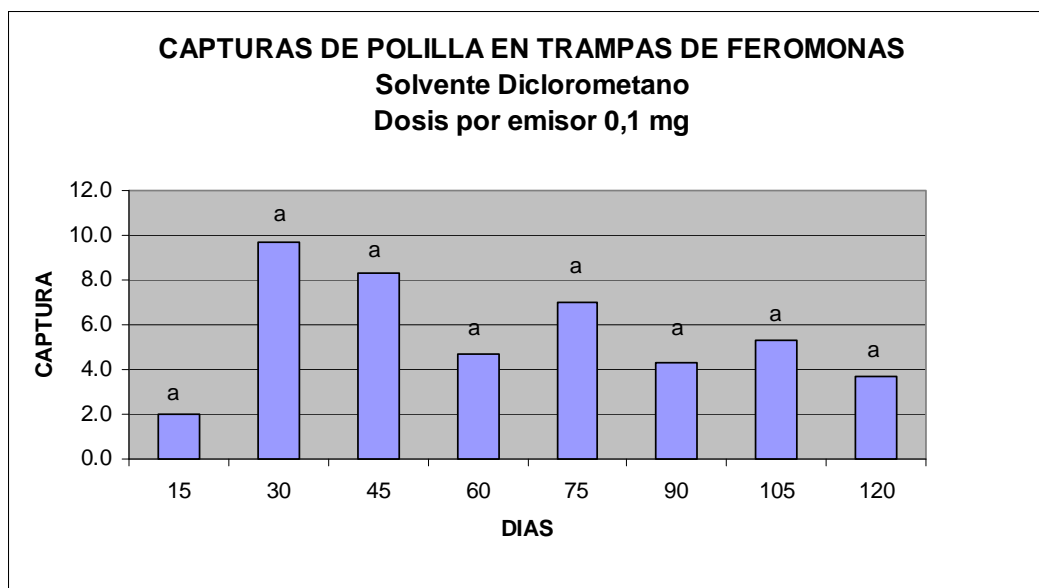
Se realizó un ensayo en invernáculos de tomate para evaluar la atracción de los emisores del año 2009 a través de las capturas en trampas.

Los emisores utilizados en el año 2009, formulados con distintos solventes (hexano o diclorometano) y con distintas dosis (0,1 y 0,2mg), con diferentes períodos de exposición en el campo (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 días), fueron almacenados en frío a -18°C para su evaluación en este ensayo. Para ello en otoño de 2010, en tres invernáculos comerciales de cultivo de tomate (variedad Michel) de 1.020 metros cuadrados cada uno, se instalaron las trampas con los emisores a ser evaluados. En cada uno de los invernáculos se colocaron 32 trampas, correspondientes a los distintos tratamientos a evaluar (dos solventes x dos dosis x ocho períodos de exposición). Cada invernáculo fue considerado una repetición. El ensayo se desarrolló en un predio comercial en la zona de Villanueva sobre la ruta 36.

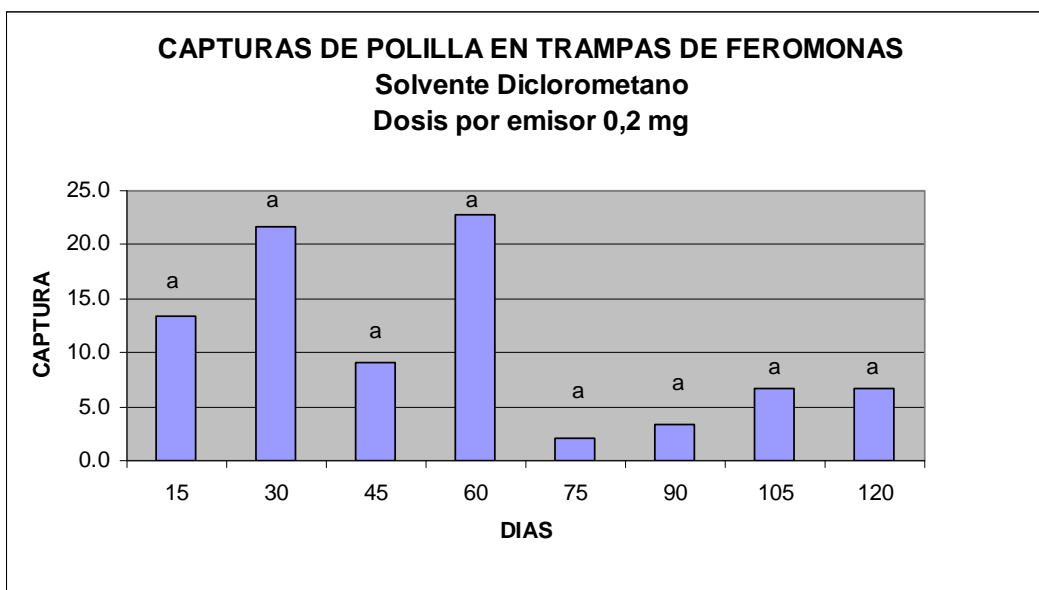
Las trampas permanecieron instaladas durante un período de tres semanas (28 de abril - 20 de mayo) al cabo del cual se retiraron contabilizándose el número de polillas capturadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

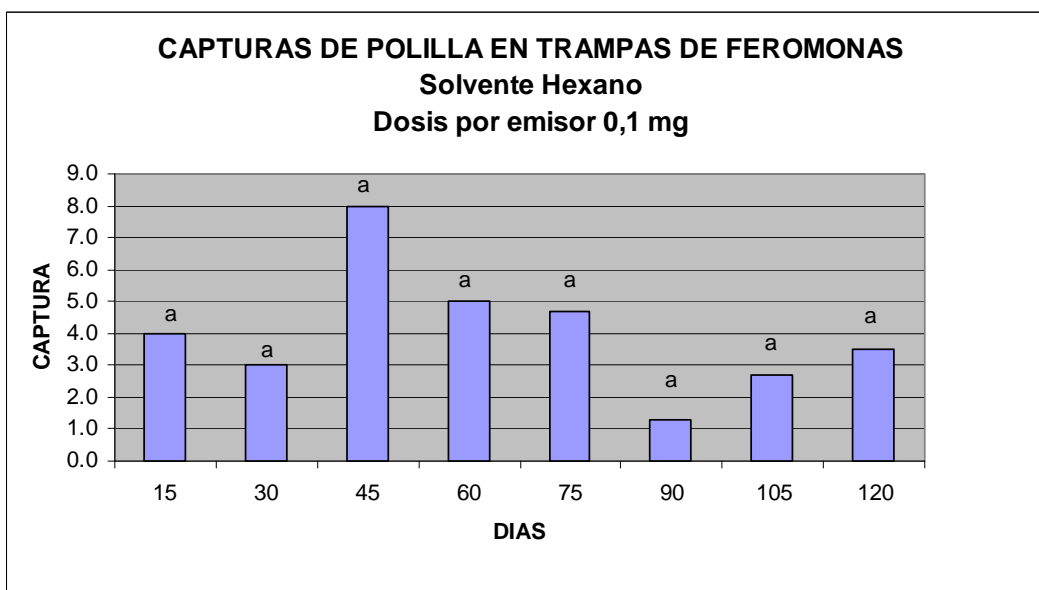
Los resultados del número promedio de polillas por trampa de feromonas son los siguientes:



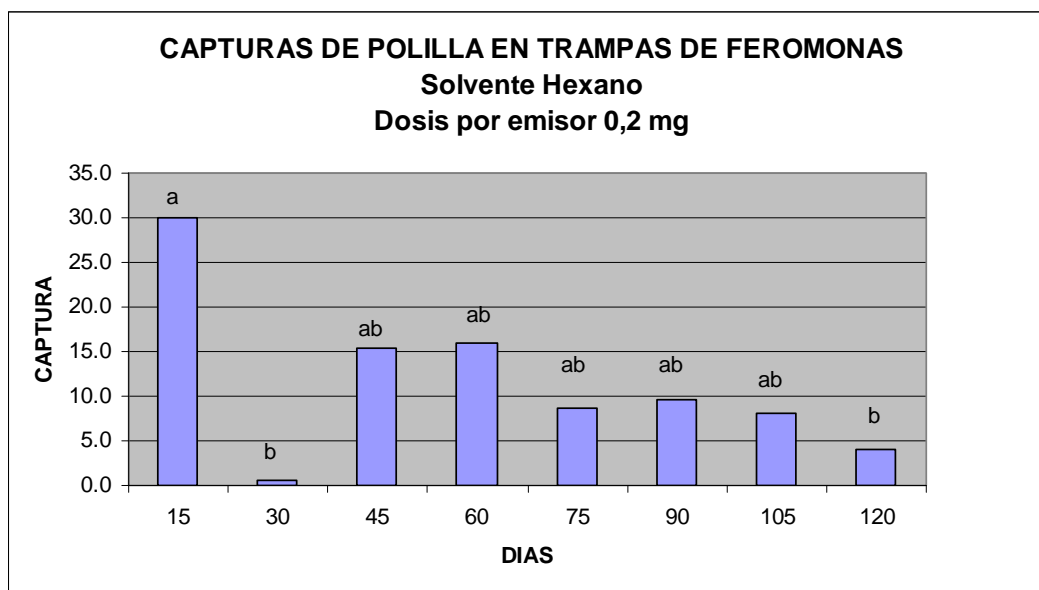
Capturas seguidas por igual letra no difieren significativamente al 5% por el test de Tukey.



Capturas seguidas por igual letra no difieren significativamente al 5% por el test de Tukey.



Capturas seguidas por igual letra no difieren significativamente al 5% por el test de Tukey.



Capturas seguidas por igual letra no difieren significativamente al 5% por el test de Tukey.

Si bien el análisis estadístico no arroja en general diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, dentro de cada tipo de formulación (solvente y dosis), existe una tendencia a que a partir de los 45 a 60 días las capturas sean ligeramente inferiores que en el primer tramo de exposición.

Estos resultados de capturas en trampas son similares a los obtenidos el año 2009 en invernáculos de tomate donde también se observó una menor captura de polillas en las trampas a mayor tiempo de exposición de los emisores.

Lo observado en el campo en invernáculos de tomate a través de las capturas en trampas guarda cierta relación con los resultados de los estudios de laboratorio, en cuanto a la disminución de las feromonas remanentes cuanto mayor es el plazo de tiempo que están expuestos los emisores.

ESTUDIOS DE LIBERACIÓN Y DEGRADACIÓN DE LA FEROMONA SEXUAL DE *TUTA ABSOLUTA* EN SEPTOS Y SU RELACIÓN CON LA ATRACTIVIDAD EN INVERNÁCULOS.

Carolina Sellanes^{1,2}, Facundo Ibañez¹, Andrés González², Saturnino Núñez¹.

1- INIA Las Brujas
2- Laboratorio de Ecología Química, DQO, Facultad de Química, UdelaR.

1- INTRODUCCIÓN

Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), conocida como la polilla del tomate, constituye una plaga de gran importancia económica en el cultivo de tomate. Si bien su rango de hospederos está limitado a las solanáceas (tomate, papa, tabaco), en Uruguay el cultivo atacado con mayor frecuencia e intensidad es el tomate [1].

En las regiones productoras, la principal estrategia de manejo de esta plaga es el control químico [3]. El control de esta plaga mediante pesticidas ha demostrado una limitada eficacia, aún incrementando las frecuencias de aplicación y variando el tipo de insecticida utilizado [4].

El control de las plagas mediante **confusión sexual** se basa en bloquear el canal de comunicación entre insectos machos y hembras, sobrecargando el ambiente con feromona sexual [5]. La feromona se encuentra impregnada en emisores que son distribuidos en grandes cantidades por todo el cultivo. De esta manera el macho no es capaz de localizar a la hembra, a los efectos del acoplamiento.

La técnica de **atractividas** consiste en colocar en el cultivo un gran número de emisores de feromona impregnados con insecticidas, así los machos son atraídos por la feromona y mueren por consecuencia del contacto con insecticida, disminuyendo la población de machos sustancialmente.

La feromona sexual de *T. absoluta* ha sido identificada como una mezcla 9:1 de acetato de (E,Z,Z)-3,8,11-tetradecatrienilo y acetato de (E,Z)-3,8-tetradecadienilo [6].

En estudios previos realizados en INIA Las Brujas se logró alterar la orientación de machos en casi un 100 % (medido como reducción en las capturas de trampas de feromonas respecto del testigo), mediante la instalación de 32.000 emisores por hectárea, cargados con 0,2 mg de la feromona [2].

En el presente trabajo se continúa con el estudio de la feromona sexual de *Tuta absoluta*. Se planteó realizar estudios vinculados a la liberación de la feromona de los septos, según distintas dosis y el solvente utilizado en la formulación, y su relación con la actividad biológica e identificar posibles productos de degradación de la feromona.

2- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Preparación de septos. Se prepararon soluciones de concentración 10 y 20 mg/ml de ambos componentes de la feromona, acetato de (E,Z,Z)-3,8,11-tetradecatrienilo y acetato de (E,Z)-3,8-tetradecadienilo (DLO Research Institute for Plant Protection (IPO-DLO) Wageningen, Holanda), en relación 9:1, en dos solventes diferentes, hexano y diclorometano (calidad analítica). En cada septo se agregó 0,1 o 0,2 mg de feromona (según correspondiera), y un antioxidante, el 4-metil-2,6-ditert-butil-fenol (ionol), en la misma cantidad que la feromona. En el ensayo se realizaron cuatro tratamientos, a los que se les denominó: hexano 0,1; hexano 0,2; diclorometano 0,1 y diclorometano 0,2, cada uno constituido por 48 septos formulados. Los septos se almacenaron envueltos en papel aluminio, en freezer a -18°C.

2.2- Experimento de degradación de feromona en invernáculo. De los 48 septos de cada tratamiento, seis se guardaron en freezer, correspondiendo estos a “tiempo 0”, ya que no estuvieron expuestos a condiciones de degradabilidad. Los restantes septos (42 septos por tratamiento), se colocaron en un invernáculo de tomate ubicado en INIA Las Brujas, colgados de un alambre. Cada 15 días se retiraron seis septos (4 repeticiones para evaluación en campo y 2 para análisis mediante cromatografía gaseosa) y se almacenaron envueltos en papel de aluminio, en freezer a -18 °C. Al cabo de tres meses y medio, para cada tratamiento, se contó con ocho grupos de seis septos cada uno, con diferentes tiempos de degradación: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 105 días respectivamente.

2.3- Construcción de trampas. Se construyeron 128 trampas tipo delta. Las mismas constan de un armazón de cartonplast blanco (15 cm de lado x 23,5 cm de largo), un piso engomado también de cartoplast blanco (20 cm x 23,5 cm) y de un alambre que se utiliza para colgar la trampa en el invernáculo. El pegamento utilizado para engomar los pisos es un pegamento especial para insectos. De las 128 trampas, 96 se impregnaron con un pegamento en spray originario de Japón y 32 se impregnaron con pegamento en lata. Todas las trampas con este último pegamento se colocan en el mismo invernáculo.

2.4- Experimento de captura de machos de *Tuta absoluta* con trampas de feromona. El experimento de capturas en invernáculo se llevo a cabo durante el mes de Julio. Cada septo se colocó en una trampa tipo delta (fig. 6), y ésta en un invernáculo. Las 4 réplicas de cada tratamiento, se distribuyeron en 4 invernáculos, constituyendo cada invernáculo un bloque. Dentro de cada bloque los tratamientos se asignaron al azar. Luego de dos semanas, se llevaron las trampas al laboratorio y se contabilizó el número de adultos capturados por trampa.

2.5- Identificación de compuestos de degradación de la feromona. Se analizaron por GC-MS las muestras correspondientes a los tiempos, 0 y 105 días, de los tratamientos hexano y diclorometano 0,2 mg, buscando diferencias en el perfil cromatográfico a ambos tiempos. Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu 2010, con una columna OPTIMA-5-MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm), acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu QP2010 Plus con ionización por impacto electrónico a 70 eV.

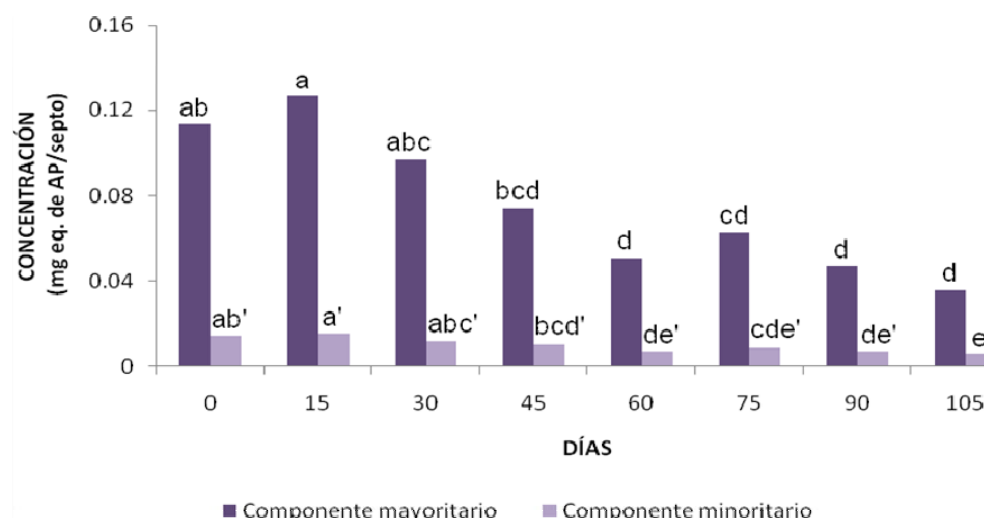
2.6- Análisis de la dinámica de emisión de la feromona. Para el análisis de la dinámica de emisión de feromona desde el septo se utilizó un sistema de tubos con flujo continuo de aire en un adsorbente sólido (Super Q: divinilbenceno/etilvinilbenceno).

2.7- Análisis estadístico de los datos. Tanto la cantidad de feromona remanente en los septos, como las capturas se compararon mediante un test de Tukey-Kramer post ANOVA, con un nivel de significancia del 5 %. Se utilizó el paquete estadístico JMP 8 de SAS Institute, Cary, NC, USA.

3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1- Septos de primavera 2007

Se analizaron, en primera instancia, septos utilizados en un experimento de capturas, que se realizó en la primavera del 2007 (Gráfica 1).



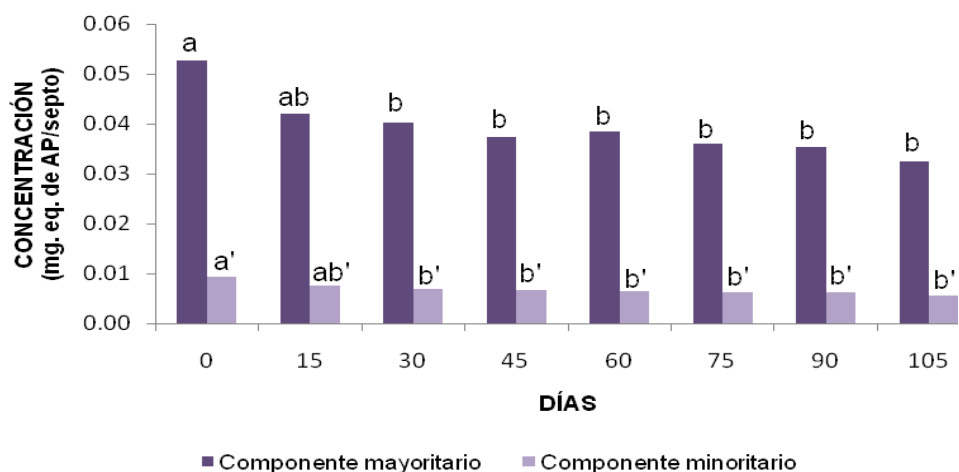
Gráfica 1. Concentración promedio remanente en los septos, de cada componente de la feromona (mg. eq. de AP/septo) vs días de degradación en invernáculo. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas, test de Tukey-Kramer post ANOVA ($\alpha=0.05$).

Se observa una disminución de ambos componentes de la feromona al transcurrir los 105 días. Esta disminución podría deberse tanto a la degradación como a la liberación de los componentes de la feromona desde el septo.

3.2- Septos de invierno 2009

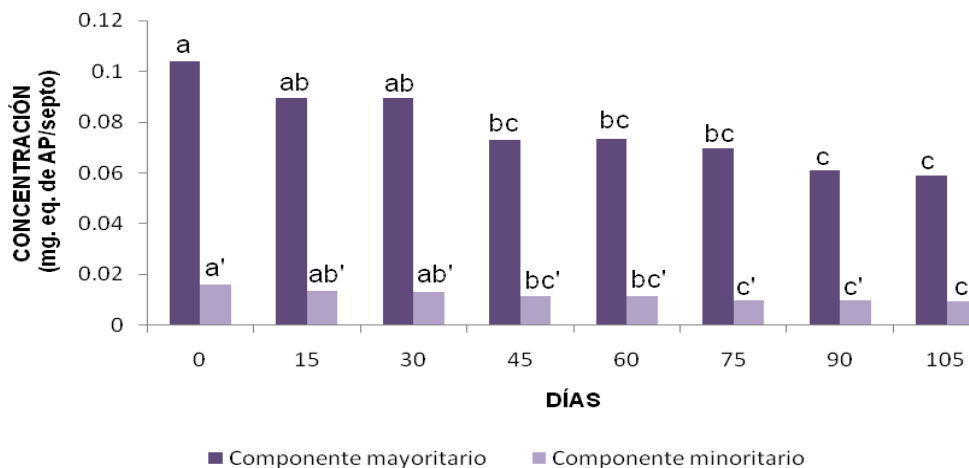
Se analizaron los septos de la temporada actual, que fueron preparados con la feromona en distintos solventes (hexano y diclorometano) y en distintas concentraciones (0,1 o 0,2 mg de feromona por septo, Gráficas 2-5).

Tratamiento: HEXANO 0,1 mg



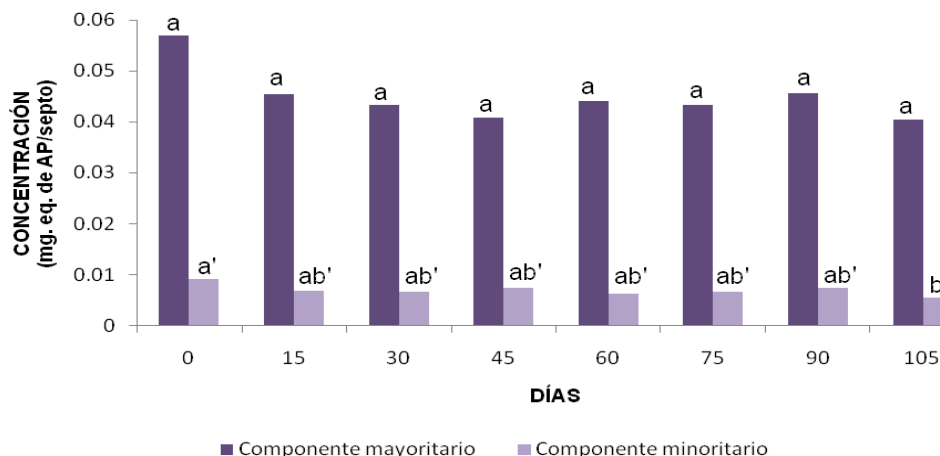
Gráfica 2. Concentración promedio remanente en los septos, de cada componente de la feromona (mg. eq. de AP/septo) vs días de degradación en invernáculo. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas, test de Tukey-Kramer post ANOVA ($\alpha=0.05$).

Tratamiento: HEXANO 0,2 mg



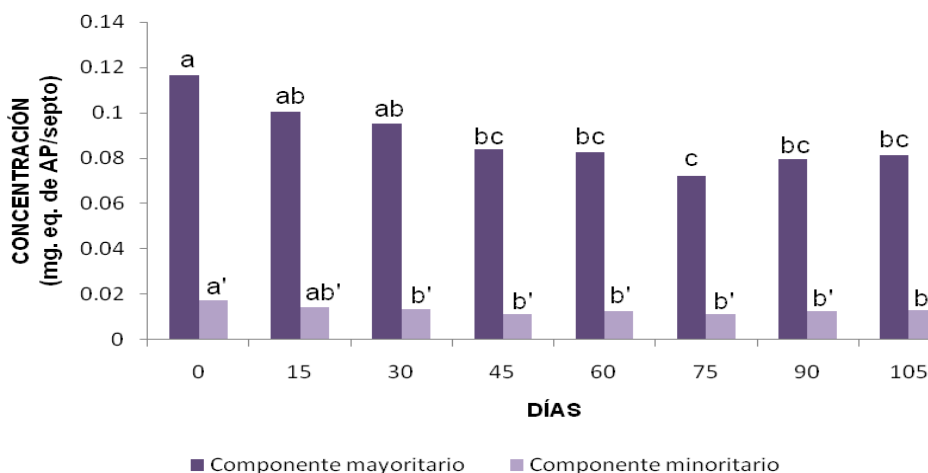
Gráfica 3. Concentración promedio remanente en los septos, de cada componente de la feromona (mg. eq. de AP/septo) vs días de degradación en invernáculo. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas, test de Tukey-Kramer post ANOVA ($\alpha=0.05$).

Tratamiento: DICLOROMETANO 0,1 mg



Gráfica 4. Concentración promedio remanente en los septos (DCM 0,1 mg), de cada componente de la feromona (mg. eq. de AP/septo) vs días de degradación en invernáculo. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas, test de Tukey-Kramer post ANOVA ($\alpha=0.05$).

Tratamiento: DICLOROMETANO 0,2 mg



Gráfica 5. Concentración promedio remanente en los septos (DCM 0,2 mg), de cada componente de la feromona (mg. eq. de AP/septo) vs días de degradación en invernáculo. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas, test de Tukey-Kramer post ANOVA ($\alpha=0.05$).

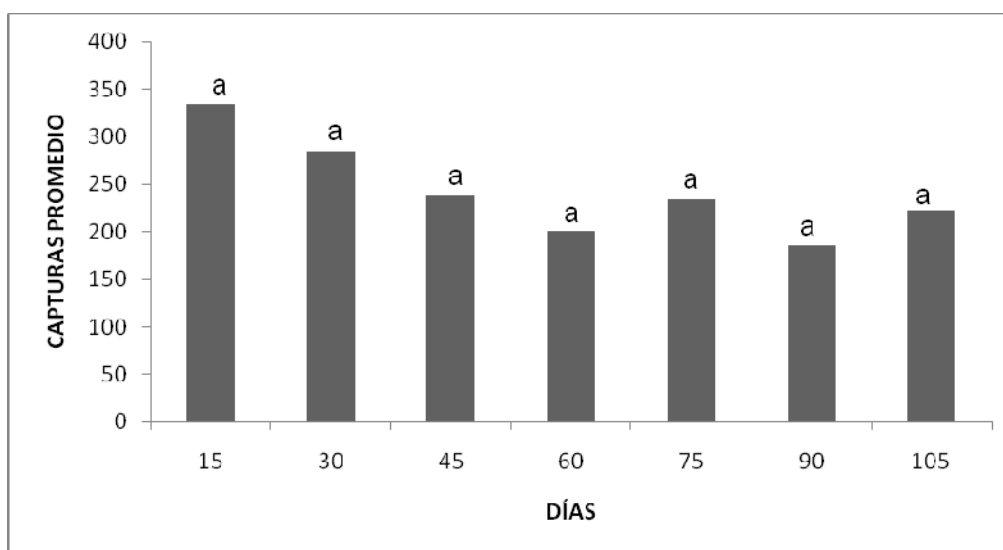
Se observa una disminución de la cantidad de feromona, tanto del componente mayoritario como del minoritario, al cabo de los 105 días. Una excepción se observa en el caso del componente mayoritario cuando el septo se prepara con 0,1 mg de la feromona en diclorometano, donde la cantidad no disminuye significativamente al cabo

de los 105 días según el test estadístico utilizado (Tukey-Kramer). Esta disminución puede estar dada principalmente por dos factores, la evaporación y la degradación de la feromona. Se observa a su vez, que el diclorometano presenta en los septos una cantidad remanente de feromona mayor. También se obtiene diferencia significativa entre las concentraciones 0,1 y 0,2 al realizar un test de student post ANOVA ($\alpha=0.05$). Al comparar las combinaciones posibles de solvente-concentración mediante un test de Tukey-Kramer, se observa diferencia significativa del solvente únicamente a concentración 0.2 mg/septo; a concentración 0.1 mg/septo no se observa diferencia significativa.

3.3- Experimento de captura de machos de *Tuta absoluta* con trampas de feromona

3.3.1- Capturas primavera 2007

Las trampas se mantuvieron en los invernáculos por una semana, contabilizándose luego la cantidad de polillas por trampa [2] (Gráfica 6).



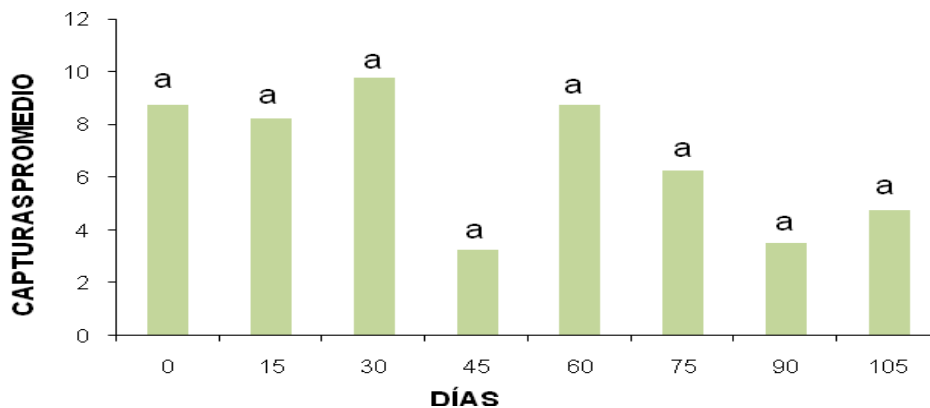
Gráfica 6. Capturas promedio de *Tuta absoluta* vs días de degradación en invernáculo. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas, test de Tukey post ANOVA ($\alpha=0.05$).

Las capturas promedio a través del tiempo, no muestran diferencias estadísticamente significativas ($\alpha= 0,05$).

3.3.2- Capturas invierno 2009

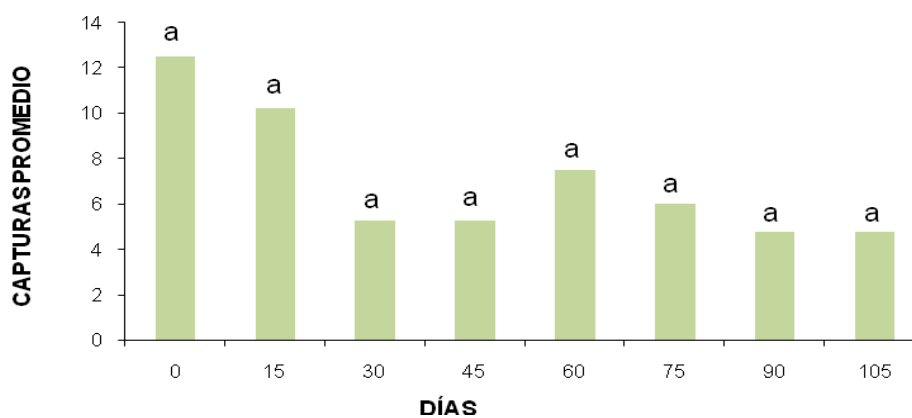
Las trampas se retiraron de los invernáculos luego de dos semanas, y se llevaron al laboratorio donde se contabilizó la cantidad de polillas por trampa (Gráficas 7-10).

Tratamiento: HEXANO 0,1 mg



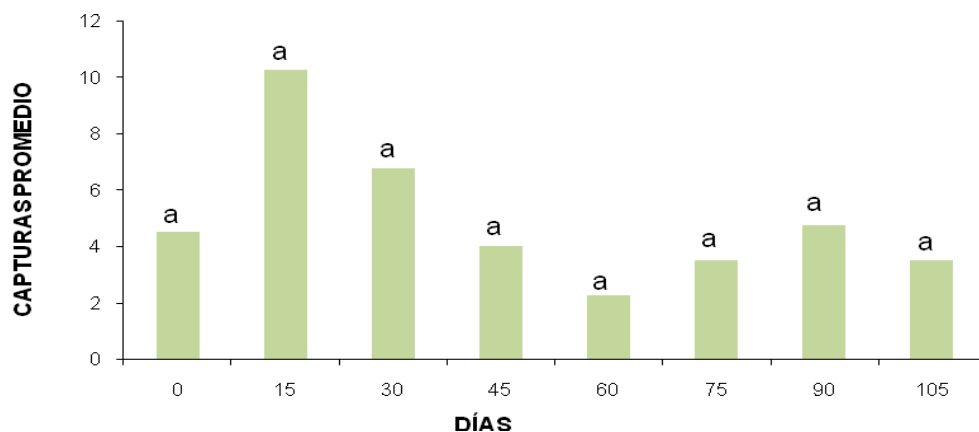
Gráfica 7. Capturas promedio de *Tuta absoluta* vs días de degradación en invernáculo (Hexano 0,1 mg). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas, test de Tukey post ANOVA ($\alpha=0.05$).

Tratamiento: HEXANO 0,2 mg



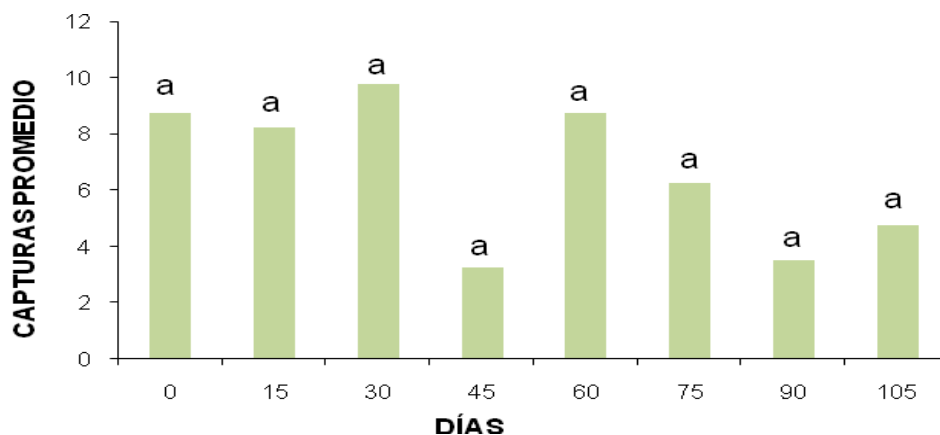
Gráfica 8. Capturas promedio de *Tuta absoluta* vs días de degradación en invernáculo (Hexano 0,2 mg). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas, test de Tukey post ANOVA ($\alpha=0.05$).

Tratamiento: DICLOROMETANO 0,1 mg



Gráfica 9. Capturas promedio de *Tuta absoluta* vs días de degradación en invernáculo. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas, test de Tukey post ANOVA ($\alpha=0.05$).

Tratamiento: DICLOROMETANO 0,2 mg



Gráfica 10. Capturas promedio de *Tuta absoluta* vs días de degradación en invernáculo. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas, test de Tukey post ANOVA ($\alpha=0.05$).

Al realizar el análisis estadístico de los datos, se observa que no existe diferencia significativa ($\alpha= 0,05$) de las capturas promedio al cabo de los 105 días para ninguno

de los tratamientos. De acuerdo a este resultado, los septos con feromona serían efectivos en invernáculos durante al menos tres meses.

Es importante tener en cuenta que los experimentos de capturas en invernáculo, se realizaron en invierno, época en que la población de *tuta absoluta* se ve disminuida. Es por esto que las capturas fueron muy bajas; la mayor captura por trampa fue de 13 insectos, mientras que en los meses de primavera las capturas por trampa llegan a ser superiores a 400 insectos.

Se realizó un análisis multifactorial de tres factores (concentración, solvente, tiempo), mediante el cual no se obtuvo diferencia significativa entre los dos solventes, ni entre las dos concentraciones, al realizar un test de student post ANOVA ($\alpha=0.05$).

Dado que no se observó diferencia significativa de capturas entre ambas concentraciones, se aconseja el uso de la menor concentración ya que implica utilizar menor cantidad de producto por invernáculo.

3.4- Identificación de compuestos de degradación de la feromona

Al comparar los espectros correspondientes a los tratamientos diclorometano 0,2 mg a tiempo 0 y 105, no se observaron mayores diferencias en los perfiles cromatográficos. Sin embargo, se detectó una señal a tiempo de retención 4.68, únicamente a tiempo 105 días. Esta misma señal se detectó en el espectro correspondiente al tratamiento hexano 0,2 mg a tiempo 105 días, no a tiempo 0; por lo que la misma podría corresponder a un compuesto de degradación de la feromona. Este compuesto, en concentración similar a la del compuesto minoritario de la feromona, posiblemente corresponda a un compuesto policíclico de peso molecular 218, proveniente de una reacción intramolecular entre el grupo carboxilo del acetato y el doble enlace de la cadena.

3.5- Análisis de la dinámica de emisión de la feromona

Al analizar los cromatogramas correspondientes al experimento en el que se colectaron los volátiles durante 24 horas, no se logró cuantificar la cantidad de feromona, dado que las señales son demasiado pequeñas (prácticamente no se distinguen de la línea de base) y además el componente mayoritario se superpone con otro compuesto. Posteriormente se realizó el mismo experimento pero aumentando el tiempo de colecta a 48 horas. En este caso tampoco fue posible la cuantificación por los mismos motivos (Fig. 1). Es posible que la baja cantidad de feromona detectada, se deba a una lenta liberación de la misma desde el septo.

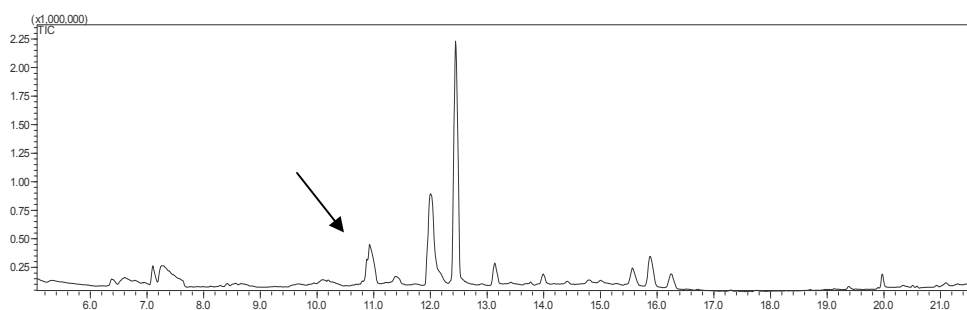


Figura 1. Cromatograma TIC (Total Ion Current) correspondiente a la colecta de volátiles de un septo con 0.2 mg de feromona en diclorometano.

4- CONCLUSIONES

Se observa para todos los tratamientos que las capturas no se ven afectadas, aunque la cantidad de feromona remanente en los septos disminuya significativamente al cabo de los 105 días. Esto nos indica que cualquiera sea el tratamiento, la feromona es efectiva por más de tres meses. No existen diferencias significativas para los solventes hexano y diclorometano en captura, aunque el uso de éste último como solvente de formulación, da una cantidad remanente de feromona en los septos es significativamente mayor.

En cuanto a la cantidad inicial de feromona en los septos, es importante observar que, dado que no existe diferencia significativa entre las capturas obtenidas con ambas cantidades (0,1 y 0,2 mg), se recomienda el uso de la menor concentración, 0,1 mg/septo, ya que implica usar menor cantidad de feromona por invernáculo y por lo tanto reducción de costos.

Es posible que la disminución de la cantidad de feromona en los septos se deba a dos efectos principales, la liberación o volatilización y la degradación. Se detectó la presencia de un posible compuesto de degradación, policíclico de peso molecular 218, en concentración semejante aproximadamente al compuesto minoritario de la feromona. Es posible que existan otros productos de degradación y que sean compuestos volátiles que se liberen al ambiente o que estén en baja concentración y por lo tanto no sea posible su detección mediante el método de extracción y análisis utilizado.

En cuanto a la dinámica de liberación estudiada en condiciones de laboratorio, en el sistema de colecta de volátiles, se podría concluir que la baja concentración detectada (no cuantificable), pese a la gran sensibilidad del análisis de espectrometría de masas, se deba a la lenta liberación de la feromona desde el septo, lo que está de acuerdo con el hecho de que los septos son efectivos en condiciones de invernáculo por más de tres meses.

5- BIBLIOGRAFÍA

1. Bentancourt, C.M. and I.B. Scatoni, *Lepidópteros de importancia económica en Uruguay. Reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales*. Segunda Edición ed. 2006, Montevideo: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L
2. Núñez, P., et al., *Feromonas sexuales para el control de la polilla del tomate Tuta absoluta (Meyrick) (Lep., Gelechiidae)*. Agrociencia, 2009. **XIII**(1): p. 29-37.
3. Benvenga, S.R., O.A. Fernandes, and S. Gravena, *Decision making for integrated pest management of the South American tomato pinworm based on sexual pheromone traps*. Horticultura Brasileira, 2007. **25**(2): p. 164-169.
4. Michereff, M., et al., *Field trapping of tomato moth, Tuta absoluta with pheromone traps*. Journal of Chemical Ecology, 2000. **26**(4): p. 875-881.
5. Howse, P., I. Stevens, and O. Jones, *Insect Pheromones and their Use in Pest Management*, ed. C.a. Hall. 1998.
6. Svatos, A., et al., *Sex pheromone of tomato pest Scrobipalpuloides absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae)*. Journal of Chemical Ecology, 1996. **22**: p. 787-800.

PERMANENCIA DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, AGENTE CAUSAL DEL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE EN SUELO Y RASTROJO.

Responsable: Diego Maeso.

Colaboradores: Wilma Walasek, Alfredo Fernández.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como “cancro bacteriano del tomate” causada por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) es uno de los problemas sanitarios más importantes del cultivo tanto a campo como en invernadero. El control de este problema es sumamente difícil ya que combina dos características importantes: la capacidad de supervivencia del patógeno en semillas, restos del cultivo, suelo, materiales inertes (rafias, cañas, herramientas, etc.) y la facilidad de diseminación ya sea a través de agua o heridas (desbrote, deshoje, riegos, etc.). Desde hace algunas temporadas en INIA LB hemos comenzado trabajos experimentales acerca de la epidemiología de esta enfermedad en nuestras condiciones de forma de obtener información que pueda ser utilizada en su manejo integrado. De esa forma, se confirmó su capacidad de transmisión por semilla y la eficiencia de algunos métodos de desinfección de ésta, se confirmó la importancia del agua en la transmisión vía raíces, la relativa efectividad de algunos productos desinfectantes, y la capacidad de sobrevivir entre cultivos (aún por más de dos años). Con este mismo objetivo se realizó el presente experimento para estimar la potencialidad del suelo tomado de cultivos atacados y restos de plantas afectadas como fuente de inóculo de Cmm.

MATERIALES Y MÉTODOS

En febrero 2009 se prepararon los elementos a usar como fuente de inóculo. Se colectó suelo en la base de plantas afectadas con cancro bacteriano (diagnóstico confirmado por serología) y sectores de tallos de las mismas. Se guardó la mitad del suelo en bolsa de plastillera en laboratorio y el resto se distribuyó en almácigas las cuales fueron conservadas en condiciones de campo con el agregado de una porción de tallo afectado de 5 cm. de longitud. Porciones de tallo similares se colocaron en sobres de tela malla, también en condiciones de campo. Estos elementos serán usados en experimentos semestrales para determinar la permanencia de Cmm en los mismos.

El 18/2/2010 (a un año de la recolección de las fuentes de inóculo) se sembró el primer experimento de la serie con cuatro tratamientos:

- 1) suelo de un cuadro sin antecedentes de la enfermedad, esterilizado (autoclavado 120° C por 20 minutos),
- 2) al suelo usado en 1) se agregaron 20 g del suelo extraído en el cultivo enfermo (el equivalente a una celda de almáciga),
- 3) ídem a 1) pero con el agregado del suelo y la porción de tallo almacenados a campo y
- 4) ídem a 1) con el agregado de una porción de tallo enfermo conservado a campo.

Cada tratamiento constó de cuarenta macetas plásticas (12 cm. de diámetro, 1000 cc de capacidad) las cuales fueron mantenidas en invernadero de vidrio. Se utilizó semilla del cultivar Loica desinfectada con agua caliente.

Se realizaron dos evaluaciones externas de síntomas (63 y 83 días después de la siembra, dps) y una de estado del sistema vascular (cortándolo longitudinalmente) el 31/5 (102 dps).

A partir de los 70 dps se realizaron aislamientos en agar nutriente de todas las plantas (70, 82, 95 y 104 dps). Se conservaron las bacterias obtenidas, a las cuales se les realizó la reacción de gram mediante el método de KOH (Cmm es la única bacteria que afecta tomate gram positiva) y la reacción de hipersensibilidad en *Mirabilis jalapa*. Finalmente todas las plantas fueron analizadas mediante la prueba DAS-ELISA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se observan los resultados del experimento. Se encontraron diferencias en cuanto a los resultados obtenidos en las distintas evaluaciones, por lo que los porcentajes de “probable” infección con Cmm deben analizarse por separado. Las posibles razones de esta falta de concordancia pueden ser debidas a limitaciones técnicas o discrepancia entre lo evaluado en cada oportunidad. En ese sentido, por serología se pueden obtener reacciones positivas con cepas de Cmm no patógenas o con patogenicidad disminuida. Mediante el cultivo en laboratorio se pueden aislar bacterias que finalmente no sean Cmm o que, siendo Cmm, no produzcan lesiones vasculares, o lo inverso, debido a problemas de muestreo o de metodología no haberse podido aislar Cmm presentes en la muestra. Por lo tanto, los resultados deben tomarse como orientación, en conjunto y su importancia radica en marcar diferencias acerca de la importancia relativa de las diferentes fuentes de inóculo y la posibilidad de Cmm de permanecer en las mismas.

Cuadro 1. Permanencia de Cmm en suelo y trozos de tallo. Porcentaje de plantas con resultados atribuibles a Cmm según los análisis practicados.

Tratamiento ¹	Con síntomas			Con bacterias aisladas ² (70-104 dps)	Reacción de Gram Positiva (KOH)	HR en <i>M. jalapa</i>	DAS ELISA
	En cultivo		En corte longitudinal de tallo				
	22/4 (63 dps)	11/5 (83 dps)	31/5 (102 dps)				
1. Suelo estéril	2.5	2.5	0	0	0	0	0
2. Suelo “enfermo”	60	40	25	22.5	7.5	5	10
3. Suelo “enfermo” + porción de tallo “enfermo”	60	67.5	22.5	22.5	7.5	7.5	5
4. Porción de tallo “enfermo”	45	52.5	17.5	25	5	5	5

¹ Los tratamientos consistieron en agregados a una base de suelo esterilizado por autoclave

² Plantas de las que se aislaron colonias similares a Cmm (por apariencia).

COMENTARIOS

- Cmm permaneció viable tanto en suelo como en restos de cultivo por un año. El experimento será repetido semestralmente para determinar hasta cuándo se mantiene el patógeno en estas fuentes.
- No existieron grandes diferencias entre la capacidad del suelo o de los restos como fuente de inóculo logrando generar perjuicio al sistema vascular en 17-25% de las repeticiones.
- Este trabajo confirma la capacidad de permanencia de Cmm por estas vías entre dos temporadas, lo cual junto a la semilla y el agua son aspectos muy importantes a considerar en el manejo de la enfermedad.

PERMANENCIA DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, AGENTE CAUSAL DEL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE EN ELEMENTOS DE ENTUTORADO.

Responsable: Diego Maeso.
Colaboradores: Wilma Walasek.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como “cancro bacteriano del tomate” causada por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) es uno de los problemas sanitarios más importantes del cultivo tanto a campo como en invernadero. El control de este problema es sumamente difícil ya que combina dos características importantes: la capacidad de supervivencia del patógeno en semillas, restos del cultivo, suelo, materiales inertes (rafias, cañas, herramientas, etc.) y la facilidad de diseminación ya sea a través de agua o heridas (desbrote, deshoje, riegos, etc.). Desde hace algunas temporadas en INIA LB hemos comenzado trabajos experimentales acerca de la epidemiología de esta enfermedad en nuestras condiciones de forma de obtener información que pueda ser utilizada en su manejo integrado. De esa forma se confirmó su capacidad de transmisión por semilla y la eficiencia de algunos métodos de desinfección de ésta, se confirmó la importancia del agua en la transmisión vía raíces, la relativa efectividad de algunos productos desinfectantes, y la capacidad de sobrevivir entre cultivos (aún por más de dos años). Con este mismo objetivo se realizó el presente experimento para estimar la potencialidad de algunos de los elementos usados como tutores como reservorio de Cmm.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se sumergieron durante un período de dos horas 500 trozos estériles de 2 x 0,5 cm de caña castilla y 500 de 2 cm de rafia en una solución de 2×10^8 UFC/ml de Cmm (aislamiento LB 17). Los trozos fueron secados en cámara de flujo laminar en papel de filtro estéril y conservados en placas por los diferentes períodos a estudiar: 0, 1, 7, 14, 30, 60, 90, 180, 240 y 365 días post inoculación (dpi). En cada período, cincuenta trozos de caña y rafia fueron sembrados en placas de agar nutriente (cinco trozos por placa, 10 repeticiones). A las 48 horas de sembrados se evaluó el número de trozos que desarrollaban colonias de Cmm y el crecimiento bacteriano de cada placa se recogió en 7 ml de buffer salino. La absorbancia de esa solución de bacterias en buffer salino fue medida en espectrofotómetro a 590 nm de forma de obtener una estimación de la magnitud del desarrollo bacteriano obtenido en las diferentes fechas. El experimento fue comenzado el 13/7/2009 y finalizó 13/7/2010 (al año de la inoculación).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se muestran los resultados del experimento. Cmm pudo permanecer viable en los trozos de rafia por lo menos por un año luego de inoculada mientras que en los de caña no alcanzó a los 7 días. En la gráfica 1 se observa como disminuye el potencial de inóculo con el tiempo, sin embargo dado que se trata de una bacteria con

gran capacidad de reproducción aún niveles bajos pueden servir para desencadenar graves ataques. De acuerdo a la información obtenida deberá prestarse especial atención a los restos de rafia usada en un cultivo con esta enfermedad ya que constituye un vehículo seguro para mantener la bacteria de una temporada a la otra. En principio no es recomendable reutilizar rafia y se debería evitar que los restos utilizados en cultivos anteriores entren en contacto con nuevas plantaciones.

Cuadro 1. Permanencia de Cmm en trozos de rafia y caña.

Tiempo pos-inoculación (p.i.)	Trozos de caña		Trozos de rafia	
	% de trozos con Cmm	Absorbancia 590 nm (en 7 ml PBS)	% de trozos con Cmm	Absorbancia 590 nm (en 7 ml PBS)
T ₀ 0 horas p.i.	88	0.9	100	1.55
T ₁ 24 horas p.i.	72	0.4	100	1.80
T ₂ 7 días p.i.	0	0	100	1.80
T ₃ 14 días p.i.	0	0	100	1.80
T ₄ 30 días p.i.	0	0	100	1.40
T ₅ 60 días p.i.	0	0	100	0.70
T ₆ 90 días p.i.	0	0	100	---
T ₇ 180 días p.i.	0	0	100	0.36
T ₈ 240 días p.i.	0	0	100	---
T ₉ 365 días p.i.	0	0	60	0.2

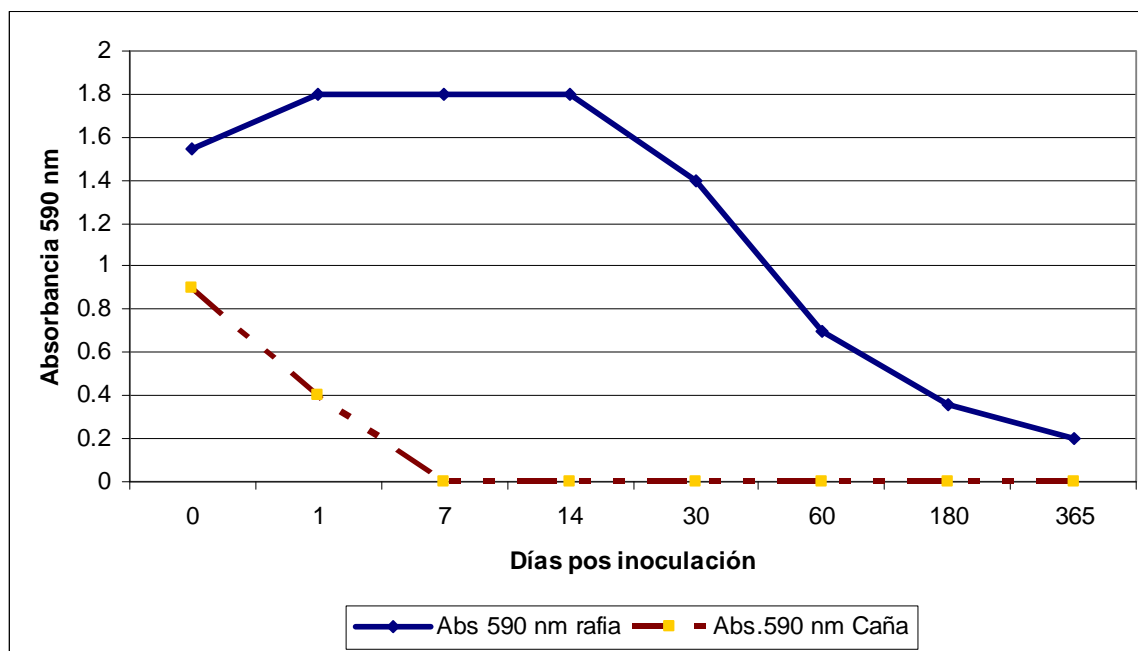


Figura 1. Absorbancia 590 (relacionada con la supervivencia de bacterias en cada uno de los sustratos) obtenida al cultivar trozos de caña y rafia a los diferentes días luego de la inoculación.

USO DE DESINFECTANTES PARA EL CONTROL DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN AGUA DE RIEGO.

Responsables: Diego Maeso, Wilma Walasek y Alfredo Fernández.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como “cancro bacteriano del tomate” es causada por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) y es uno de los problemas sanitarios más importantes del cultivo tanto a campo como en invernadero. El control de este problema es sumamente difícil ya que combina dos características importantes: la capacidad de supervivencia del patógeno en semillas, restos del cultivo, suelo, materiales inertes (rafias, cañas, herramientas, etc.) y la facilidad de diseminación ya sea a través de agua o heridas (desbrote, deshoje, riegos, etc.). Desde hace algunas temporadas en INIA LB hemos comenzado trabajos experimentales acerca de la epidemiología de esta enfermedad en nuestras condiciones de forma de obtener información que pueda ser utilizada en su manejo integrado. De esa forma se confirmó la capacidad de transmisión por semilla y la eficiencia de algunos métodos de desinfección de la misma, la capacidad de sobrevivir entre cultivos (aún por más de dos años) y la importancia del agua en la transmisión vía raíces. Buscando limitar esa capacidad de transmisión se realizaron experimentos a campo en los que se comparó la efectividad de algunos productos desinfectantes sin llegarse a resultados concretos. Es por ello que se comenzaron trabajos de investigación para realizar esa evaluación en condiciones más controladas disminuyendo la influencia de agentes externos.

I. EXPERIMENTOS EN INVERNADERO EN MACETA

Temporada: 2009.

Localización: Invernadero de INIA Las Brujas.

Variación: Los experimentos se realizaron con semilla del cultivar Loica la cual fue desinfectada previamente en baño a 50°C por 25 minutos.

Enfermedad: Cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Cmm).

METODOLOGÍA:

La semilla se plantó en macetas (12 cm de diámetro, 1000 cc capacidad). El trabajo se realizó hasta el momento en dos oportunidades por limitación de espacio (4/09/09 y 5/11/09) y se piensa continuar repitiéndolo hasta alcanzar un número representativo de plantas.

En cada experimento se formaron dos grupos de 12 plantas, uno en un nivel superior en el cual se realizaban los tratamientos y otro en un nivel inferior que recogía el agua de riego del nivel superior. Todos los riegos fueron realizados de forma que las plantas del nivel inferior recibieran un nivel adecuado de irrigación. Las plantas fueron cultivadas en sustrato esterilizado en autoclave (120°C 20 minutos). En los tratamientos 2 a 5 la planta superior fue inoculada mediante punción con palillo de dientes en la axila de una hoja madura a través de una solución bacteriana (1×10^8 UFC/ml).

Los tratamientos comparados fueron:

1. Testigo sin inocular.
2. Testigo inoculado.
3. Riego con solución de yodo jabonosa (1 cc/l de agua de riego) (Perrin SA. Cno. Mendoza 7052).
4. Riego con permanganato de potasio (0.06 g/l de agua de riego).
5. Riego con sulfato de cobre (0.1 g/l de agua de riego). (Fanaproqui).

La concentración de los productos se calculó en base a lo utilizado en los experimentos de campo previos. La dosis por superficie fue llevada a dosis por planta y disuelta en el volumen utilizado en los ensayos de campo en cada riego (dos litros). Esa fue la concentración usada en el riego de las macetas macetas.

Al finalizar cada experimento los tallos de todas las plantas fueron cortados longitudinalmente para observar lesiones en el sistema vascular y analizados por serología mediante DAS ELISA (7/10 y 23/12/2009). Los resultados se muestran en los cuadros 1, 2 y 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Cuadro 1. Porcentaje de plantas con lesiones en el sistema vascular.

Tratamiento	Primer Experimento (4/9/09)		Segundo Experimento (5/11/09)	
	Plantas superiores (inoculadas)	Plantas inferiores	Plantas superiores (inoculadas)	Plantas inferiores
1. Testigo sin inocular.	0	0	0	0
2. Testigo inoculado.	100	83	100	92
3. Riego con solución de yodo jabonosa (1 cc/l).	100	75	100	58
4. Riego con permanganato de potasio (0.06 g/l).	100	92	100	67
5. Riego con sulfato de cobre (0.1 g/l).	100	58	100	67

Cuadro 2. Porcentaje de plantas con reacción positiva en la prueba DAS-ELISA para Cmm.

Tratamiento	Primer Experimento (4/9/09)		Segundo Experimento (5/11/09)	
	Plantas superiores (inoculadas)	Plantas inferiores	Plantas superiores (inoculadas)	Plantas inferiores
1. Testigo sin inocular.	0	0	0	0
2. Testigo inoculado.	100	58	100	100
3. Riego con solución de yodo jabonosa (1 cc/l).	100	75	100	83
4. Riego con permanganato de potasio (0.06 g/l).	100	75	100	75
5. Riego con sulfato de cobre (0.1 g/l).	83	91	91	92

Cuadro 3. Promedio de valores de Absorbancia 405 nm obtenidos en prueba ELISA de todas las plantas superiores e inferiores.

Tratamiento	Primer Experimento (4/9/09)		Segundo Experimento (5/11/09)	
	Plantas superiores	Plantas inferiores	Plantas superiores	Plantas inferiores
1. Testigo sin inocular.	0.085	0.078	0.075	0.068
2. Testigo inoculado.	0.641	0.213	1.328	0.385
3. Riego con solución de yodo jabonosa (1 cc/l).	0.611	0.198	1.281	0.307
4. Riego con permanganato de potasio (0.06 g/l).	0.590	0.206	1.221	0.230
5. Riego con sulfato de cobre (0.1 g/l).	0.541	0.311	1.001	0.339

De acuerdo a estos resultados se puede establecer que:

- Las sustancias empleadas no tuvieron ningún efecto sobre las plantas ya infectadas ya que todas las plantas superiores exhibieron daños en su sistema vascular.
- En cuanto a la presencia de la enfermedad o detección de su agente en las plantas inferiores (potencialmente infectadas vía riego), se observó algún efecto preventivo de los productos aplicados a la transmisión.
- Si bien se encontraron algunas diferencias entre los resultados de ambos experimentos, los tres desinfectantes evaluados redujeron el número de plantas inferiores afectadas frente al testigo sin tratar, sobre todo en el segundo experimento. Destacándose el tratamiento con sulfato de cobre por la repetitibilidad de su efecto.
- En cuanto a los resultados de detección de Cmm en las plantas inferiores, se encontraron diferencias entre éstos y la presencia de síntomas en el sistema vascular. Lo esperado era que, dada la sensibilidad de la técnica, se detectaran plantas infectadas antes de expresión de síntomas por su baja concentración o por su poca patogenicidad. Sin embargo, se registraron casos en que no se detectó a Cmm serológicamente en plantas con síntomas lo cual estaría marcando una limitación de la técnica serológica para la detección en planta.

- Sin embargo, la técnica serológica mostró diferencias en la concentración del patógeno en los tejidos: los valores de absorbancia obtenidos en las plantas inferiores siempre fueron sensiblemente menores a los exhibidos por las plantas inoculadas (cuadro 3). Esto podría indicar la diferente capacidad de ambos métodos de inoculación (herida y riego) en el posterior desarrollo de la enfermedad.
- Este trabajo se repetirá en la próxima temporada de forma de aumentar el número de repeticiones.

II. EXPERIMENTOS *IN VITRO*.

Para complementar los trabajos en campo e invernadero se estudió el efecto de los desinfectantes sobre la bacteria *in vitro*.

METODOLOGÍA:

Se prepararon alícuotas de 500 ml de una solución de Cmm con una concentración 1×10^8 UFC/ml en buffer salino. A esas soluciones se les agregaron los diferentes tratamientos a evaluar: testigo, sulfato de cobre, permanganato de potasio y solución de yodo jabonosa de forma de llegar a una concentración final de los desinfectantes igual a la empleada en los riegos de los experimentos de maceta y campo.

Se dejó interactuar la bacteria con los tratamientos y luego se realizaron plaqueos en medio agar nutriente. Para ese plaqueo se realizaron diez diluciones sucesivas de uno en diez, de las cuales se distribuyó 0,1 ml por placa. Se hicieron dos repeticiones por dilución.

Las placas fueron incubadas 48 hs. a 23°C y se contó el número de bacterias. Para calcular el número de bacterias por mililitro de cada una de las soluciones se usó el promedio de las dos repeticiones y lo estimado por cada dilución. El número de bacterias observado fue multiplicado por 10 y por la relación de cada dilución.

Se efectuó un experimento con todos los tratamientos a la vez (29/1/2010) y tres en los que se incluía un tratamiento y el testigo sin desinfectante (12/3, 14/4 y 3/9/2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos referidos a porcentaje de control sobre el testigo $[(n^{\circ} \text{ de colonias en el testigo} - n^{\circ} \text{ de colonias en solución desinfectante}) / (n^{\circ} \text{ de colonias en el testigo})]$.

Cuadro 1. Porcentaje de control respecto al testigo obtenido al incubar Cmm en soluciones de desinfectantes.

Tratamiento	Concentración producto	Exp. 1 29/1/2010		Exp. fraccionado (varias fechas)	
		% de control frente al testigo	Concentración de bacterias (UFC/ml) ¹	% de control frente al testigo	Concentración de bacterias (UFC/ml) ¹
Sulfato de cobre	0.10 g/l	99.99	5.5×10^1	99	3.5×10^4
Permanganato de potasio	0.06 g/l	99.99	1.0×10^1	100	0
Solución de yodo	1 cc/l	99.99	2.2×10^2	94	4.9×10^3
Testigo sin tratar	0	0	8.5×10^7	0	3.7×10^6 (14/4, vs. permanganato) 8.7×10^4 (3/9, vs. sol. de yodo) 1.3×10^7 (12/3, vs. sulfato de cobre)

¹UFC/ml = unidades formadoras de colonias por mililitro.

- Estos experimentos serán repetidos para confirmar la información
- Se observó un control superior al 94% de las bacterias en solución.
- Sin embargo un 1% de falta de control puede significar niveles de 35000 o 4900 UFC/ml, los cuales, tratándose de una bacteria, rápidamente aumentarán exponencialmente.
- La disminución de los niveles iniciales de inóculo pueden resultar en un enlentecimiento del desarrollo de la enfermedad tal como se observó en el ensayo en macetas (menor expresión de síntomas).

INFLUENCIA DE LOS RÉGIMENES DE RIEGO EN EL DESARROLLO DE EPIDEMIAS DE CANCRO BACTERIANO EN TOMATE

Responsables: Diego Maeso, Jorge Arboleya y Claudio García.

Colaboradores: Alfredo Fernández y Wilma Walasek.

INTRODUCCIÓN

Durante trabajos realizados en temporadas anteriores se confirmó que el agua de riego es uno de los mecanismos más eficientes de contagio de cancro bacteriano entre plantas de tomate y se estudiaron diferentes productos para prevenir la diseminación a través de ese mecanismo. Observaciones de campo por parte de colegas y productores indican que en el desarrollo de grandes ataques de la enfermedad influye la realización de riegos con abundantes niveles de agua y que el manejo prudente del agua retarda y disminuye la evolución de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue el de verificar esa observación y a la vez tratar de estandarizarla en condiciones experimentales tanto a campo como bajo cubierta plástica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización: Campo experimental, INIA Las Brujas.

Fecha de trasplante: 12/1/10.

Distancia de plantación: 1,50 x 0,50 m.

Diseño experimental: Parcelas divididas en bloques al azar con cuatro repeticiones. La parcela principal fue existencia o no de plantas inoculadas con la enfermedad en la cabecera de la línea de riego de cada surco.

Las subparcelas fueron formadas por tres niveles de riego y constaban de dos surcos de ocho plantas cada uno (cuatro metros de largo).

Varietal: Michel (semilla desinfectada con agua caliente). Tomate de mercado entutorado.

Enfermedad: Cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), Cmm.

TRATAMIENTOS

El trabajo constó de dos experimentos, uno bajo cubierta plástica y otro idéntico a campo.

El cultivo bajo cubierta se realizó en cuatro macro túneles de 10 de largo x 3.6 m ancho en los que se cultivaban en seis surcos. Los mismos fueron divididos de forma que en cada macro túnel (considerado como una repetición) se colocaban seis parcelas experimentales. El experimento a campo fue una réplica del realizado bajo cubierta y colocado contiguo a éste.

El diseño experimental fue de parcelas divididas siendo la parcela principal la existencia o no de plantas inoculadas con la enfermedad en la cabecera de la línea de riego de cada surco.

Las subparcelas eran formadas por tres niveles de riego: “adecuado”, 50% y 150% de lo definido como “adecuado”.

El régimen de riego “adecuado” fue calculado en base a la evapotranspiración diaria estimada usando la ecuación de Penman y Monteih y a las características del sistema de riego utilizado en el experimento. Los sistemas de riego de cada tratamiento funcionaron independientemente, existiendo una distancia entre parcelas de un metro.

En cada cabecera de riego de las parcelas pertenecientes a los tratamientos inoculados se trasplantó una planta de tomate (cultivar Loica) inoculada con Cmm. La inoculación se realizó en laboratorio mediante la punción con un palillo de dientes en la axila de una hoja totalmente expandida a través de una gota de solución bacteriana (1×10^8 UFC/ml). Las plantas se mantuvieron a 30°C y 100% humedad por 48 horas, previo a su trasplante (28/1/2010).

EVALUACIONES

De seguimiento sanitario: Entre el 22/2-05/5/2010 se registró semanalmente el número de plantas afectadas por fila, totalizando diez evaluaciones. A cada planta se le asignaron grados según la severidad de la enfermedad usando la siguiente escala: 0 = sin síntomas, 1= una o dos hojas comenzando a marchitar, 2= algunas hojas marchitas y comienzo de secado de las mismas, 3= algunas hojas secas, planta en su mayor parte marchita, 4= planta marchita casi muerta y 5 = planta muerta. Al fin de la estación (12/5/2010) se evaluó el estado del sistema vascular de los tallos de todas las plantas cortándolos longitudinalmente desde el cuello. El deterioro vascular fue separado según si se registraba a nivel cercano al suelo o en planos superiores.

De rendimientos: Se pesaron los frutos de tomate obtenidos en cada cosecha.

De temperatura de suelo: Se coloraron registradores de temperatura de suelo en parcelas de los tres regímenes de riego a campo y protegido.

RESULTADOS:

Comienzo de la enfermedad:

Los primeros síntomas de la enfermedad se observaron el 4/2/2010 en las plantas inoculadas y a mediados de febrero en el resto de las parcelas.

A. EXPERIMENTO A CAMPO:

Evolución del número de plantas enfermas (incidencia).

En la figura 1 se muestra la evolución del porcentaje de plantas enfermas con cancro bacteriano (incidencia) en la temporada 2010 de los tres regímenes de riego.

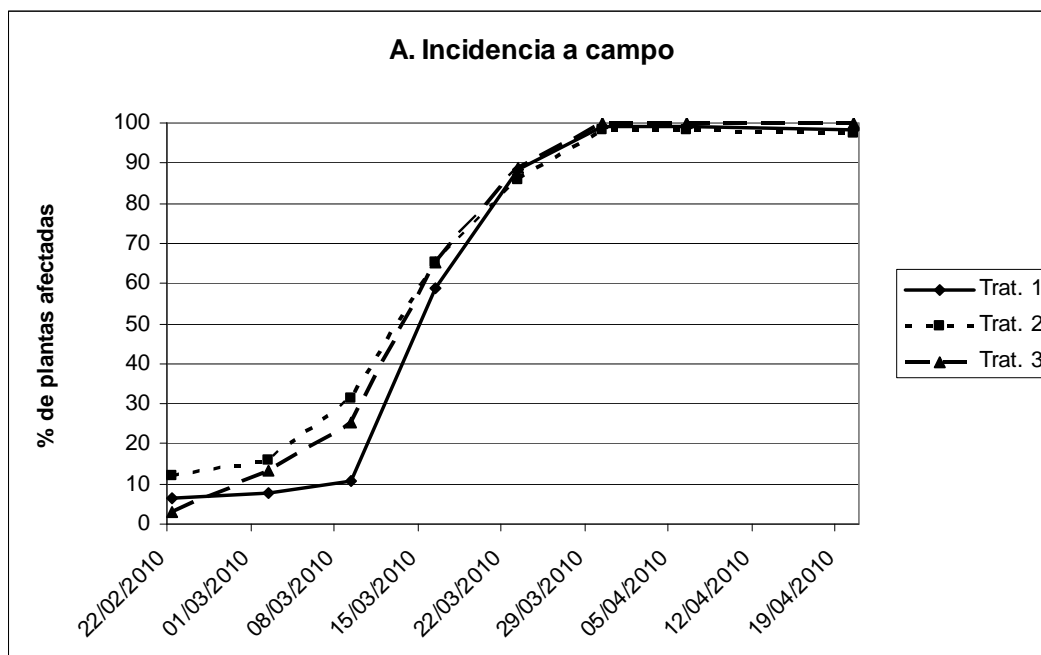


Figura 1. Evolución del porcentaje de plantas enfermas con cancro bacteriano (incidencia) en los tres regimenes de riego. A. Experimento a campo.

En la figura 2 se muestran los resultados de las evaluaciones de severidad

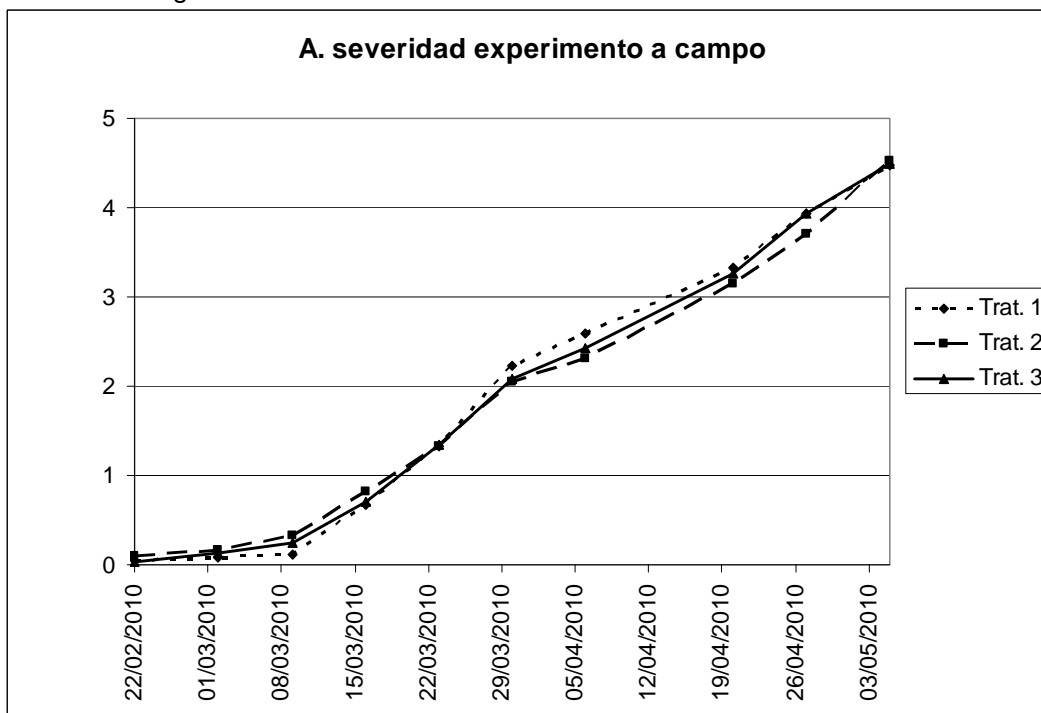


Figura 2. Evolución de la severidad (escala 0-5) de plantas enfermas con cancro bacteriano en los tres regimenes de riego. A. Experimento a campo.

El las figuras 3 y 4 aparecen los resultados de las evaluaciones de incidencia y severidad en las parcelas con y sin inoculación.

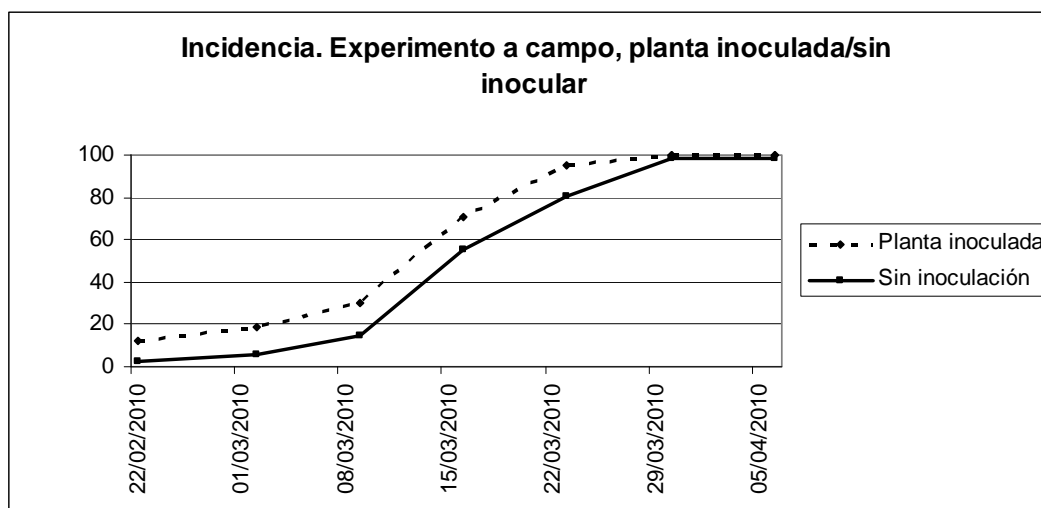


Figura 3. Evolución de la incidencia en parcelas con y sin inoculación.

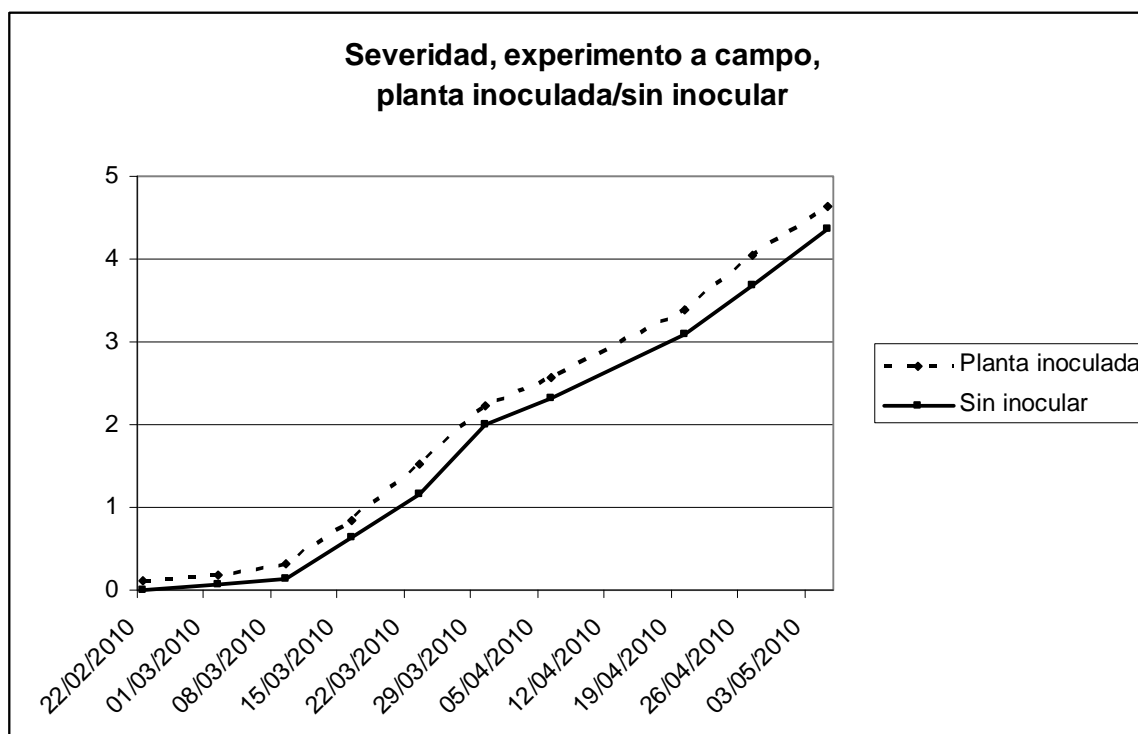


Figura 4. Evolución de la severidad en parcelas con y sin inoculación de la planta de la cabecera de riego.

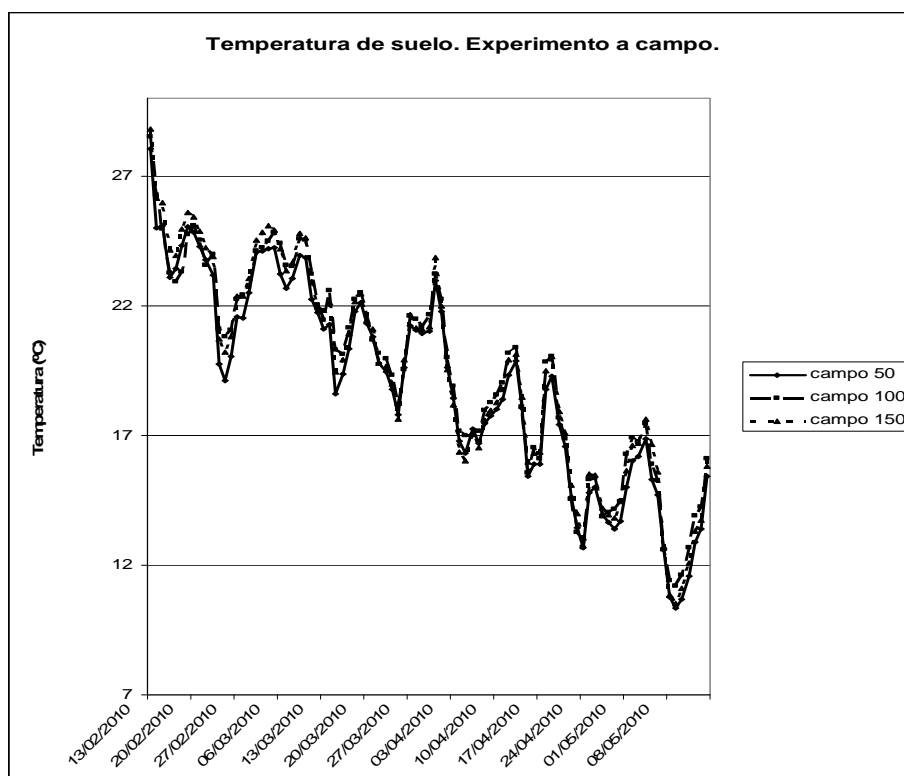


Figura 5. Temperatura de suelo diaria tomada en el experimento a campo.

En el cuadro 1 se muestran los resultados en valores numéricos de aquellas evaluaciones con diferencias estadísticamente significativas en el **experimento a campo**.

Tratamiento	Incidencia (%) 9/3	Severidad		% Plantas con lesiones en vasos 5/5
		9/3	24/4	
Subparcela				
50% riego	11 a	0.13 a	3.32	64 a
100% riego	31 b	0.24 ab	3.14	73 ab
150% riego	25 ab	0.34 b	3.26	81 b
Parcela principal				
Planta inoculada	31 b	0.33 b	3.39	75 NS
Sin inocular	14 a	0.14 a	3.10	70 NS

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los rendimientos obtenidos en los tratamientos ni entre parcela inoculada y sin inocular.

En la figura 6 se muestra la evolución de los rendimientos acumulados (kg/parcela).

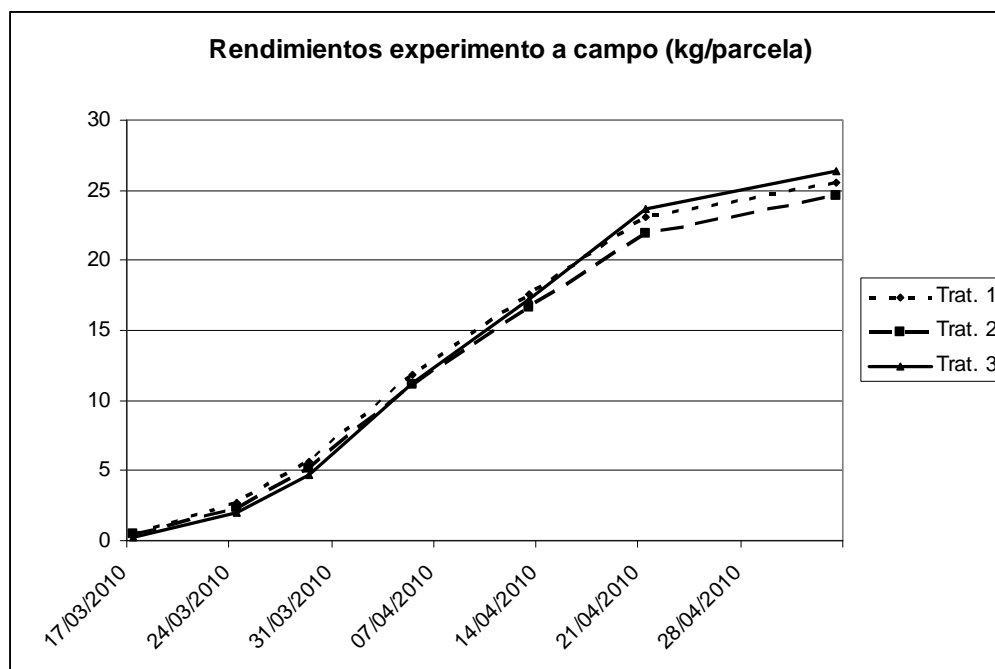


Figura 6. Rendimientos en kg/parcela obtenidos en cada tratamiento.

B. EXPERIMENTO BAJO CUBIERTA:

Evolución del número de plantas enfermas (incidencia).

En la figura 7 se muestra la evolución del porcentaje de plantas enfermas con cancro bacteriano (incidencia) en la temporada 2010 de los tres regimenes de riego en el experimento bajo cubierta.

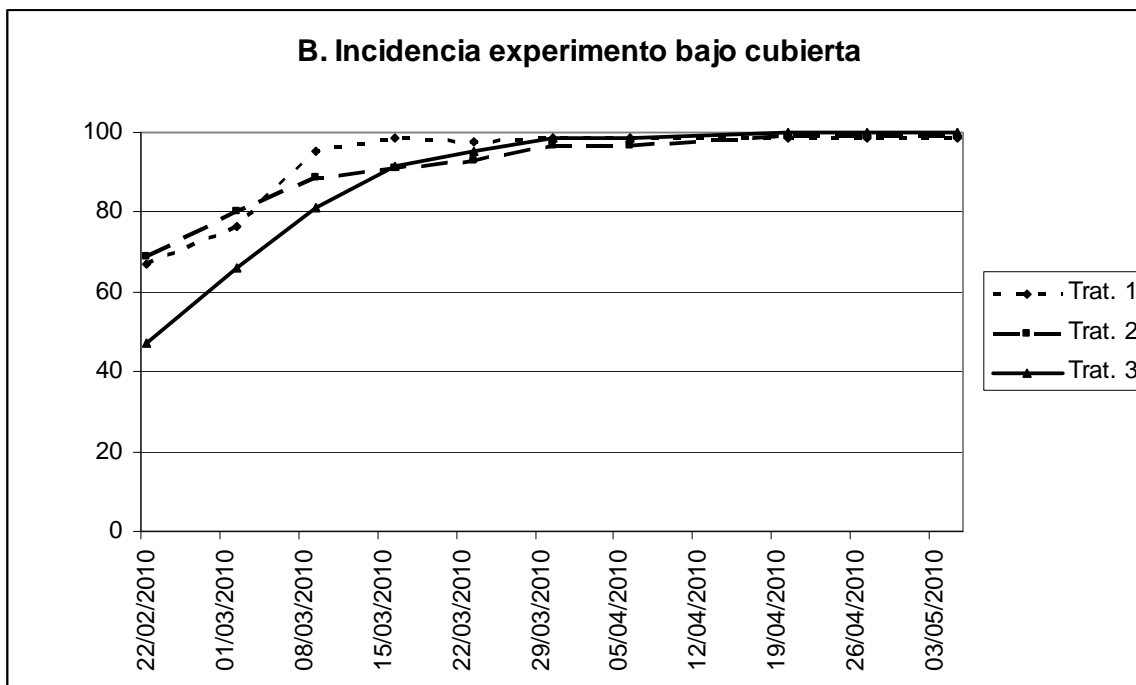


Figura 7. Evolución del porcentaje de plantas enfermas con cancro bacteriano (incidencia) en los tres regimenes de riego. B. Experimento bajo cubierta.

En la figura 8 se muestran los resultados de las evaluaciones de severidad

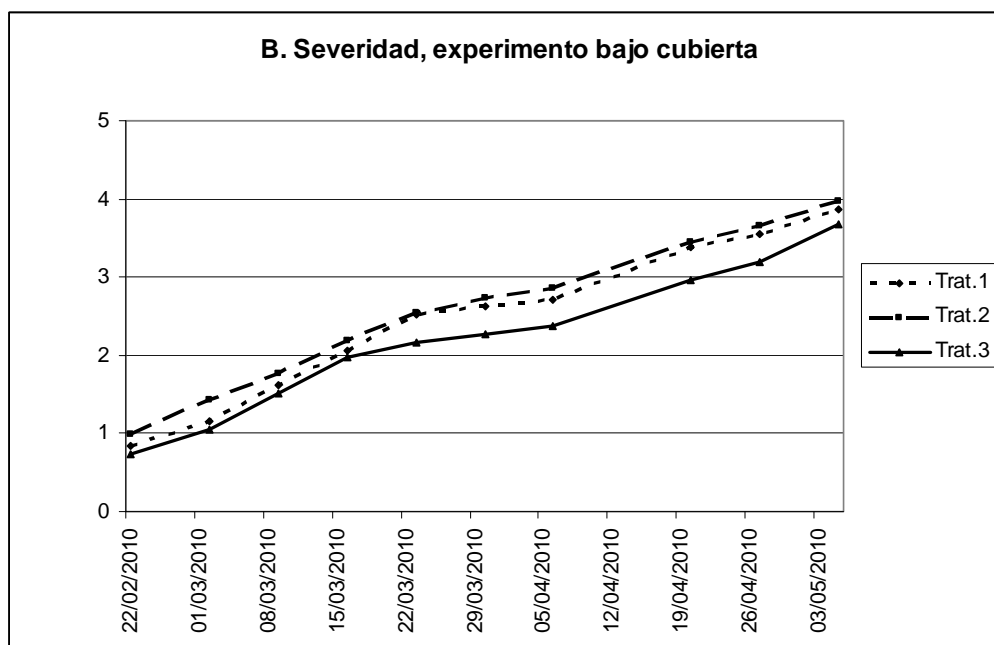


Figura 8. Evolución de la severidad (escala 0-5) de plantas enfermas con cancro bacteriano en los tres regimenes de riego. B. Experimento bajo cubierta.

El las figuras 9 y 10 se muestran los resultados de las evaluaciones de incidencia y severidad en las parcelas con y sin inoculación.

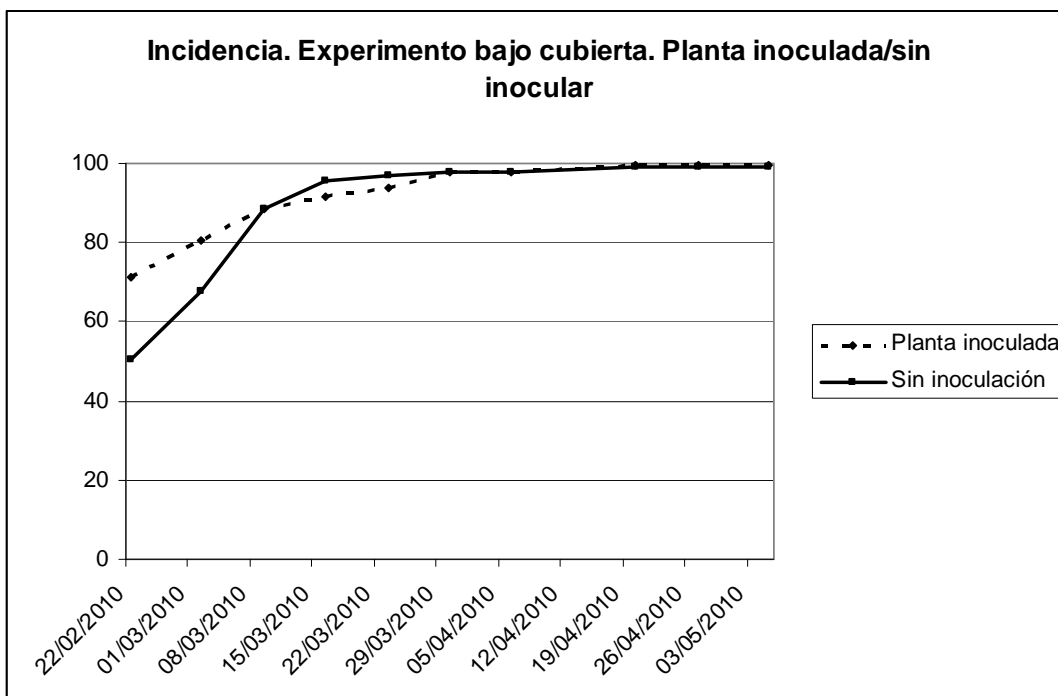


Figura 9. Evolución de la incidencia en parcelas con y sin inoculación bajo cubierta.

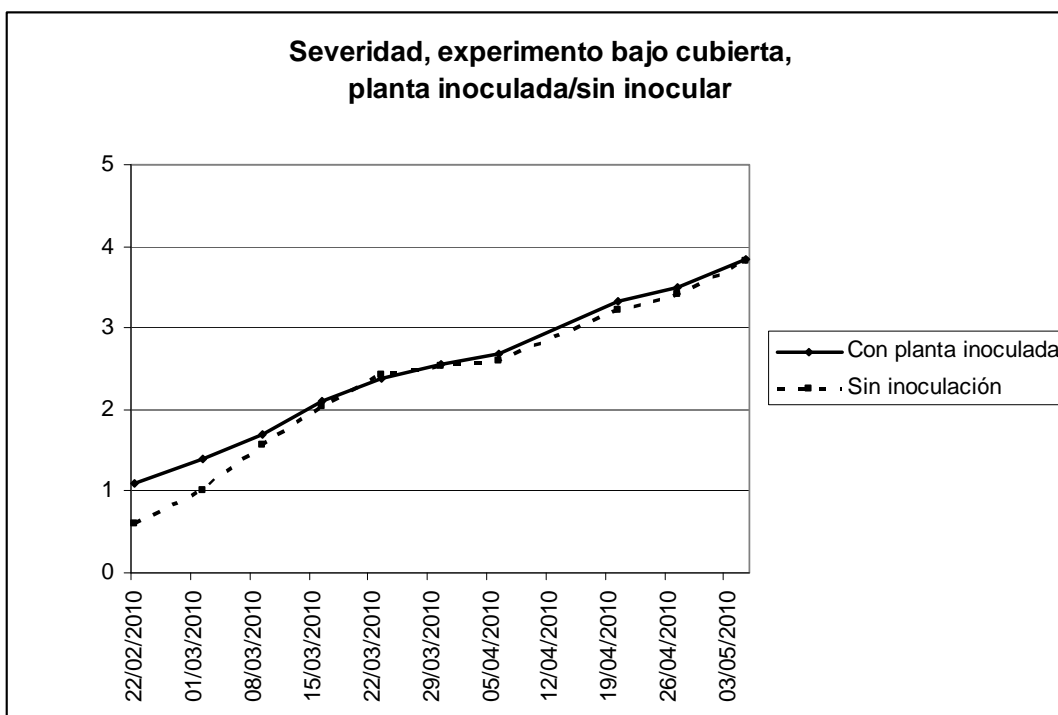


Figura 10. Evolución de la severidad en parcelas con y sin inoculación de la planta de la cabecera de riego.

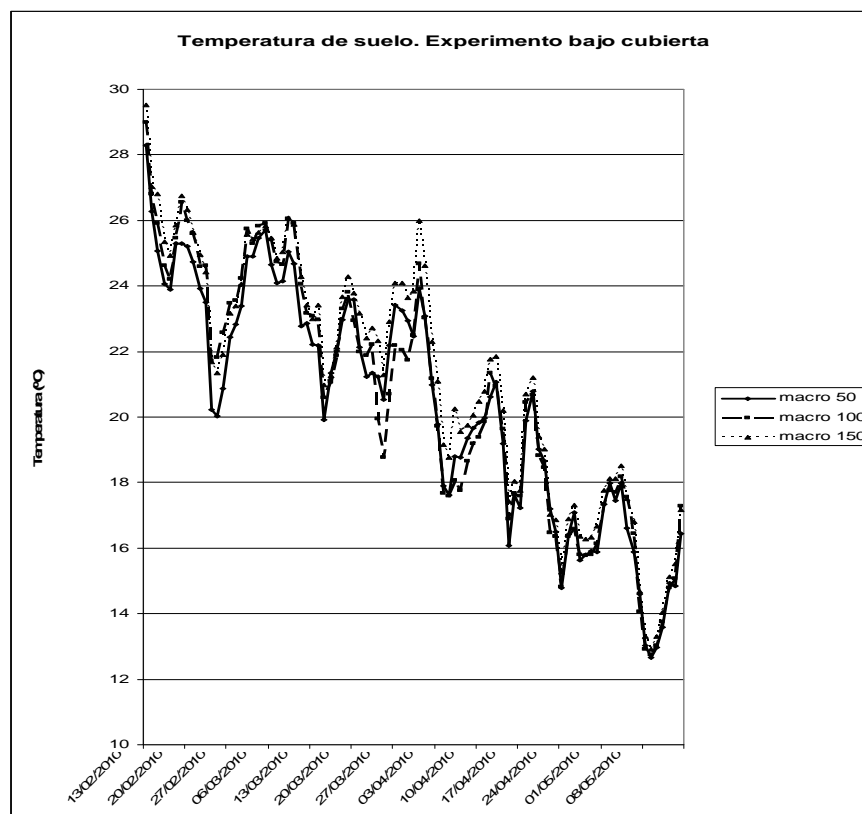


Figura 11. Temperatura de suelo diaria tomada en el experimento bajo cubierta.

En el cuadro 2 se muestran los resultados en valores numéricos de las evaluaciones de incidencia y severidad correspondientes a 22/2 y 27/4 y del porcentaje de lesiones en vasos del 5/5, en el experimento bajo cubierta.

Tratamiento	Incidencia (%)		Severidad (escala 0-5)		% Plantas con lesiones en vasos
	22/2	27/04	22/02	27/04	
50% riego	67	98	0.83	3.56	96
100% riego	69	99	1.00	3.66	97
150% riego	47	100	0.74	3.19	88
Planta inoculada	71 b	99	1.11	3.51	97
Sin inocular	51 a	98	0.60	3.42	90

En la figura 12 se muestra la evolución de los rendimientos acumulados (kg/parcela) en el experimento bajo cubierta.

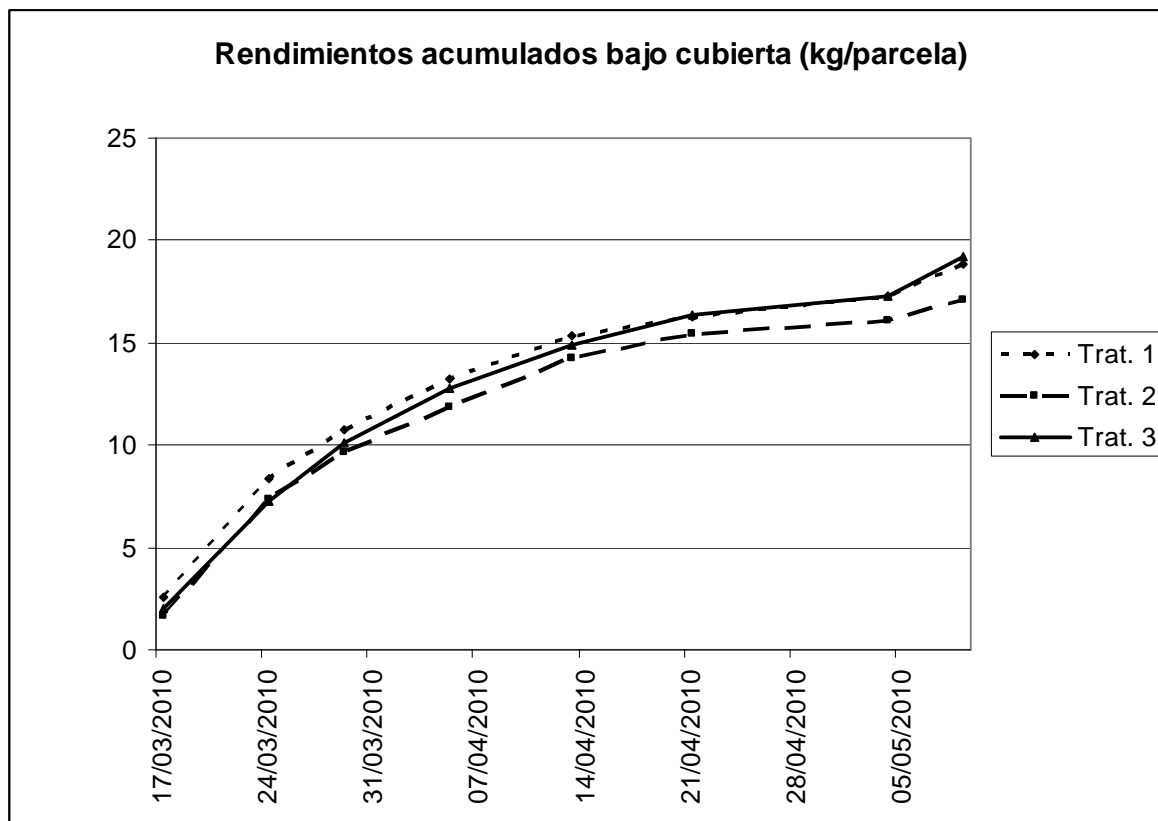


Figura 12. Rendimientos en kg/parcela obtenidos en cada sector.

Tampoco en este experimento se registraron diferencias estadísticamente significativas para los rendimientos entre los tratamientos.

COMENTARIOS:

EXPERIMENTO A CAMPO:

- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de plantas afectadas (incidencia) al comienzo del ataque entre los niveles de riego realizados.
- En esa etapa el tratamiento con menor nivel de riego presentó valores menores de plantas enfermas, tanto en las parcelas con una planta inoculada en el comienzo del surco como en las no inoculadas. Esto indicaría un retardo de la diseminación de la enfermedad al aplicar menores volúmenes de agua.
- Los niveles de riego no tuvieron efecto alguno en la severidad de los ataques probablemente debido a que su efecto estaría en la prevención de la diseminación de la enfermedad y termina una vez que la planta es infectada.

- Sin embargo, al final de la temporada el porcentaje de plantas con daños en sus vasos fue menor en los niveles que recibieron un régimen de riego menor.
- Quizás el desarrollo de este tipo de síntomas dependa del momento en el que la planta fue infectada, el cual fue más tarde en el tratamiento con menores niveles de riego.
- El haber colocado una planta inoculada al comienzo de la línea de riego de cada surco en algunas parcelas influyó sobre la primera parte del ciclo de la enfermedad, luego su efecto desapareció frente a la presencia de inóculo natural en el lugar donde se realizó el experimento.
- No se vieron grandes diferencias entre los registros de temperatura de los tres niveles de riego, sin embargo el orden de los valores siempre fue 50% riego < 150% < 100% riego, con diferencias de décimos de grados.
- No se encontraron diferencias entre los rendimientos lo cual era esperable dados los valores importantes de ataque en todas las parcelas. La producción en todas las parcelas disminuyó a partir del 21/4 coincidiendo con que la mayoría de las plantas superaban el grado 3 de la escala utilizada.

EXPERIMENTO BAJO CUBIERTA:

- En el experimento bajo cubierta no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las evaluaciones realizadas, salvo en los valores de incidencia inicial entre las parcelas con planta inoculada y sin inocular.
- Los niveles de enfermedad observados en este experimento siempre fueron mayores que los de campo.
- Muy probablemente se deban ajustar para próximos experimentos los niveles de riego fijados, ya que éstos pudieron haber sido excesivos, por lo cual no se observó ningún efecto sobre la diseminación de la enfermedad.

CONTROL BIOLÓGICO DE CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE CON EXTRACTO DE PROPÓLEO

Zignago Paulos A.; Silvera Pérez E.; González Rabelino P.

Unidad de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. yuyoz123@gmail.com

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, el tomate (*Solanum lycopersicon*) es el principal cultivo hortícola en producción después de la papa. Existen 1.012 explotaciones con un rendimiento de 37.022 t. El 86 % de la producción se destina para consumo fresco, se planta en dos modalidades: a campo (15,1%) y protegido (84.9%) (MGAP-DIEA, 2009).

El cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), puede provocar severas pérdidas y es favorecida por temperaturas 25 – 27 °C y alta humedad relativa (Lopes y Quezado-Soares, 1997). La enfermedad produce marchitamiento en la planta, canchros en tallos, y pecíolos. En fruto se observan manchas en forma esporádica. La fuente primaria de inóculo es la semilla, que transporta a la bacteria en forma epífita o como infección latente, la enfermedad se manifiesta a los 30 o 40 días luego del transplante (Chang, *et. al* 1992).

La baja eficiencia en el control de la enfermedad por parte de los antibióticos y fungicidas cúpricos sumado al surgimiento de poblaciones bacterianas resistentes (Lopes, 2000), lleva a la búsqueda de medidas alternativas de control del cancro bacteriano. La tendencia actual en la agricultura, es la búsqueda de medidas de manejo respetuosas del medio ambiente, que prioricen el aprovechamiento de los recursos naturales nativos.

El propóleo es un compuesto resinoso complejo recolectado por las abejas (*Apis mellifera*) de ciertas especies vegetales y posee acción antimicrobiana (Sforcin *et al.*, 2000). La actividad antimicrobiana puede estar asociada al alto contenido de sustancias del tipo flavonoides presentes en el propóleo (Grange y Davey, 1990). Trabajos previos realizados en Facultad de Agronomía mostraron que los extractos etanólicos de propóleos ejercieron efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *Ralstonia solanacearum*. (Zignago *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

Como forma de contribuir al desarrollo de métodos de control alternativos el presente trabajo propone evaluar:

- 1) el efecto *in vitro* del extracto de propóleo en el control de Cmm, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

2) comparar el efecto desinfectante del extracto de propóleo y el hipoclorito de sodio en el control de Cmm sobre semillas de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los extractos:

A 120 gr. propóleo recolectado en mallas se le agregaron 1l de alcohol 70%, quedando a una concentración de 12%. Se colocó en un matraz de 2 l y se los sometió a una temperatura de 70° C bajo agitación continua durante 30 minutos. Se coló con un filtro de papel tipo Whatman 40 y se centrifugaron durante 10 min. El sobrenadante se esterilizó mediante filtrado con membrana de nitrocelulosa 0,2 µ.

Determinación de la CMI y de CMB del extracto de propóleo frente a veinte aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*:

1) La CMI se determinó como la mínima concentración de extracto de propóleo que inhibe el crecimiento bacteriano mediante el método de dilución en agar.

En tubos estériles se adicionó NAD estéril a 40 °C y el extracto de propóleo o alcohol a concentración de 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,030; 0,0155; 0,008; 0,004 y 0,002 % (p/v). El contenido de cada tubo (15 ml) se homogenizó y se vertió en una placa de Petri estéril. Se prepararon en saline 0,85 % p/v 20 suspensiones de células bacterianas de los aislamientos de Cmm a partir de colonias en fase de crecimiento exponencial (72 h). La concentración fue ajustada con un espectrofotómetro a 0,1 Abs y 550 nm equivalente a 1×10^8 ufc/ml. De cada suspensión se tomó una alícuota de 5 µl y se inoculó en placas preparadas con las diferentes diluciones de propóleo o alcohol. Placas sin propóleo y alcohol se sembraron como control de viabilidad. Luego se incubaron a 27°C por 72 h. y la CMI fue registrada.

2) La CMB se determinó como la mínima concentración de extracto de propóleo con efecto biocida sobre el crecimiento bacteriano mediante el método diluciones seriadas en medio de cultivo líquido.

En tubos de ensayo se adicionó Nutriente Broth Dextrosado (NBD) con extracto de propóleo a las concentraciones 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,030; 0,0155; 0,008; 0,004 y 0,002 % (p/v) y sin extracto (testigo etanol). Los tubos fueron sembrados con 10 µl de suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^8 ufc/ml, e incubados en agitación (140 rpm), luego 5 µl fueron colectados y sembrados en placas de Petri con NAD. Los tubos y placas fueron incubados a 27°C por 72 hs. La determinación de la CMB fue registrada

Comparación del efecto desinfectante del Extracto Etanólico Propóleo (EEP) (6.25%, 1 min) e hipoclorito de sodio (NaClO) (10%, 1 min) y agua sobre semillas de tomate inoculadas artificialmente:

La desinfección de la semilla para la eliminación de contaminantes o patógenos se realizó con termoterapia (55° C durante 30 minutos). A continuación se inocularon de forma artificial, con una suspensión bacteriana de $1,0 \times 10^8$ ufc/ml (medida en espectrofotómetro 550 nm y 0,1 Abs.) de Cmm. Se realizaron los tratamientos con hipoclorito de sodio al 10%, extracto de propóleo al 6,25 % y agua destilada estéril durante 1 minuto. Posteriormente se sembraron 50 semillas por placa de Petri, con 4 repeticiones. Se incubaron en cámara de crecimiento a 27 °C durante 72 horas y se evaluó la presencia/ausencia de crecimiento bacteriano sobre las semillas.

RESULTADOS

Todas las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) fueron sensibles al extracto de propoleo, como se observa en la Tabla No 1. El etanol utilizado como solvente en el extracto de propoleo no ejerció efecto antibacteriano a las concentraciones evaluadas. El control de viabilidad creció en todas las cepas de Cmm.

La CMI en el 75 % de los aislamientos fue de 0.008 %(p/v); los demás aislamientos fueron inhibidos a concentraciones mayores, siendo 0.0625 %(p/v) la mayor concentración. La CMB fue de 0.03 %(p/v) en el 75 % de los aislamientos; para el resto de los aislamientos ocurrió a concentraciones mayores, siendo 0.0625 %(p/v) la mayor concentración (Ver Tabla No 1).

La CMI para las 20 cepas evaluadas se determinó entre 0.008 y 0.625 %(p/v) y para CMB se presentó entre 0.015 y 0.0625 %(p/v).

Tabla No. 1: CMI y de CMB del extracto de propóleo frente a veinte aislamientos de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Cepa Cmm	CMI %	CMB %
1	0,008	0,03
2	0,008	0,015
3	0,008	0,03
4	0,03	0,0625
5	0,008	0,03
6	0,008	0,03
7	0,008	0,03
8	0,03	0,0625
9	0,008	0,03
10	0,008	0,0625
11	0,008	0,03
12	0,008	0,03
13	0,008	0,03
14	0,008	0,03
15	0,008	0,03
16	0,008	0,03
17	0,008	0,03
18	0,03	0,03
19	0,015	0,03
20	0,0625	0,0625

Tanto el EEP como el NaClO redujeron la incidencia de Cmm sobre las semillas de tomate. Como se observa en la Tabla No. 2 el EEP mostró una incidencia de 19 % mientras que el NaClO obtuvo un 1%.

Tabla No. 2: Incidencia de Cmm en semillas de tomate.

Tratamiento	Incidencia (%)
NaClO	1 a
EEP	19 b
Testigo	98 c

CONCLUSIÓN

La acción antimicrobiana observada para el extracto de propóleo sugiere su uso en el manejo de cancro bacteriano del tomate. Se deberá continuar las investigaciones enfocadas a su forma y momento de aplicación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chang, R. J.; Ries, S. M. and Pataky, J. K. 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology* 82:553-560.
2. Grange, J.M, Davey, R.W.1990. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83(3): 159-160.
3. Lopes, C. A.; Quezada-Soares, A. M. 1997. Doenças bacterianas das hortaliças. EMBRAPA. Brasília-DF.
4. Lopes C.A., 2000. Bacterioses de hortalizas: Situación actual e perspectivas de controle. In: Zambolim, L. (ed) Manejo Integrado: Doenças, Pragas e Plantas Daninhas. Viçosa- MG Brasil.
5. Sforcin, J.M, Fernandes Jr, A, Lopes, C.A.M., Bankova, V.,Funari, S.R.C. 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 243-249.
6. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN ESTADÍSTICA AGROPECUARIA. 2009. Encuestas hortícola 2009 zona sur y litoral norte. (en línea). Serie encuesta no. 290. Consultado noviembre 2010. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,98,O,S,0,MNU;E;2;16;10;6;MNU>
7. Zignago, A., Rauduviniche, L., Silvera, E., González, P. Evaluación “*in vitro*” del efecto de propóleos de dos orígenes sobre bacterias patógenas de plantas. 11 Congreso Nacional, 3er Panamericano de Promoción de consumo de frutas y hortalizas. Sociedad Uruguaya de Horti-Frutícola. Mayo 2007. Montevideo