

24 y 25 - SETIEMBRE 2015

Resultados de Investigación en

CITRICULTURA



GENÉTICA

SANIDAD

PRODUCTIVIDAD

inia

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY

Resultados de Investigación en Citricultura

TABLA DE CONTENIDO

Avances y Perspectivas del Programa Nacional de Saneamiento y Certificación de Cítricos.	3
Nuevas oportunidades varietales de Citrus para la mejora de la competitividad.....	8
Biotecnología aplicada al desarrollo de nuevas variedades: manipulación de la ploidía para obtención de mandarinas sin semilla.....	13
Marcadores moleculares para la caracterización de variedades y portainjertos	17
Tecnologías avanzadas de producción de plantas cítricas.	20
Estrategias para la producción de frutos sin semillas en mandarina 'Afourer'.	26
Efecto del anegamiento y la temperatura del suelo sobre la respuesta fisiológica de los portainjertos usados en el Uruguay.	31
Diagnóstico nutricional y Fertirriego: una propuesta dentro de los sistemas de producción intensivos en cítricos.....	35
Estrategias de manejo para la recuperación de plantas cítricas dañadas por heladas.....	41
Disipación de fungicidas e insecticidas utilizados en campo en el cultivo de mandarinas, naranjas y limones.....	45
Tratamientos cuarentenarios: Impacto en la calidad de fruta y estrategias pre y postcosecha para su minimización.....	50
Manejo de fungicidas y sales en el control de patógenos postcosecha	55
Pudrición amarga: Evaluación del fruitgard pz100 (p.a. propiconazole) para el control de <i>Geotrichum citri aurantii</i>	61
CORTINAS FORESTALES EN CITRICULTURA: ASPECTOS SANITARIOS Y ALTERNATIVAS.....	65
Aportes al conocimiento de las moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en el Uruguay.....	70

Aportes al manejo de Mosca de la Fruta mediante trampeo masivo.....	77
Manejo integrado de Mosca de la fruta con trampeo masivo en empresa privada.	81
Situación regional de HLB y presencia del vector en Uruguay.....	83
Avances en el control integrado de <i>Diaphorina citri</i> mediante enemigos naturales y productos selectivos.....	87
Avances en la identificación y evaluación de parasitoides, depredadores y entomopatógenos de <i>Diaphorina citri</i> (Hemiptera: <i>Psyllidae</i>).....	100
Búsqueda de aislados de CTV promisorios para su uso en protección cruzada en naranjas Navel.	103
Detección y caracterización de virus y viroides en la Citricultura del Uruguay: aportes sobre el nuevo linaje de CTV en Sudamérica y su repercusión en la protección cruzada	107
Cancro cítrico: Aportes sobre el uso de inductores de resistencia para el control de la bacteria.....	113
Validación de una estrategia de manejo integrado para el control de Mancha Negra de los cítricos	118
Alternaria en mandarinas: Contribución de la investigación para el control integrado de la enfermedad.	121
Estado actual de experiencias sobre control de mancha marrón (<i>Alternaria alternata</i> pv <i>citri</i>) en mandarinas en la EEA Concordia INTA.....	126

Avances y Perspectivas del Programa Nacional de Saneamiento y Certificación de Cítricos.

A. Bertalmío¹, D. Maeso¹, L. Goncalvez¹, R. Rolón¹, O. Joffré¹, C. da Rosa², G. Fontán², M. de los Santos³, R. Colina⁴, M. J. Benítez-Galeano⁴, Fernando Rivas¹.

1. Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Uruguay.

2. Instituto Nacional de Semillas. Uruguay.

3. Dirección General de Servicios Agrícolas, MGAP. Uruguay.

4. Laboratorio de Virología, Universidad de la República, CENUR Noroeste, Sede Salto. Uruguay.

Contacto: cfrivas@inia.org.uy

Introducción.

La citricultura en Uruguay, con una superficie total cercana a las 20.200 hectáreas y 7.200.000 árboles, constituye el principal rubro hortifrutícola de exportación y su crecimiento depende del éxito en el desarrollo continuo de ventajas competitivas.

Este cultivo tiene una alta incidencia de enfermedades sistémicas provocadas por virus, enfermedades afines y bacterias, todas transmisibles por injerto y sin métodos conocidos de cura, estimándose el impacto de las mismas en una reducción de la producción y calidad cercana al 30%.

El Plan Estratégico para la Citricultura aprobado por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) en el año 2010 estableció como uno de sus pilares fundamentales al Saneamiento y la Certificación, recogiendo la opinión del sector productivo, consultores internacionales e Instituciones del Estado, ya que resulta fundamental el libre acceso a materiales de propagación con garantías sanitaria debido a que la prevención es la única forma de controlar este tipo de enfermedades.

En ese contexto, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), el Instituto Nacional de Semillas (INASE) y la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA) elaboraron un proyecto para la mejora sanitaria en cítricos. La implementación del denominado “Programa Nacional de Saneamiento y Certificación de Cítricos” (PNSCC) incluyó un acuerdo interinstitucional para el mejor aprovechamiento de las capacidades técnicas y de infraestructura, y la aprobación de un estándar específico para la multiplicación y comercialización de cítricos, para el control de la actividad viverista. El mismo reglamenta el registro obligatorio y la producción de plantas bajo malla antiáfidos.

Materiales y Métodos.

La metodología aplicada en los procesos de saneamiento y comprobación del estado sanitario se ajusta al protocolo establecido por la DGSSAA y se basa en técnicas estandarizadas recomendadas por FAO (Frison E., M. Taher. 1991; Roistacher, C.N., 1991) que involucra el uso de herramientas biotecnológicas para la eliminación de enfermedades

transmisibles por injerto y técnicas serológicas, biológicas y moleculares para el diagnóstico de las mencionadas enfermedades.

Las plantas candidatas diagnosticadas libres de las enfermedades incluidas en el Estándar de Certificación de Citrus ingresan al esquema de certificación como "Material Inicial" o "Plantas Madre" (PM) y se mantienen en instalaciones a prueba de áfidos ubicadas en el INASE, aisladas de otros materiales aún en proceso. El proceso de multiplicación se inicia con la extracción de algunas yemas de las PM para formar los Bloques Fundación (BF) en INASE, en tanto que la producción de bloques de incremento y plantas certificadas la realizan viveristas registrados, los cuales son inspeccionados y controlados por INASE y la DGSSAA. El estatus sanitario de los BF es verificado cada tres años mediante tests biológicos para Psorosis (CPsV) y Exocortis (CEVd), diagnósticos moleculares para CEVd y Cachexia (HSVd) también cada 3 años, y anualmente para Tristeza (CTV) mediante diagnósticos serológicos. Todos los controles fitosanitarios son supervisados por la DGSSAA, organismo oficial responsable además del control por Cancrosis.

Paralelamente a la comprobación del estado fitosanitario de los distintos cultivares, se realiza la comprobación fitosanitaria de la colección de plantas semilleras de INIA mediante el test biológico de CPsV, que al igual que en los bloques de variedades se repite cada 3 años.

La identidad genética de las variedades se verifica en un módulo de comprobación varietal instalado en INIA Las Brujas, en combinaciones de copa con Trifolia y Citrange.

La priorización de variedades para ingresar al proceso de saneamiento y comprobación sanitaria la realiza el Comité Técnico, considerando la opinión de productores y viveristas; la conformación de los BF se realiza de acuerdo a la demanda del Sector y para la priorización de portainjertos se tiene en cuenta las variedades o clones y volúmenes de semilla demandados.

Las solicitudes de introducciones desde el exterior son analizadas por el Comité Técnico y puestas a consideración del Comité Ejecutivo, quien aprueba y resuelve si los materiales a ingresar siguen el mismo proceso de saneamiento y comprobación sanitaria de los materiales nacionales o si sólo se realiza la verificación de estado sanitario mientras se mantienen en cuarentena.

Con la creación del Consorcio Citrícola en 2014, el MGAP buscó también darle una participación activa a las empresas citrícolas, por lo que se espera un mayor involucramiento del Sector en la toma de decisiones relacionadas al PNSCC.

Resultados y Discusión.

Con la implementación del proceso de saneamiento y certificación iniciado en 2010, a la fecha se han logrado los siguientes resultados directos:

- Conformación de una colección de Plantas Madres con 91 clones de variedades libres de CTV, CPsV, Concave Gum, CEVd, HSVd y Cancrosis, aptas para la conformación de Bloques Fundación (Cuadro 1).
- Conformación de un Bloque Fundación activo, constituido por 46 clones priorizados por el sector viverista (Cuadro 1, fondo verde).
- 19 viveros habilitados que cubren las zonas N, S y centro del país (Figura 1).
- Suministro al Sector de 1.822 kg de semilla certificada de portainjertos, con aumento significativo de la demanda anual por la obligatoriedad que rige desde el 01/01/2014 de comercializar únicamente plantas certificadas (Figura 2).
- Suministro al Sector de 21.741 yemas con calidad fitosanitaria y genética certificada, clara diferenciación por zonas y alta demanda de mandarinas (Figura 3 y Figura 4).
- Se ha realizado el diagnóstico biológico y molecular a 112 plantas candidatas, donde el 93,7% de las mismas (105 plantas) han superado todos los controles; se diagnosticaron 7 plantas portadoras de virus o viroides, correspondiendo 2 plantas a CPsV, 1 planta al CVd III y 4 plantas probablemente portadoras de HSVd.
- En los controles a plantas semilleras, el 4,9% de un total de 329 testajes ha dado positivo para CPsV.
- La presencia de CTV detectado en pruebas serológicas alcanzó al 5,6% de las plantas microinjertadas (16 en 282).

Cuadro 1. Variedades que integran la colección de Plantas Madres y el Bloque Fundación (BF, fondo verde).

Clementinas	Naranjas (Continuación)	Navel (Continuación)	Híbridos (Continuación)
1. AU/UN	23. Midnight temprana	46. Tuly Gold	67. F9P3
2. Clemenules	24. NVA 034-2	47. W. Navel CW 56	68. F12P3
3. Clemenules CMG 111	25. NVA 035-1		69. M9 ®
4. Clementina SRA 71	26. NVA 050	Limonos y Limas	70. M19 ®
5. Clementina SRA 362	27. Rhode Red DSPA 339	48. Bearss Lime	71. Afourer
6. CP2	28. Rufina ®	49. Criollo	72. Amaka
7. Clemenrubí	29. Victoria ®	50. Eureka	73. Amakusa
8. Florentina	30. Paylate ®	51. Fino	74. Ariake
9. LR1	Sanguíneas	52. Fino L. INIASEL 95	75. Daisy
10. Marisol	31. Moro Quinta 29	53. INIA 700 (L. sin sem.)	76. Daisy LS ®
11. Nour INIASEL 350	Navel	54. Limoneira 8A	77. Ellendale CE49
Satsumas	32. Barnfield	55. Lisbon Monroe	78. Ellendale
12. Okitsu Clon 29	33. Cara Cara	Pomelos	79. Fairchild LS ®
13. Okitsu CS 141	34. Chislett ®	56. Marsh CP9	80. Gold Nugget ®
14. Owari CS 7	35. Fisher DSPA 510	57. Ruby Red Solari	81. Kinnow LS ®
Mandarina común	36. Frost Navel	Híbridos	82. Murcott CM1
15. Avana	37. Fukumoto	58. A30 ®	83. Murcott
16. Montenegrina	38. Lane Late	59. A172 ®	84. Nankou
17. CA 27	39. Monteparnasso	60. A201	85. Nova CMG 112
18. CA 100	40. Navelina CW 151	61. A218 ®	86. Primosole
Naranjas	41. New Hall	62. B30 ®	87. Ortanique
19. Salust. Indio CN167	42. New Hall CW 153	63. B79 ®	88. Shasta Gold ®
20. Valencia CV 64	43. Rhode ®	64. F2P3 ®	89. Tahoe Gold ®
21. Valencia Delta	44. Santa Berta	65. F3P8 ®	90. Tango ®
22. Midnight DSPA 338	45. Spring Navel	66. F6P8 ®	91. Tsunokaori



Figura 1. Ubicación de viveros habilitados

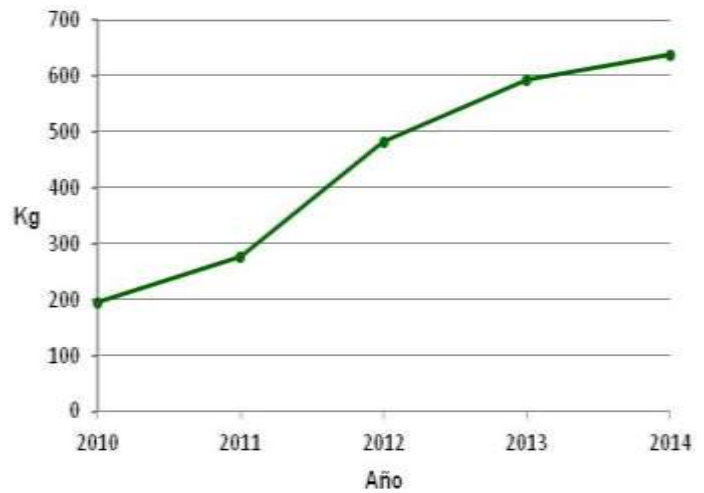


Figura 2. Semillas vendidas desde 2010.

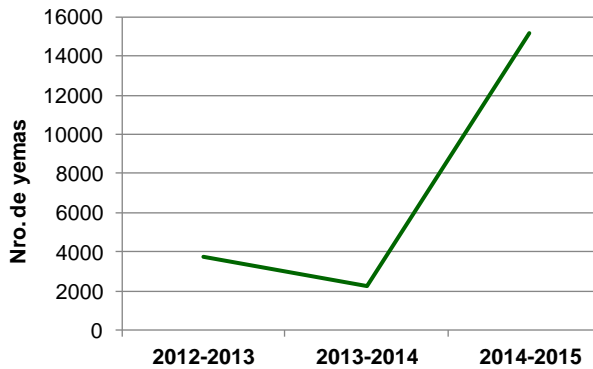


Figura 3. Yemas vendidas desde 2012.

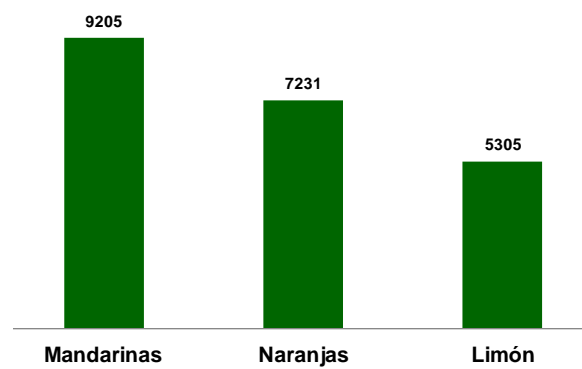


Figura 4. Variedades demandadas.

Conclusiones.

Para un Sector cuyo principal objetivo es exportar a los mercados más exigentes del mundo, resulta fundamental mantener un status fitosanitario libre de plagas cuarentenarias, controlando potenciales amenazas sanitarias. Con la aparición del PNSCC y la introducción de materiales del exterior a través del mismo, la obligatoriedad de producción de plantas bajo malla y el control de viveros, el riesgo implícito de la introducción al país de nuevas enfermedades se mitiga, permitiendo potenciar las bases tecnológicas para el desarrollo de una citricultura competitiva, innovadora y democrática.

La entrada en vigencia del Estándar Específico en 2014 (INASE; MGAP. 2010) impactó en la demanda de semilla certificada y ha permitido ordenar la producción viverista. Paralelamente la demanda de yemas tuvo un fuerte crecimiento en la zafra 2014 – 2015.

Se refleja una clara preferencia por las variedades de mandarinas en el Norte y de limones en el Sur, en tanto que en portainjertos, los Trifolia CT 33, CT 35, Argentino, Tucumán y Roubidoux siguen siendo los más demandados. El fortalecimiento del sector viverista se ha

visto reflejado en el aumento de la demanda de portainjertos vigorosos, como el Limón rugoso (*Citrus jambhiri*) y Cravo (*C. limonia*.)

A la fecha, el PNSCC está consolidado en cuanto a interacción institucional, infraestructura y capacidades técnicas, aunque se visualizan algunas debilidades como la estabilidad financiera del mismo, recursos humanos con funcionarios de apoyo no permanentes en el equipo operativo de INIA y la existencia de desafíos no resueltos en el sector viverista.

Bibliografía

Bertalmío, A.; Maeso, D., Sanguinetti, G.; Fontán, G.; De los Santos, M.; Borde, J.; Montes, F.; Colina, R., Rivas, F. 2012. Saneamiento y Certificación de Cítricos. Revista INIA N° 31, pp 49-53.

DGSSAA /MGAP. 2011. Protocolo a aplicar para el saneamiento de materiales de propagación de cítricos. Documento Interno.

Frison E., M. Taher. 1991. Technical Guidelines for the Safe Movement of Citrus Germplasm. FAO/IBPGR.

INASE; MGAP. 2010 y decreto modificativo del 08/01/2014. Estándar Específico para la Producción y/o Comercialización de Materiales de Propagación Cítricos.

Navarro L., Roistacher, C.N, Murashige, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100:471-479.

Roistacher, C.N. 1991. Handbook for detection and diagnosis of graft-transmissible diseases of citrus. International Organization of Citrus Virologists, FAO. Rome

Nuevas oportunidades varietales de Citrus para la mejora de la competitividad.

Fernando Rivas, Beatriz Vignale.

Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.
Universidad de la República, Facultad de Agronomía (EEFAS), Salto. Uruguay.

Contacto: cfrivas@inia.org.uy

Introducción

La cadena citrícola del Uruguay se encuentra expuesta a una fuerte competencia en los mercados internacionales de frutas cítricas, básicamente Europa, Estados Unidos, Rusia y Brasil, dónde diversos actores del hemisferio Sur tales como Sudáfrica, Chile, Perú, Argentina y Australia también están posicionados de modo importante.

Las bases de la competitividad citrícola se basan, entre otros, en la época de ingreso a los mercados, la calidad (sanitaria y organoléptica) y la productividad del producto ofrecido. Así, la capacidad de innovación en la generación de un producto diferenciado, tal como lo es una nueva variedad, se establece como una oportunidad estratégica para ganar en competitividad en estos mercados.

La introducción de nuevo germoplasma del exterior se identifica como una estrategia válida para poder incorporar al sistema productivo variedades con cierto conocimiento y en algunos casos, ya establecidas comercialmente. Sin embargo, existen fuertes restricciones para basar una reconversión sobre materiales introducidos del exterior, tal como los son extensos períodos de evaluación y multiplicación del material, restricción de acceso dado al nuevo formato de 'clubes varietales' y costos asociados relativos a limpieza, cuarentena y derechos de usufructo del material genético. De este modo Uruguay cuenta con un Programa de Mejoramiento Genético, donde cooperan INIA y la Universidad de la República, para generar nuevos genotipos de valor para ser utilizados por la industria citrícola. Las estrategias de mejoramiento se basan en la creación de variabilidad genética a través de cruzamientos convencionales, aplicaciones biotecnológicas para la identificación de poliploides, inducción de mutaciones, prospección de variabilidad genética (mutaciones naturales) e introducción y evaluación de genética foránea. Hoy en día el Programa ha liberado bajo contrato 3 variedades de Naranja, 1 variedad de limón y 12 variedades de mandarina los cuales se encuentran disponibles en vivero habilitados.

Criterios de selección

Los atributos que tiene que tener una variedad para su selección y posterior desarrollo comercial son amplios y diversos, siendo difícil encontrarlos todos reunidos en una sola variedad; no existe la variedad ideal. Como criterios de evaluación se tienen en cuenta, entre otros, el sabor, presencia de semillas, productividad, fácil pelado (caso mandarinas), tamaño de fruta, contenido de °Brix, evolución de la acidez, época de recolección, susceptibilidad a enfermedades, presencia de espinas y alteraciones fisiológicas. Con esos

criterios, a partir de cruzamientos dirigidos se han seleccionado variedades que cumplan en lo posible la mayoría de estas características llegando hoy a cubrir un amplio periodo de recolección, con variedades con atributos interesantes tales como ausencia de semillas, excelente sabor, muy altos °Brix, tolerancia a *Alternaria* y Cancro Cítrico y alta productividad.

Nuevas Variedades Disponibles

Clones de Valencia Rufina Late[®], Victoria Late[®] y Paylate[®]

Estos clones fueron seleccionados a partir de prospecciones nacionales orientadas a encontrar mejores clones de Valencia a los tradicionalmente utilizados a nivel local (ej. CV64) los cuales tienen limitantes de tamaño, presentan semillas y mantienen una acidez muy alta, lo que lleva a que su cosecha se estime no antes de setiembre. Las alternativas propuestas presentan un periodo de recolección posterior a Valencia Midnight pero anterior al tradicional clon de Valencia, agregando que todos los nuevos materiales presentan **ausencia de semillas en condiciones de polinización cruzada**. Para el caso de Rufina Late además se destaca por su excelente color, muy superior comparado al resto de Valencias. Para el caso de Victoria Late y Paylate, destacan por su muy buen tamaño y alta productividad.

Limón Ana Claudia[®]

Este material fue obtenido a partir de prospecciones nacionales y se trata de un limón tipo Lisbon, de cosecha un poco más precoz y que **no presenta semillas en condiciones de polinización cruzada**. Su productividad en condiciones de manejo apropiadas es aceptable así como su el tamaño de fruta.

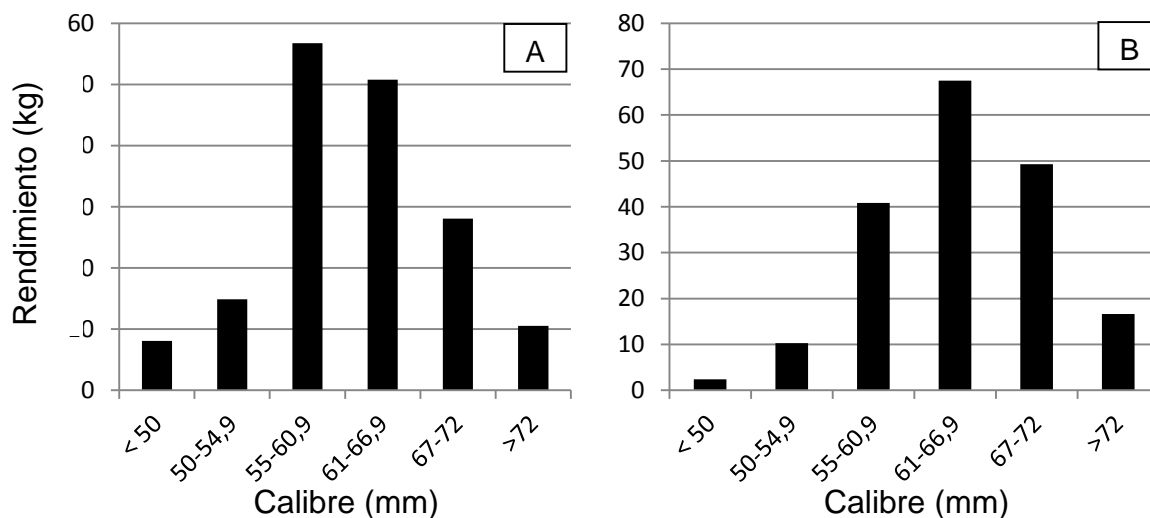


Figura 1. Comparativo de rendimiento (kg) por calibres de fruta (mm) del Limón Ana (A) Claudia y Limón Lisbon (B) en condiciones de Salto (Uruguay).

Variedades de mandarina recientemente liberadas por INIA-Fagro

Híbridos de Ellendale x Satsuma. Los híbridos actualmente liberados de este cruzamiento son los denominados **M9, M19 y B30**. Se destacan por su muy buena productividad, tolerancia a Alternaria y Cancro cítrico, buen sabor, color, tamaño de fruta y por conformar un periodo de recolección que abarca desde Julio hasta Setiembre. **M9 y B30 son autoincompatibles y no presentan semillas en condiciones aisladas**, mientras que M19 es autocompatible pero produce un número reducido de semillas.

Híbridos de Satsuma x Mandarina Común. En este cruzamiento se ha seleccionado el híbrido **A172** el cual se caracteriza por ser una planta de buen vigor, hábito globoso y buena densidad de follaje, muy similar a la Mandarina Común. El Fruto es de calibre medio, color naranja-amarillento, consistencia intermedia, forma algo redondeada y cascara normal. Es de muy fácil pelado, jugoso y presenta menor contenido de semillas que la Mandarina Común. Desarrolla °Brix moderados y madura 1 mes antes que Mandarina común. Presenta tolerancia a Alternaria.

Híbridos de Ellendale x Mandarina Común. Los híbridos de este cruzamiento son los denominados **B475, A218 y A30**. Se caracterizan por cubrir un amplio periodo de cosecha desde Junio hasta Setiembre con variedades de fácil pelado, tolerantes a Alternaria y con muy buen sabor. B475 y A218 se caracterizan por su buen tamaño de fruta, muy buena calidad de piel, buen color, persistencia en planta, buen pelado (deja muy poco residuo), fundencia, buenos °Brix y acidez balanceada conformando un fruto con sabor tipo mandarina común, intenso y agradable. Estos genotipos maduran desde fines de julio a principios de Agosto. A30 es más tardía y su fruto es de forma redondeada, de textura lisa, de consistencia intermedia y calidad de piel muy buena. Pela bien, dejando poco residuo. Su sabor es bueno, fundente. Su cosecha se estima a partir de Agosto-Setiembre con buenos °Brix y buena acidez. Todos estos materiales presentan semillas y son autocompatibles.

Híbridos de Ellendale x Page. Los materiales liberados de este cruzamiento se caracterizan por su alta calidad interna, alcanzando °Brix muy destacados. Los genotipos liberados (**F7P3, F6P8, F2P3, F4P2, F3P8**) cubren un periodo de cosecha desde mediados de Abril hasta Octubre. Tanto F7P3 como F6P8 son tolerantes a Alternaria.

Conclusiones

Hoy existen nuevos materiales genéticos que aportarán al desarrollo de la competitividad de la cadena citrícola. Su adecuación dependerá de cada destino en particular, pudiéndose divisar oportunidades para su incorporación a una estructura varietal con destino a EEUU, Europa, Brasil e inclusive con potencial para su futuro desarrollo en el sudeste asiático. Los materiales se encuentran disponibles bajo la modalidad de licencias no exclusivas con viveros comerciales a nivel nacional, existiendo manifiesto interés para su evaluación y desarrollo en otros lugares del mundo.

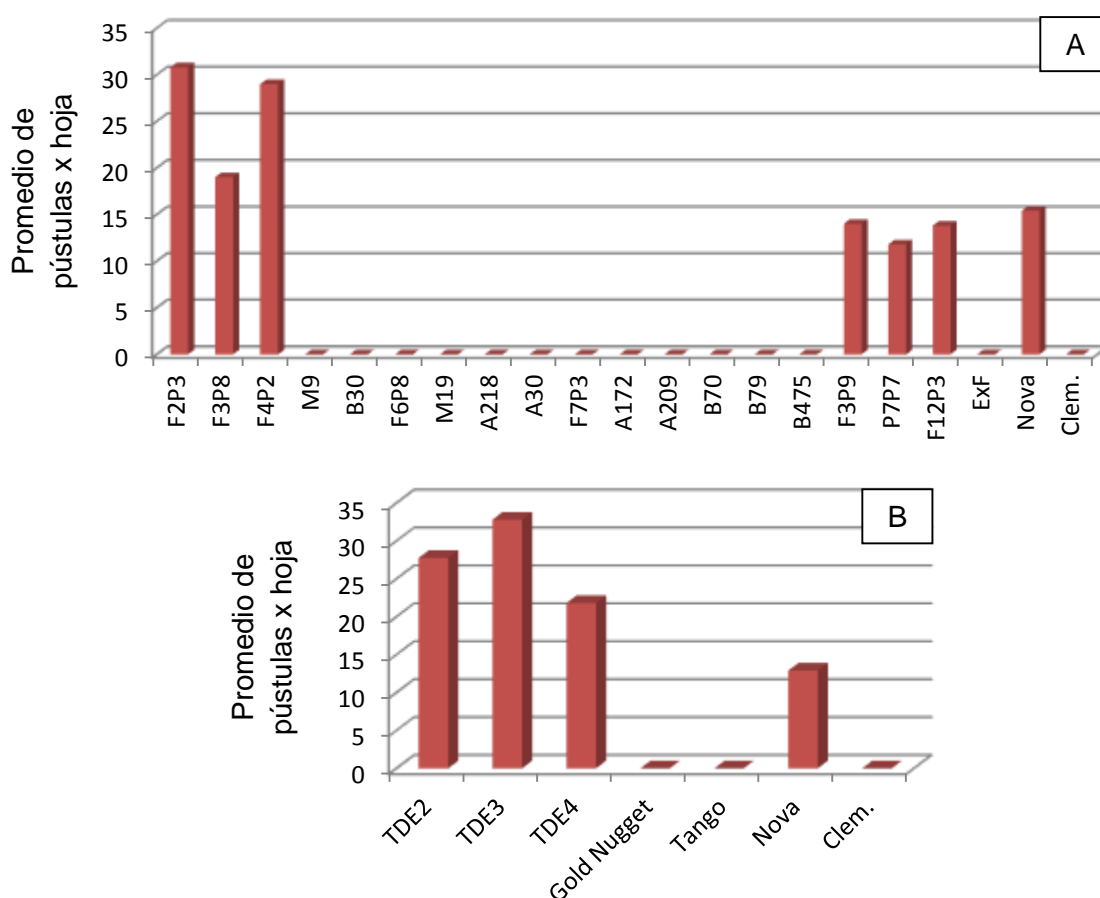


Figura 2. Susceptibilidad *in vitro* a *Alternaria* de: A) Nuevas variedades evaluadas a las 48 h post inoculación y B) Variedades introducidas evaluadas a las 24 h post inoculación. Fuente: Laboratorio de Fitopatología INIA Salto Grande.

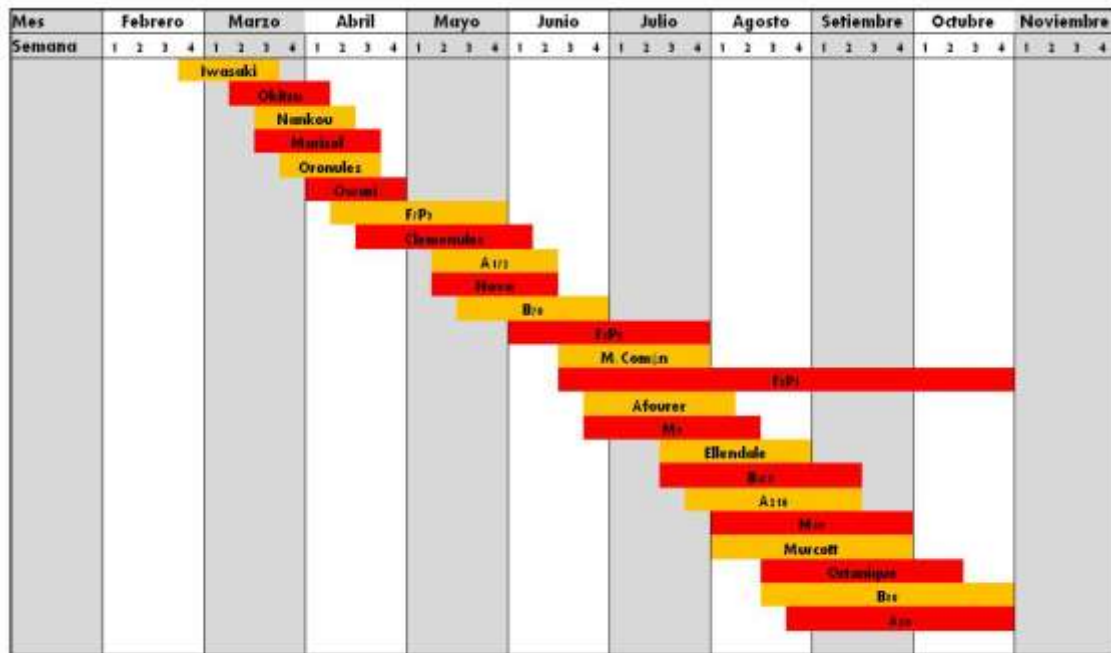


Figura 3. Calendario de cosecha tentativo para las nuevas variedades de mandarinas liberadas y su comparativo con otras variedades comerciales.

Biotecnología aplicada al desarrollo de nuevas variedades: manipulación de la ploidía para obtención de mandarinas sin semilla.

Mario Giambiasi¹, Ana Arruabarrena¹, Alicia Castillo², Fernando Rivas³.

¹Unidad de Biotecnología, Laboratorio INIA Salto Grande

²Unidad de Biotecnología, Laboratorio INIA Las Brujas

³ Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. INIA Salto Grande

Contacto: aarruabarrena@inia.org.uy

Introducción.

La citricultura uruguaya, orientada principalmente a mercados de exportación para consumo en fresco, requiere fruta con determinadas características de calidad que son consecuencia de la demanda de los mercados objetivo. En el caso de las mandarinas, las tendencias de consumo indican una preferencia por fruta de excelente sabor, fácil pelado y ausencia de semillas. La necesidad de producir fruta sin semilla obliga al rediseño de las plantaciones y limita las variedades que se pueden utilizar para la producción. Las variedades autoincompatibles son incapaces de polinizarse a sí mismas y, por lo tanto, producirán fruta sin semilla en ausencia de polen de otras variedades que sean compatibles. Por lo tanto, estas variedades deben plantarse en condiciones aisladas; ya sea en áreas extensas, rodeadas de variedades con polen infértil o cubiertas con malla anti-insectos. En algunas variedades autoincompatibles, donde la esterilidad es masculina y femenina a la vez, las frutas producidas no presentarán semillas, independientemente de la presencia o no de polen fértil de otras variedades. Este tipo de esterilidad puede ser consecuencia de varios factores genéticos, entre los que podemos encontrar ploidía impar, genes de esterilidad, translocaciones, etc. (Ollitrault et al., 2007a).

La creación y/o selección de individuos triploides es una estrategia interesante para los programas de mejoramiento genético y ha sido utilizada en varios países ya que los mismos suelen presentar esterilidad femenina y masculina produciendo, en consecuencia, fruta sin semilla y previniendo la polinización cruzada de otras variedades autoincompatibles cercanas.

Uno de los principales objetivos del Programa de Mejoramiento Genético de Citrus de INIA y Facultad de Agronomía es la creación de variedades de mandarina sin semilla. Para ello se ha propuesto la obtención y creación de triploides a través de dos estrategias diferentes. Una es el rescate de embriones de posibles triploides provenientes de hibridaciones convencionales (libres o dirigidas) y otra es la creación de triploides mediante hibridaciones de genotipos diploides ($2n=2x$) con genotipos tetraploides ($2n=4x$).

Obtención y selección de triploides por rescate de embriones

Un pequeño porcentaje de las semillas subdesarrolladas (semillas vanas) en frutos de variedades monoembriónicas corresponde a embriones triploides. En estas semillas se da

una relación desbalanceada entre la ploidía del endosperma y del embrión (5/3 o 4/3) y, en consecuencia, no hay desarrollo de endosperma y la semilla, en general, no germina. Para que estos embriones se desarrollen es necesario extraerlos de la semilla y cultivarlos en medio de cultivo bajo condiciones controladas para que obtengan los nutrientes necesarios para su desarrollo en plántulas (Ollitrault et al., 2007b). Cuando las plántulas *in vitro* adquieren un tamaño suficiente, se analiza la ploidía de las mismas utilizando citometría de flujo. Los plantines con un contenido de ADN 3C son sobreinjertados y aclimatados. Luego se llevan al invernadero.

Obtención de parentales tetraploides: espontáneos (duplicación somática) y fusión de protoplastos (hibridación somática)

a. Tetraploides espontáneos.

La mayoría de los tetraploides espontáneos provienen de la duplicación somática en embriones nucelares de variedades poliembriónicas y son también poliembriónicos. En la actualidad, la selección de plantines tetraploides provenientes de semillas de variedades poliembriónicas es un proceso relativamente efectivo y sencillo utilizando la citometría de flujo. Se siembran semillas de variedades poliembriónicas de interés y se seleccionan los plantines con un contenido de ADN 4C. Los mismos son llevados al invernadero hasta su floración. Estos tetraploides espontáneos, al provenir de variedades poliembriónicas, solamente podrán ser utilizados como parentales masculinos en cruzamientos con parentales femeninos diploides monoembriónicos (Ollitrault et al., 2007a).

b. Fusión de protoplastos: hibridación somática

La hibridación somática se trata de la fusión de dos células somáticas diploides (protoplastos) provenientes de dos parentales diferentes. Es una herramienta muy poderosa para expandir el pool genético de parentales tetraploides con una alta heterocigosis. Este método permite además la utilización de variedades que de otro modo no se podrían combinar como, por ejemplo, variedades estériles como "Satsuma" o "Navel" como parentales.

Para llevar adelante esta técnica es indispensable establecer, en primer lugar, líneas de callos embriogénicos ya que éstos poseen la capacidad de regeneración de plantas luego de la fusión mientras que los protoplastos provenientes de hoja no tienen dicha capacidad.

La purificación de protoplastos debe realizarse, a continuación, a partir de dos parentales diferentes; de uno se purifican protoplastos a partir de callos embriogénicos y del segundo, se purifican protoplastos a partir de hojas. La fusión de las células se puede llevar a cabo mediante dos metodologías, una es la fusión química (utilizando polietilenglicol) y otra es la fusión eléctrica. En ambos casos, los productos de la fusión se regeneran en plántulas sin ningún tipo de selección. Se ha observado que la mayoría de las plantas regeneradas son tetraploides que provienen de híbridos somáticos entre los dos parentales. Los tetraploides generados por fusión somática suelen tener buen porcentaje de polen fértil y se utilizan en hibridaciones con parentales femeninos diploides monoembriónicos para obtener híbridos triploides (Ollitrault et al., 2007a).

Resultados y Discusión

Obtención y selección de triploides por rescate de embriones

Desde el año 2011 el Programa de Mejoramiento Genético de INIA viene realizando rescate de embriones obtenidos de semillas vanas de variedades monoembriónicas. Hasta el momento se cuenta con 59 individuos triploides (Tabla 1). La mayoría de estos triploides proviene de polinizaciones abiertas y, por lo tanto, se desconoce el origen del parental masculino. Solamente se cuenta con 2 triploides provenientes de cruzamientos dirigidos.

Tabla 1. Número de individuos triploides para cada genotipo presentes en el Programa de Mejoramiento Genético.

Genotipo	N° triploides
Marisol	25
Clemenules	9
Tomatera	1
Clemenpons	6
Ellendale	3
Daisy	6
A30	1
B25	6
Carte Noir X Sunburst	1
Ana Claudia X Limón Fino	1

Cabe destacar que esta técnica rinde un bajo porcentaje de individuos triploides en relación al número de embriones rescatados y analizados.

Obtención de parentales tetraploides: espontáneos (duplicación somática) y fusión de protoplastos (hibridación somática)

a. Tetraploides espontáneos.

Desde el año 2013 se ha comenzado con la selección, por citometría de flujo, de plantines tetraploides provenientes de semillas de genotipos poliembriónicos. Hasta la fecha contamos con 78 tetraploides espontáneos provenientes de diferentes genotipos de interés. 43 provienen de genotipos comerciales y 35 de genotipos creados por el programa de Mejoramiento Genético de INIA y Facultad de Agronomía, los mismos se detallan en la Tabla 2.

Estos tetraploides se encuentran en período de juvenilidad y cuando florezcan serán utilizados como parentales masculinos en cruzamientos con parentales femeninos diploides.

Tabla 2. Número de individuos tetraploides para cada genotipo presentes en el Programa de Mejoramiento Genético

Genotipo comercial	N° tetraploides	Genotipo nacional	N° tetraploides
Murcott	10	B49	8
Afourer	4	B475	4
Montenegrina	5	B47	4
Fremont	10	B30	6
Carvalais	7	F3P9	1
Page	3	F12P3	1
Satsuma	4	A218	3
		A201	5
		A30	1
		M9	2

b. Fusión de protoplastos: hibridación somática

Se han establecido desde el año 2011 líneas de callos embriogénicos que se renuevan cada año. Se lograron regenerar callos embriogénicos de 13 genotipos de mandarinas y una naranja. En el momento se cuenta con líneas de callos de los siguientes genotipos: Murcott, Afourer, Page, Valencia, M9 y A30. Se ha ajustado la metodología para la purificación de protoplastos de callos y de hojas y se han realizado diversas fusiones combinando las diferentes líneas de callos con genotipos para los cuales no se han podido obtener callos. En cada combinación se intentó combinar características de interés y utilizar al menos un genotipo creado por el Programa. La mayor dificultad de la técnica es que requiere el ajuste de cada una de las etapas. Recientemente hemos logrado regenerar embriones de la fusión de protoplastos de callo de Murcott con protoplastos de hoja de F6P8.

Conclusiones

El Programa de Mejoramiento Genético cuenta con una base interesante de tetraploides espontáneos para comenzar el mejoramiento dirigido de cruzamientos de Diploides X Tetraploides para la obtención de genotipos Triploides. Adicionalmente, se están generando parentales tetraploides novedosos que combinan características de interés y que podrían ser utilizados en un mediano plazo para futuros cruzamientos. A su vez, se cuenta con un pool de triploides provenientes del rescate de embriones que serán evaluados en cuanto finalicen la fase juvenil.

Bibliografía

- Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F. and Froelicher, Y.** (2007a) Ploidy Manipulation for Breeding Seedless Triploid Citrus, in Plant Breeding Reviews, Volume 30 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470380130.ch7
- Ollitrault P., Froelicher Y., Dambier D., Luro F., and M. Yamamoto.** (2007b) Seedlessness and Ploidy Manipulation in Citrus Genetic, Breeding and Biotechnology (ed. I.Khan), Washington DC. ISBN-13: 978 0 851990194.

Marcadores moleculares para la caracterización de variedades y portainjertos

Mario Giambiasi¹, Ana Arruabarrena¹, Pablo Speranza², Fernando Rivas¹.

¹Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.

²Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Contacto: mgiambiasi@inia.org.uy

Introducción

El sector citrícola es el rubro hortifrutícola de mayor relevancia en el Uruguay. El 90% de la fruta se exporta al Mercado Europeo, uno de los más exigentes en cuanto a calidad se refiere (DIEA, 2012). En la actualidad el Programa de mejoramiento genético de cítricos de INIA se encuentra abocado a brindar soluciones tecnológicas innovadoras para dar soporte a los nuevos desafíos que enfrenta la citricultura nacional. Con el objetivo de generar variedades que no produzcan semillas, se están conduciendo trabajos destinados a la creación de parentales alotetraploides y autotetraploides. Para ello es necesario desarrollar herramientas moleculares que permitan entre otros, una caracterización de los diferentes individuos generados, identificar los parentales de híbridos interespecíficos naturales, hallar las fuentes de polen causantes de semillas en variedades autoincompatibles o discriminar embriones cigóticos de nucelares (Grosser y Gmitter, 2010). Dentro de los marcadores moleculares, se destacan los SSR (Simple Sequence Repeats) por ser específicos, reproducibles, codominantes y robustos. Para poder utilizar los SSR como herramienta de caracterización, es necesario que los productos de amplificación obtenidos sean alélicos y muestren segregación mendeliana aún en híbridos interespecíficos (Kijas *et al.*, 1997). A continuación se presentan los criterios de selección y resultados obtenidos en el proceso de validación de los SSRs para ser utilizados en el Programa de mejoramiento de cítricos.

Metodología y Resultados

Los marcadores SSR nucleares fueron seleccionados de la bibliografía de manera que todos los cromosomas del cariotipo de Citrus estén representados. Se estudió la segregación de los mismos utilizando una progenie de 30 individuos provenientes del cruzamiento de Ellendale x Page. Para la extracción de ADN, se utilizó un protocolo estándar y se visualizó en gel de agarosa (1%) coloreado con GoodView II. Los productos de la amplificación se resolvieron mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático. Los electroferogramas resultantes fueron analizados usando el software libre Peak Scanner (Applied Biosystems). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test de X^2 con $p \leq 0,05$.

Los marcadores citoplasmáticos fueron seleccionados de la bibliografía de manera que representen el genoma cloroplástico y mitocondrial.

Se confeccionó una base de datos de información genotípica de 34 variedades, entre las que se incluyen, *C. reticulata*, *C. deliciosa*, *Citrus nobilis*, *C. sinensis*, *C. x limon*, *C. x paradisi*, *P. trifoliata*, *Fortunella*, y varios híbridos interespecíficos.

A continuación se presentarán trabajos que se han realizados para la validación de esta herramienta.

Selección de parentales femeninos para cruzamientos dirigidos: estudio del grado de poliembriónia

Se utilizaron 5 SSR para estimar el nivel de poliembriónia de los híbridos A30 (híbrido de 'Ellendale' x 'M. Común'), M9 y M19 (híbridos de 'Ellendale' x 'Satsuma'). "Ellendale" y "Satsuma" fueron utilizados como controles monoembriónicos y poliembriónicos, respectivamente. Se escogieron tres árboles por genotipo en buenas condiciones fisiológicas y expuestos a libre polinización. Se cosecharon 50 frutas de cada genotipo, se extrajeron todas sus semillas y se sembraron en almacigueras. Luego se seleccionaron 20 plantines al azar de cada genotipo y se extrajo el ADN de los mismos y del genotipo madre. Luego del estudio molecular se observó que todos los individuos de "Satsuma" presentaron la misma configuración alélica que su parental, confirmando su origen poliembriónico. Por otro lado, todos los individuos de la progenie de "Ellendale" estudiados, presentaron algún alelo diferente a los de su progenitor femenino, evidenciando que este genotipo es monoembriónico. En cuanto a los híbridos, la progenie de A30, M9 y M19 mostraron un 15%, 20% y 60% de plantines con la misma configuración alélica que su parental femenino, respectivamente. Los resultados indican que los cuatro marcadores SSR seleccionados (TAA41, TAA15, TAA1, Mest56, CaC15) permiten determinar el nivel de poliembriónia de los genotipos seleccionados. Los genotipos en estudio, aunque con diferencias, pueden ser utilizados como parentales femeninos en el Programas de mejoramiento genéticos, siendo A30 y M9 los que más frecuencia de embriones cigóticos presentan.

Estudio del origen de las variedades "Ellendale" y "Malaquina"

En primer lugar se realizó una matriz representada por la presencia o ausencia de los diferentes alelos de los 16 SSR nucleares utilizados en los materiales en estudio y varios posibles genotipos parentales. Con esta matriz se realizó un análisis de componentes principales mediante el programa GenAlex. En segundo lugar se detectó el parental femenino mediante un análisis con tres marcadores mitocondriales y tres cloroplásticos. Finalmente se analizó visualmente la correspondencia entre los alelos presentes en cada uno de los genotipos seleccionados para identificar los parentales. Los orígenes genéticos de las variedades "Malaquina" y "Ellendale" fueron identificados con éxito. Esta comparación sugiere claramente que ambos genotipos provienen de un cruzamiento entre Mandarina Común (*C. deliciosa*) y Naranja (*C. sinensis*), mostrando que el conjunto de marcadores seleccionados resulta informativo para esta aplicación.

Estudio del origen genético de las semillas encontradas en triploides.

Los genotipos triploides presentan esterilidad gamética e irregularidades meióticas asociadas a niveles de ploidía impar, por lo se espera que no presenten semillas. En las condiciones de la estación experimental INIA Salto Grande, los triploides TDE2 y TDE3 presentan varias semillas por fruto. Con el objetivo de evaluar el origen genético de estas

semillas, se extrajo ADN de las semillas y se hizo el estudio con los marcadores moleculares. Los resultados indican que estos triploides presentan, en la mayoría de los casos, embriones cigóticos. Esto significa que estos triploides tienen capacidad de producir gametos femeninos funcionales y están siendo polinizados por otras variedades.

Evaluación de la diversidad genética de una colección de *P. trifoliata* en Uruguay

Se ha comenzado a trabajar junto a la Facultad de Agronomía en el estudio de la diversidad genética de poblaciones de *P. trifoliata* que hoy se utilizan como portainjertos en Uruguay. Con esto, se espera discriminar genéticamente los diferentes clones que se están utilizando y los que se encuentran en las colecciones vivas de ambas instituciones y realizar un diagnóstico de la diversidad que hoy en día existe en Uruguay.

Conclusión

Actualmente se cuenta con una base de datos de información genotípica de 32 variedades de cítricos, generada con 19 SSR nucleares y 6 SSR citoplasmáticos. Esto nos permite realizar diferentes trabajos vinculados al mejoramiento genético y nos aporta información concluyente para la toma de decisiones.

Bibliografía

DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2012. Encuesta citrícola “primavera 2012”. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado 18 Julio 2014.

Disponible en:

<http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,5,113,O,S,0,6376%3BS%3B1%3B120,>

Grosser J, Gmitter F. 2010. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 104(3): 343-357.

Kijas J, Thomas M, Fowler J, Roose M. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theoretical and Applied Genetics*. 94(5): 701-706.

Tecnologías avanzadas de producción de plantas cítricas.

Rafael Grasso, Roberto Do campo, Fernando Rivas.

Programa Nacional de Investigación en Producción Cítrica. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.

Contacto: rgrasso@inia.org.uy,

1. Introducción.

Debido a disposición legal vigente para la producción de plantas cítricas en Uruguay establece la producción dentro de invernaderos con mallas antiafidos, utilizando semillas certificadas y material de propagación saneado; de esta manera se asegura la calidad sanitaria y genética (Variedades y Portainjertos) de las plantas producidas. Esta transición conlleva importantes cambios en las tecnologías aplicadas, ya que las condiciones climáticas dentro del invernáculo (luminosidad temperatura humedad relativa) difieren de las condiciones de producción a campo; además de dejar de producir en suelo a producir en sustrato dentro de un contenedor. Este sistema de producción posee menor capacidad de amortiguar los cambios, por lo tanto el viverista deber ser capaz de obtener parámetros objetivos para lograr el máximo beneficio de su invernáculo. Mediante las actividades desarrolladas desde INIA se pretende evaluar, adaptar y desarrollar nuevas tecnologías y herramientas para mejorar y homogenizar el proceso de propagación de plantas cítricas. Uno de los aspectos fundamentales en este proceso es el desarrollo de pautas para la selección, caracterización o elaboración de sustratos para la producción de plantas en contenedor. En este sentido, se están desarrollando protocolos de caracterización de diferentes materiales utilizados como sustratos, tanto en propiedades físicas como químicas. Otro aspecto es la elaboración o validación de protocolos de buenas prácticas de multiplicación y producción de plantas cítricas. Se protocolizó la escarificación química de semillas de portainjertos; en la suplementación con luz intermitente en la fase de almacigo en plantines de *Poncirus trifoliata*, y se ensayaron fertilizantes hormonales en la etapa de vivero, obteniéndose resultados promisorios.

Caracterización físico-química de Sustratos.

Un sustrato apropiado para la producción de una especie en particular depende de la adecuada selección de los componentes que conforman el mismo, de la proporción de cada uno de ellos y de las correcciones que se realicen para mejorar sus propiedades físicas y químicas. El conocimiento previo de estas propiedades permite corregir cualquier característica de la mezcla que pueda resultar inapropiada para la producción de plantas. Para el correcto uso de sustratos es necesaria su caracterización física, química y biológica, y el estudio crítico de sus propiedades comparándolas con las del sustrato "ideal" (Abad et al., 1993).

A continuación se resumen las propiedades físicas (Tabla 1) y químicas (Tabla 2) de diferentes materiales disponibles para la elaboración de sustratos y su impacto sobre las variables de crecimiento de plantines (Tabla 3) de *Poncirus trifoliata* (CT33).

Tabla 1. Parámetros físicos de diferentes sustratos utilizados para la producción de plantas cítricas.

Sustrato	Agua fácilmente disponible (% vol.)	Agua reserva (% vol.)	Porosidad total (% vol.)	Espacio de aireación (% vol.)	Densidad aparente (g/cm ³)
INIA SG	27,3 a	3,3 c	63,4 b	13,0 ab	0,50b
Turba + perlita (20%)	26,0 ab	10,2 a	79,8 a	6,6 b	0,14c
Corteza de pino	7,1 d	2,2 d	71,4 ab	16,7 a	0,22c
Abono + c. arroz	17,6 bc	4,4 b	75,7 a	14,1 ab	0,42b
Sustrato comercial	8,3 cd	2,9 cd	72,1 ab	7,3 ab	0,71 a

Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas; Test de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla 2. Parámetros químicos de diferentes sustratos utilizados para la producción de plantas cítricas.

Sustrato	CE (mS/cm)	pH	N-NO ₃ (mg/l)	P (mg/l)	K (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)
INIA SG	0,17	6	8	0,1	83	176	31
Turba + perlita (20%)	1,03	8	132	8,8	3	232	18
Corteza de pino	0,59	4	108	2,1	33	25	18
Abono + cáscara de arroz	1,94	6	490	11,4	201	272	84
Sustrato comercial	8	7	839	16,6	1085	806	303

Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas; Test de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla 3. Efecto de los diferentes sustratos sobre el crecimiento de plantines de *P. trifoliata* (CT33).

Sustrato	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Peso seco copa (g)	Peso seco raíz (g)	Copa/raíz
INIA SG	96,9 a	6,7 a	9,6 a	3,2 a	2,9 a
Turba + perlita (20%)	64,3 d	5,1 c	4,6 c	2,2 bc	2,0 b
Corteza de pino	68,2 cd	5,5 bc	4,6c	2,2 c	2,1 b
Abono + C. arroz	87,7 ab	6,3 a	7,9 b	2,7 b	3,0 a
Sustrato comercial	78,2 bc	5,9 b	7,0 b	2,0 c	3,3 a

Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas; Test de Tukey ($p < 0,05$).

Escarificación química de semillas de *P. trifoliata* y su efecto sobre la germinación.

La eliminación de la cobertura (testa) de la semilla mediante escarificación química, previo a la siembra, facilita la emergencia de la raíz y acelera la germinación de manera uniforme.

La siembra tradicional no contempla la remoción de este tegumento que actúa como barrera física. Esto lleva a que el inicio de la germinación resulte demorado y que los plantines emerjan en un lapso de tiempo amplio, provocando falta de uniformidad en el tamaño de los mismos.

Tabla 4. Efecto de la escarificación química de semillas sobre la germinación de *P. trifoliata* (CT33).

Tratamiento	Días después de la siembra					
	4	8	13	18	25	30
Testigo	0,7 c	19,3 c	35,5 b	53 b	70,2 b	90 b
Escarificación en frío	24 a	72,8 a	82,4 a	88,8 a	96,8 a	97 a
Escarificación con calor	8,8 b	39,2 b	78,4 a	93,6 a	95,2 a	95 a

Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas; Test de Tukey ($p < 0,05$).

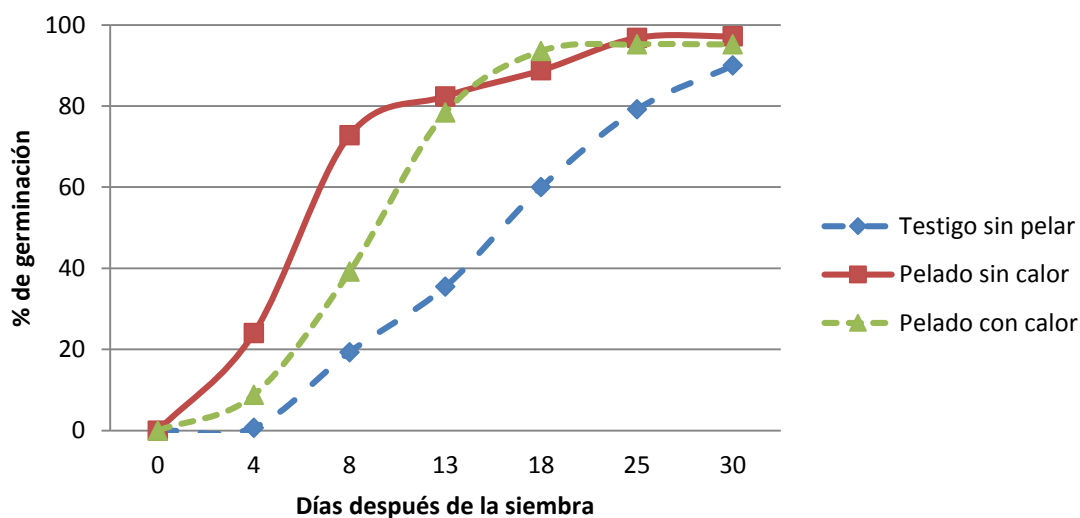


Figura 1. Efecto de la escarificación química (con y sin calor) de semillas sobre la velocidad de germinación y germinación final de *P. trifoliata* (CT33).

Efecto de la aplicación de luz artificial intermitente sobre la calidad de los plantines de *P. trifoliata*

Durante el invierno los portainjertos trifoliados disminuyen su ritmo crecimiento. Uno de los factores que afecta su desarrollo es la disminución del fotoperiodo. De esta manera se

sometieron plantines de trifolio a dos condiciones de luminosidad: 1) Interrupción de la noche de 02:00 a 03:00 AM más tratamiento con y sin escarificación; 2) Aumento del fotoperiodo de 05:00 a 08:30 AM con y sin escarificación y 3) Testigo sin luz artificial, con y sin escarificación. La lámpara que se utilizó fue de bajo consumo marca PHILIPS, luz suave cálida de 15 W a una altura de 50 cm sobre el plantín y distanciadas 1 m entre lámparas.

Los resultados se presentan a continuación:

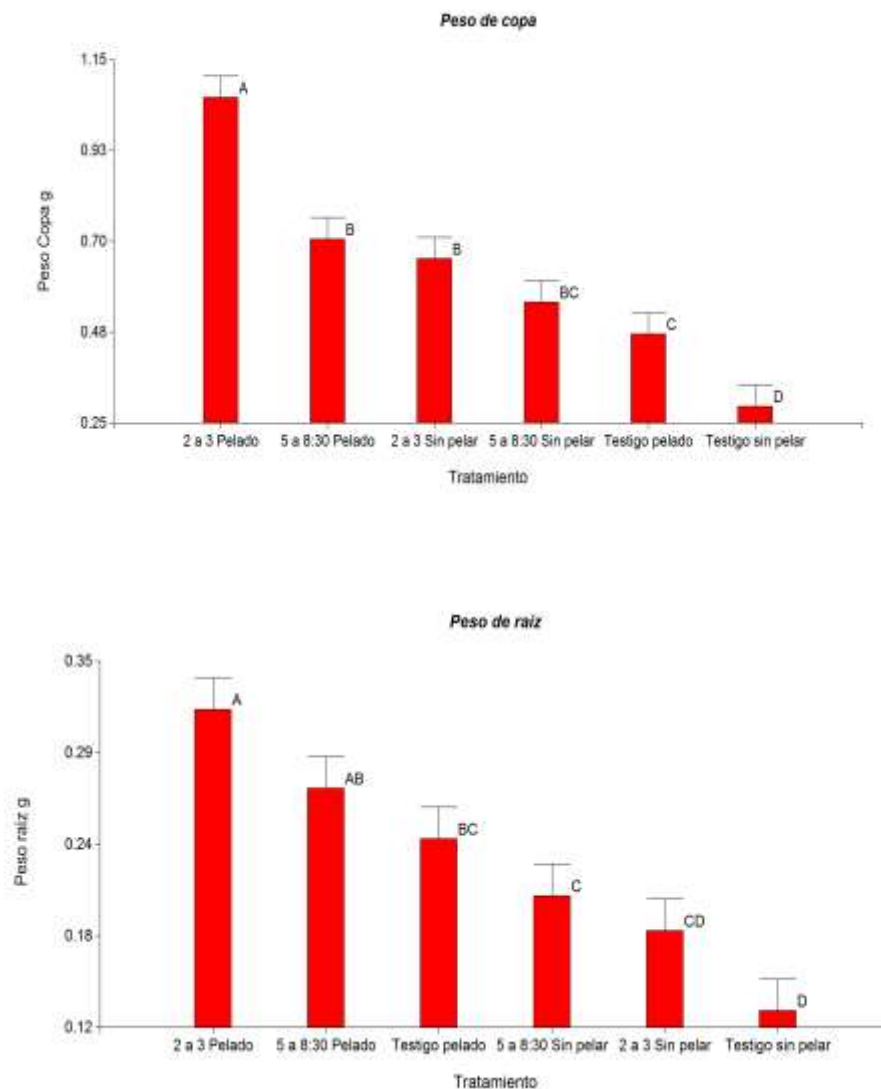


Figura 2. Efecto de diferentes regímenes de iluminación artificial sobre el crecimiento de plantines de *P. trifoliata* a los 160 días después de la siembra. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas; Test de Tukey ($p < 0,05$).

Efecto de la aplicación de fertilizantes hormonales sobre el crecimiento de portainjertos cítricos

Las nuevas tecnologías de fertilizantes líquidos proponen mezclas de sales solubles con complejos hormonales en este caso Citoquininas, Auxinas y Giberelinas más nitrógeno magnesio y calcio. Para determinar la dosis adecuada a ser utilizada en portainjertos cítricos se plantearon 4 dosis de 2; 2,5; 3,0; 3,5 ml/maceta repetidos cada 15 d.

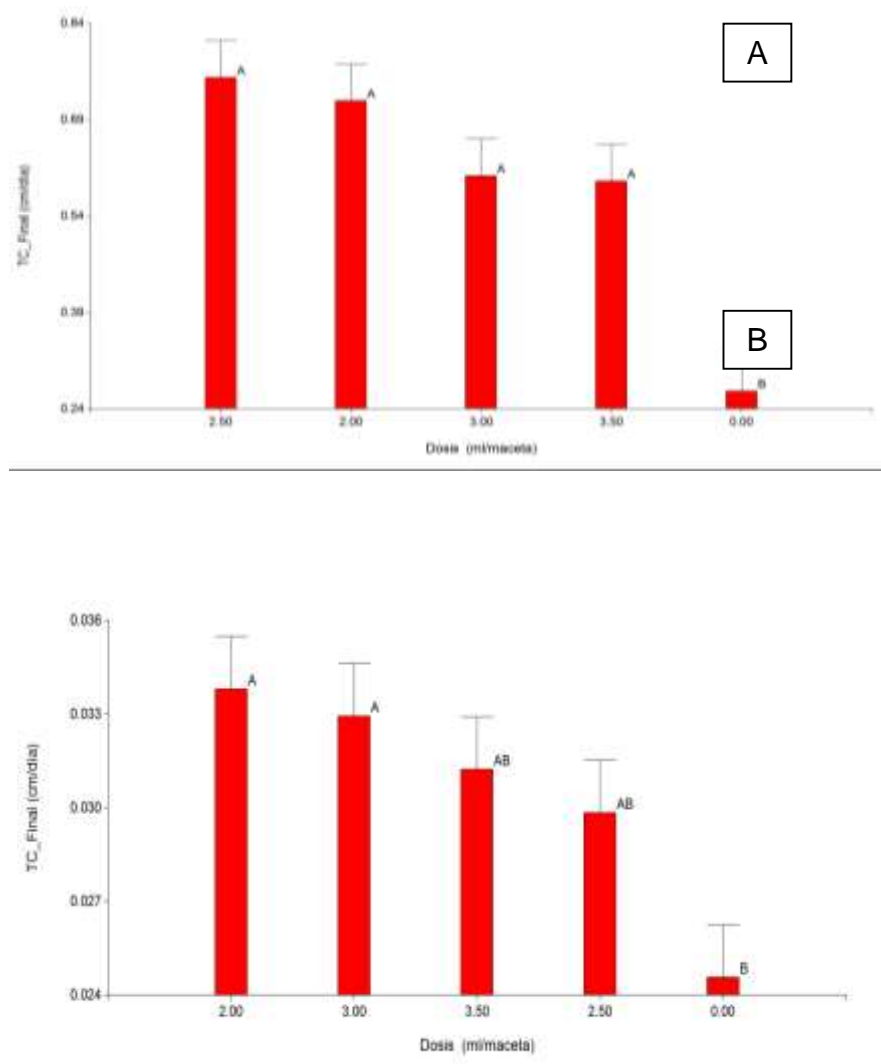


Figura 3. Tasa de crecimiento en altura (A) y diámetro de plantín (B) de *P. trifoliata* (CT33) con diferentes dosis de fertilizante hormonal repetidas cada 15 d. Letras diferentes entre tratamientos representan diferencias significativas; Test de Tukey ($p < 0,05$).

Bibliografía

Abad, M.; Martínez, M.D.; Martínez, P.F.; Martínez, J.1993. Evaluación agronómica de los sustratos de cultivo. Actas de Horticultura, 11: 141-154.

Valenzuela, O.R.; 2009. Caracterización y evaluación agronómica de materiales regionales usados en la formulación de sustratos para plantas. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario. 153p.

Estrategias para la producción de frutos sin semillas en mandarina 'Afourer'.

Alvaro Otero, Fernando Rivas

Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola, INIA Salto Grande. Camino al Terrible s/n. Salto. Uruguay. aotero@inia.org.uy; cfrivas@inia.org.uy

Introducción

El número de semillas en los frutos del género Citrus y sus híbridos varía ampliamente, incluso en los cultivares comerciales (Vardi et al. 2008). El tangor 'Afourer' es un cultivar de alta calidad de fruta, con muy buena adaptación a las condiciones agroecológicas de Uruguay; por otro lado es un cultivar que con frecuencia produce semillas en condiciones de polinización abierta. La reducción del número de frutos con semillas o la disminución de semillas en el fruto, se ha buscado fundamentalmente a través de tres técnicas: a) la instalación de plantaciones de 'Afourer' asiladas o a distancias importantes de variedades potencialmente dadoras de polen (Chao et al. 2005); b) la utilización de mallas que cubran en su totalidad la planta impidiendo la entrada de insectos polinizadores o la aplicación de repelentes de abejas y similares y c) la utilización de reguladores del crecimiento o sulfato de cobre, con el propósito de acelerar el desarrollo del óvulo, impidiendo la fecundación o por la inhibición directa de la germinación del grano de polen (Mesejo et al. 2006, 2008). La estrategia de estos trabajos fue de evaluar la distribución espacial de frutos con semillas en 'Afourer'; determinar el efecto de las mallas en la producción de semillas y en el rendimiento; evaluar las aplicaciones químicas que permiten reducir la cantidad de frutos con semilla y las técnicas de manejo para incrementar en cuajado de los frutos en condiciones de aislamiento por mallas. También se presentan los resultados de la determinación del número mínimo de frutos que se deben muestrear en Afourer para estimar el número de semillas por fruto.

Estrategia 1. Distribución espacial del número de frutos con semilla. La distribución espacial de los árboles, teniendo en cuenta el porcentaje de frutos con al menos una semilla, presentó una distribución agregada en las 4.4 ha evaluadas. Las plantas con mayor porcentaje de frutos con semillas estaban geográficamente más cercanas al cuadro de mandarina Murcott, y disminuía el porcentaje de frutos con semillas a medida que se alejaban en distancia de ese cuadro de producción (Figura 1). El rango efectivo fue de 210 m, estimado a través del variograma del porcentaje de frutos con semillas en los árboles y la distancia entre ellos.

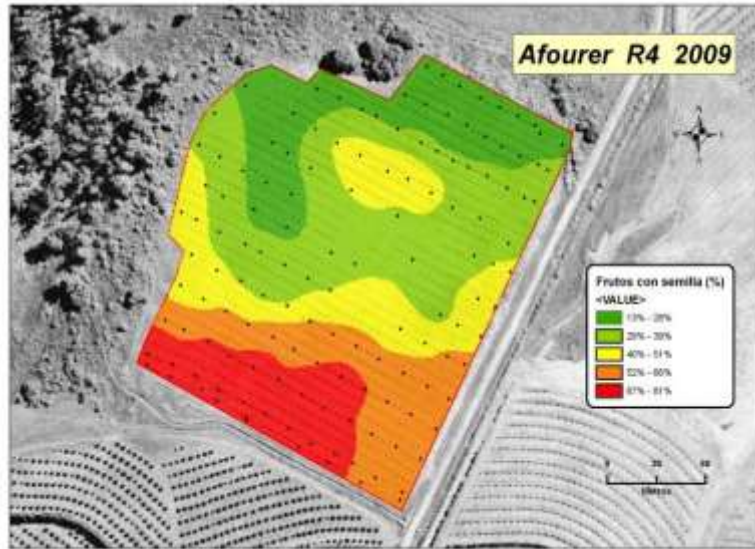


Figura 1. Distribución espacial de las plantas muestreadas (puntos negros) y distribución del porcentaje de frutos con semillas.

Estrategia 2. Efecto de la polinización entomófila en la producción de semilla. El cubrimiento de las plantas con las mallas redujo significativamente el número de frutos con semillas en las plantas bajo las mallas respecto a las plantas de polinización abierta (Figura 2). Las mallas aumentaron la temperatura del aire bajo las mismas. La caída de flores y estructuras florales fue significativamente mayor en las plantas bajo las mallas, al mismo tiempo fue menor la retención de frutitos en los árboles bajo malla. Como consecuencia de esto el número de frutos cosechados por árbol fue significativamente inferior en las plantas bajo las mallas (Figura 3).

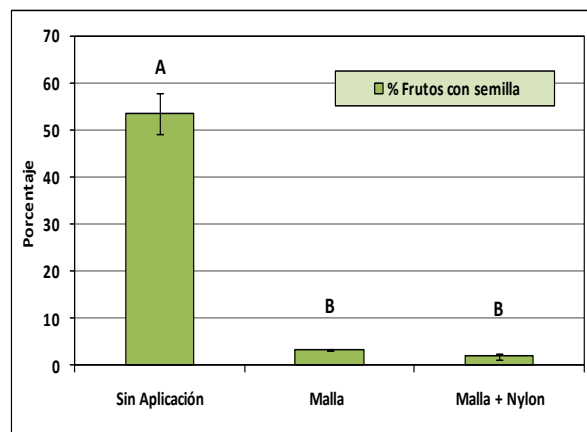


Figura 2. Efecto de la malla en el porcentaje de frutos con semillas. Las columnas seguidas de diferente letra son significativamente distintas ($p < 0.05$), TRM Duncan.

Estrategia 3. Medidas mitigantes del número de semillas en los frutos. La aplicación de AG₃ (25 y 50 ppm) y de CuSO₄ (50 ppm), individualmente o combinados, redujeron significativamente el porcentaje de frutos con semilla en los árboles evaluados. Las aplicaciones consecutivas de CuSO₄ a 25 ppm no difirieron significativamente del testigo sin tratar (Figura 4). Se puede evidenciar un efecto directo de la dosis de AG₃; dosis de 50 ppm redujo el número de frutos con semilla respecto a las dosis de 25 ppm. Se pudo evidenciar una interacción positiva en la reducción del número de frutos con semillas cuando se combinaba la aplicación de AG₃ con las aplicaciones de CuSO₄. El promedio de semillas por fruto varió desde 2.8 a 3.9 en todos los tratamientos.

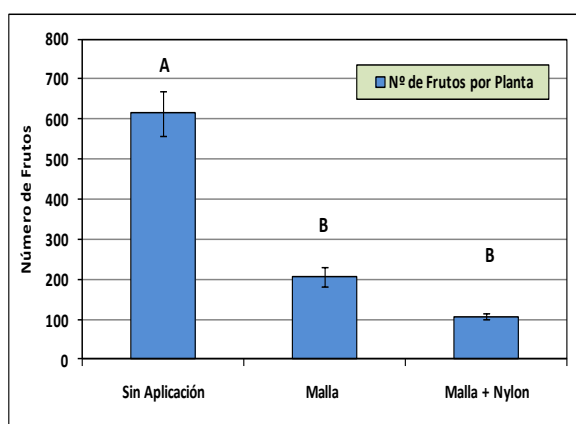


Figura 3. Efecto de la malla en el número de frutos por planta. Las columnas seguidas de diferente letra son significativamente distintas ($p < 0.05$), TRM Duncan.

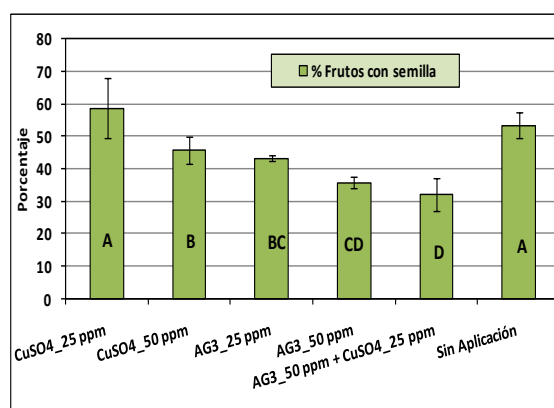


Figura 4. Efecto de las aplicaciones de sulfato de cobre y ácido Giberélico en el porcentaje de frutos con semilla por árbol. Las columnas seguidas de diferente letra son significativamente distintas ($p < 0.05$), TRM Duncan.

Estrategia 4. Medidas mitigantes de la reducción del número de frutos en plantas bajo mallas. Por tercer año consecutivo, los árboles bajo mallas tuvieron menor cantidad de frutos que los árboles en la intemperie (Figura 5). El aumento de la temperatura del aire y la disminución de la humedad relativa (hasta 15-20%) podrían ser causa de la caída de estructuras florales y pequeños frutitos. Por otro lado, cuando bajo las mallas, se realiza la aplicación de AG₃ (40 ppm) foliar en plena flor abierta, la caída de frutos disminuyó drásticamente, comparándose el número de frutos con los obtenidos en las plantas a la intemperie (Figura 6). Si bien el número de frutos en las plantas anilladas fue significativamente mayor que las no anilladas, comparativamente fue significativamente menor que el número de frutos a la intemperie (Figura 6). Se pudo evidenciar también la reducción del tamaño del fruto promedio por el efecto de las mallas y una relación directa entre el número de semillas y el peso del fruto ($r^2 = 0.89$), para las plantas en la intemperie ($n = 528$ frutos) (datos no mostrados).

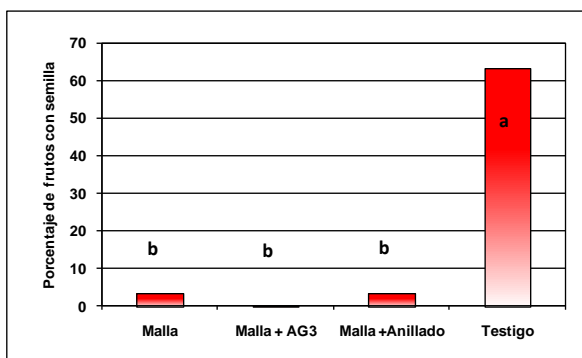


Figura 5. Efecto de las mallas en el porcentaje de frutos con semillas en Afourer. 2010-2011. Medias de los tratamientos con similar letra no son significativamente distintas por el TRM Duncan ($p < 0.01$).

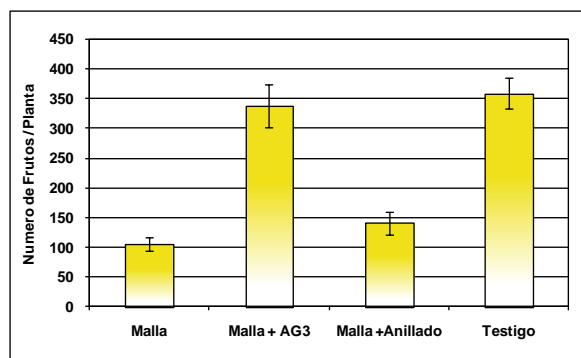


Figura 6. Efecto del anillado y la aplicación de ácido giberélico en el número de frutos por árbol bajo malla e intemperie para Afourer. 2010-2011. Barras representan el desvío de la media de los árboles ($n=5$).

Estrategia 5. Tamaño de muestra para determinar el número de semillas por fruto en cuadros comerciales de Afourer. El número de semillas promedio en los frutos de Afourer varía no solo entre los cuadros comerciales sino también entre los años. Existe una relación directa entre el porcentaje de frutos sin semillas en la muestra con el número de semillas promedio por fruto. A medida que aumenta el porcentaje de frutos sin semillas se reduce el número promedio de semillas por fruto. El número óptimo de frutos a muestrear va a depender no solo del intervalo de confianza de la media de la muestra aceptado y de la precisión buscada, sino también de la media (número de semillas por fruto) de ese cuadro y año, así como de k . El número de frutos a muestrear en el cuadro de producción aumenta en relación con la precisión buscada (error relativo respecto a la media) y con la cantidad media de semillas por fruto presente (Figura 6). De esta forma con valores medios esperados de semillas por fruto menores a 1 semilla se necesitarían muestrear 150 frutos; entre 2 y 3 semillas necesitaríamos muestrear 100 frutos por cuadro para una precisión de la media del 25%; mientras que para valores esperados de la media de semillas por fruto superiores a 4 necesitaríamos muestrear 50 frutos por cuadro para tener la misma precisión.

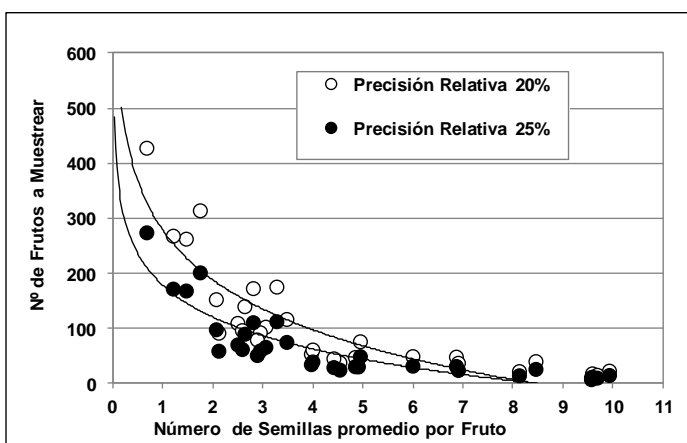


Figura 5. Número de frutos a muestrear por cuadro en función del promedio esperado de semillas por fruto y a la precisión buscada. En este caso para un intervalo de confianza del 95% del valor de la media y para un error relativo del 20 y 25% de la media.

Conclusiones

La instalación de cuadros de producción cercanos a otros cuadros con cultivares potencialmente dadores de polen, incrementa la producción de semillas en los árboles y esta disminuyen a medida que nos alejamos de la fuente de polen. Si tenemos en cuenta que el rango efectivo estimado es de 210 m para el porcentaje de frutos con al menos una semilla, podemos proponer que una distancia segura mínima de 250 m entre plantas para cercanas para que no haya interferencia de polinización cruzada. La auto compatibilidad en 'Afourer' no es un componente importante en la presencia de semillas en los frutos. Por otro lado, la presencia de mallas recubriendo las plantas reduce la cantidad de frutos con semilla pero también reduce el número de frutos en el árbol y en consecuencia el rendimiento. Una única aplicación de AG₃ reduce significativamente el número de frutos con semilla y si se le adiciona CuSO₄ (varias aplicaciones) la reducción es aún mayor. El efecto adverso de las mallas en la caída de estructuras fructíferas, puede ser evitado por aplicaciones foliares en plena flor de ácido giberélico. Si bien desde el punto de vista biológico podemos incorporar herramientas que reduzcan significativamente la presencia de semillas en el fruto, debemos considerar también el costo económico de éstas técnicas.

Bibliografía.

Agustí, M., S. Zaragoza, L. Bleiholder, H. Buhr, H. Hack, R. Klose, R. Staub. 1997. Adaptation de l'échelle BBCH a` la description des stades phénologiques des agrumes de genre Citrus, Fruits 52: 287–295.

Chao, C.; J. Fang; y P. S. Devanand. 2005. Long distance pollen flow in mandarin orchards determined by AFLP markers –Implications for seedless mandarin production. J. Am. Soc. Hort. Sci. 130(3):374-380.

Mesejo, C., A. Martínez-Fuentes, C. Reig, F. Rivas, M. Agustí. 2006. The inhibitory effect of CuSO₄ on Citrus pollen germination and pollen tube growth and its application for the production of seedless fruit. Plant Sci. 170:37–43.

Mesejo, C., A. Martínez-Fuentes, C. Reig, M. Agustí. 2008. Gibberellic acid impairs fertilization in Clementine mandarin under cross-pollination conditions. Plant Science 175: 267–271.

Vardi, A.; I. Levin y N. Carmi. 2008. Induction of Seedlessness in Citrus: From Classical Techniques to Emerging. Biotechnological Approaches. J. Am. Soc. Hort. Sci. 133(1):117–126.

Efecto del anegamiento y la temperatura del suelo sobre la respuesta fisiológica de los portainjertos usados en el Uruguay.

Alvaro Otero, Carmen Goñi*

Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay. aotero@sg.inia.org.uy; (*) Actualmente en retiro jubilatorio

Objetivo.

Determinar la respuesta fisiológica a la temperatura y al anegamiento del suelo en los portainjertos más usados en la citricultura uruguaya y explorar el efecto de la copa en los cambios fisiológicos manifestados.

La hipótesis a probar es si la interacción de las condiciones de temperatura y anegamiento del suelo inciden en forma distinta en el comportamiento fisiológico observado en estos portainjertos.

Estrategia.

Se diseñaron e implementaron 4 grupos de experimentos bajo invernáculo, algunos de los cuales se realizaron 2 o 3 veces para comprobar su repetibilidad.

- Interacción del anegamiento y la temperatura del suelo (15⁰ C, 25⁰ C y 35⁰ C) en Citrange Carrizo, Troyer y Trifolia (CT33).
- Interacción del anegamiento y la temperatura del suelo (15⁰ C, 25⁰ C y 35⁰ C) en *Poncirus trifoliata*: Pomeroy, Tucumán y Rubidoux.
- Tolerancia al anegamiento con temperatura del suelo constante (25⁰C) en Citrange Carrizo, Citrumelo, CT33, Rubidoux, Troyer y Tucumán.
- Tolerancia al anegamiento en combinaciones de copa y portainjerto: naranja navel Fukumoto, naranja Salustiana y mandarina satsuma Okitsu, injertadas sobre Citrange Carrizo y Trifolia (CT33).

Materiales y Métodos (Resumen del método base de los experimentos):

Se seleccionaron plantas de portainjertos cítricos de 11-12 meses de edad; de portainjertos emparentados genéticamente pero con diferente comportamiento durante el invierno e inicio de primavera, respecto a la brotación, madurez de la fruta y calidad, tamaño de la canopia, etc.

Se trabajó en condiciones controladas de invernáculo definiéndose tres niveles de temperatura del suelo (15⁰ C, 25⁰ C y 35⁰ C) y dos condiciones de oxigenación del mismo: condiciones normales y condiciones de restricción de O₂ en el suelo por medio del anegamiento. Cada tratamiento estuvo compuesto de nueve plantas para cada portainjerto (3 plantas/parcela con 3 repeticiones)

Los tratamientos de temperatura del suelo se realizaron poniendo las macetas en recipientes más grandes, bandejas (1 x 2 m), donde por pasaje de agua caliente en tuberías finas de cobre en el suelo, se calentaban hasta la temperatura deseada (previo calibrado del

método). Para condiciones de temperatura más bajas de la ambiental se hizo circular una corriente de agua fría, que por transmisión de energía bajaba la temperatura del suelo. El prendido y apagado del sistema fue automáticamente regulado por sensores de temperatura en la zona radicular de las plantas

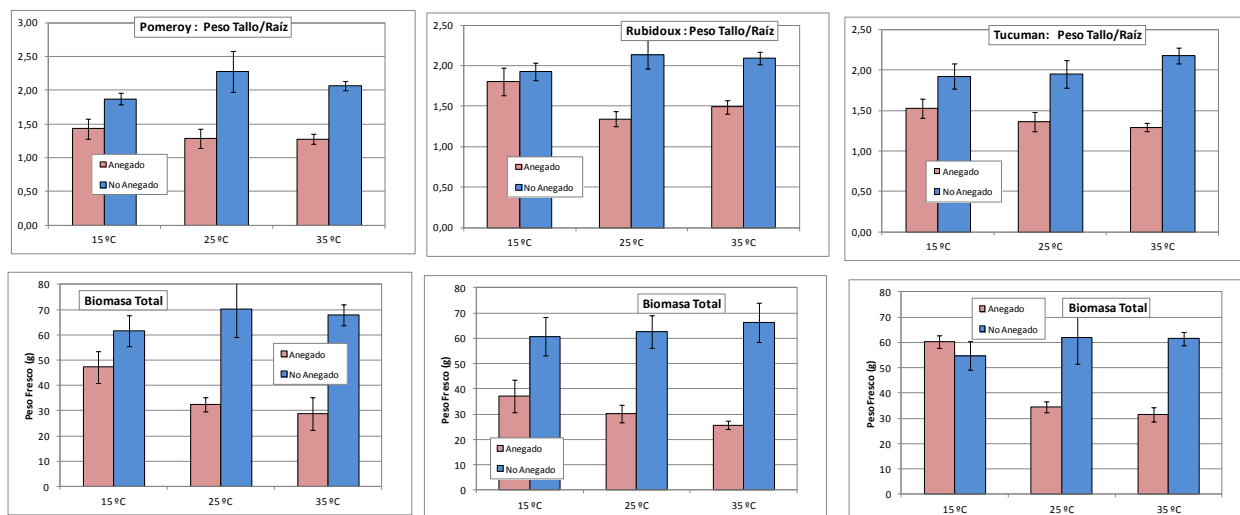
Los tratamientos de anegamiento se realizarán anegando las macetas hasta saturación y manteniendo el nivel del agua en forma constante, 2-3 cm sobre la superficie del suelo.

Resultados y Discusión (Resumen):

I. Anoxia radicular y su interrelación, con la temperatura del suelo (15°C, 25° y 35°C) en trifolias Pomeroy, Tucumán y Rubidoux.

Biomasa al final del experimento.

Figura 1. Biomasa de los tres portainjertos: peso fresco (g) y relación peso tallo/peso raíz al final de los tratamientos. Barras corresponden al error estándar de la media. 18 plantas. 3 repeticiones por tratamiento.



Todos los portainjertos evaluados en condiciones de anegamiento mostraron reducciones significativas en la eficiencia de la fotosíntesis evaluada a través del intercambio gaseoso y del PSII, presentando rápidas y drásticas reducciones en la asimilación del A_{CO_2} , por cierre de los estomas (menor G_s) y limitantes de la fotosíntesis a nivel del mesófilo de la hoja (mayor relación C_i/C_a). La reducción de la fotosíntesis fue el parámetro más sensible a la anoxia y a la temperatura del suelo, a los 4 días de comenzado el experimento, estos parámetros ya fueron afectados significativamente por los factores ambientales.

Por otro lado, la temperatura del suelo por si sola y su interacción con el anegamiento ha jugado también un papel muy importante y significativo en el desempeño fisiológico de estos portainjertos.

También es de destacar la interacción del anegamiento con la temperatura; en condiciones de anegamiento, la velocidad de la reducción de los parámetros de la fotosíntesis, como una expresión del daño de todo el sistema de producción de carbohidratos, aumenta a medida que aumenta la temperatura del suelo.

En la práctica a nivel de campo y particularmente en el área del litoral norte, es posible sugerir que no es lo mismo tener anegamiento del suelo en pleno verano, que tenerlo en invierno con temperaturas más bajas del suelo. En verano el daño, temporal o permanente, se instalaría más rápidamente en los genotipos estudiados.

A los pocos días de instalada la anoxia, el potencial xilemático fue menor en los portainjertos anegados, pero decrecía más en relación a la temperatura. Las plantas a 35°C estaban más deshidratadas, que las plantas a 25°C y a su vez que a 15°C.

Existe una reducción importante en el crecimiento bajo anegamiento en los Trifolias. Tucumán y Rubidoux mostraron un crecimiento más estable en condiciones sin anegamiento para las tres temperaturas del suelo, mientras que Pomeroy presentó reducciones significativas del crecimiento a temperaturas bajas (15°C). El crecimiento de Tucumán a temperaturas bajas, no fue afectado por el anegamiento.

II. Anoxia radicular por anegamiento en combinaciones de portainjertos y copas de plantas de cítricos.

Determinar la respuesta fisiológica de tres cultivares cítricos (Fukumoto, Okitsu y Salustiana) al anegamiento del suelo en los dos portainjertos (Carrizo y *P. trifoliata*) más usados en la citricultura uruguaya. Se evaluó la interacción de la copa (tipo de cultivar) y el portainjerto en el comportamiento fisiológico sobre la tolerancia al anegamiento del suelo y se especuló sobre si este comportamiento es distinto a la evaluación del portainjerto sin el injerto de la copa.

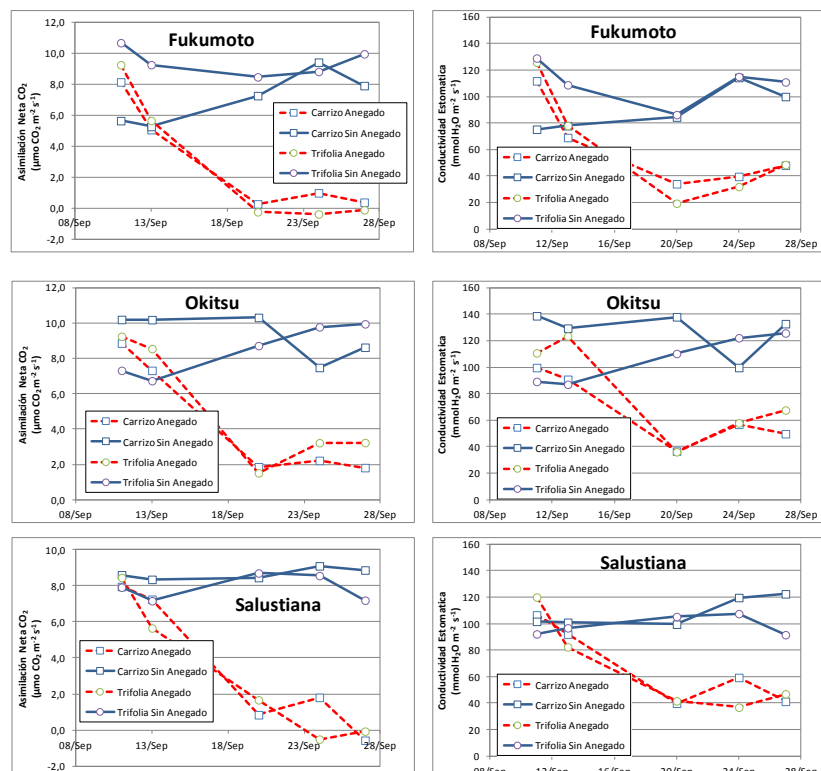


Figura 2. Evolución de la asimilación neta de CO₂ y conductividad estomática de la hoja de las plantas cítricas.

A los 15 días de instalado el experimento, el potencial xilemático de la hoja fue significativamente distinto entre plantas anegadas y no anegadas. La deshidratación de las hojas, evidenciada por la reducción del potencial xilemático, fue mayor en plantas anegadas. Esta diferencia es muy marcada en Salustiana, seguida de Okitsu y menos en Fukumoto. Además de la respuesta diferencial entre las variedades de la copa, no se encontraron efectos significativos entre los portainjertos en Okitsu y Salustiana; pero en el caso de las plantas injertadas con Fukumoto, estas fueron más tolerantes al anegamiento cuando estaban injertadas en Carrizo en comparación con Trifolia, evidenciado por las diferencias en el potencial hídrico de la hoja.

Es de destacar la velocidad de la deshidratación de las hojas de los cultivares, en poco más de 8 días desde que se instaló la falta de oxígeno en el suelo, los valores de las plantas bajo anoxia llegaron a ser críticos, hasta valores de no recuperación de la hidratación de las hojas y en consecuencia de muerte del tejido foliar. Este fenómeno es llamativo, en comparación con la velocidad de deshidratación de las hojas de los portainjertos; sin injerto de ninguna copa los portainjertos podían llegar a mantener el estado hídrico de la hoja por mayor tiempo.

De acuerdo a la velocidad de reducción de los parámetros de la fotosíntesis y en comparación con los experimentos del comportamiento de los portainjertos sin injerto de copa, podemos decir que la copa juega un papel muy importante en la tolerancia a la anoxia. Las plantas injertadas manifiestan más rápidamente los síntomas provocados por la anoxia, que los portainjertos solos. Muy pocos días de anegamiento dañan temporal o permanentemente el sistema fotosintético y deshidratan la planta injertada.

Conclusiones.

- Breves períodos de anegamiento en las macetas afectan el crecimiento de los portainjertos, en especial con temperaturas medias (25°C) y altas (35°C).
- La mejor temperatura para el crecimiento de los portainjertos en macetas es 25°C, temperaturas mayores o menores producen reducción del crecimiento final.
- No se encontraron diferencias importantes entre los trifolios respecto a su resistencia al anegamiento. A bajas temperaturas el trifolio Tucumán es más resistente al anegamiento que los demás trifolios.
- Carrizo es más resistente que Toyer y los trifolios a temperaturas medias (25°C) en la maceta.
- Luego de injertados los portainjertos no se encontró diferencias importantes entre ellos, sí lo hubo entre las copas. Carrizo tiene un mejor desempeño que trifoio cuando esta injertado por Fukumoto.

Bibliografía

- Barry, G.H., W.S. Castel y F.S. Davies.** 2004. Rootstocks and plant water relations affect sugar accumulation of citrus fruit via osmotic adjustment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129(6):881-889.
- Poel, L.W.** (1960). The estimation of oxygen diffusion rate in soils. *Journal of Ecology.* 48 (1) 165-173.
- Scholander, P.F., H.T. Hammel, E.D. Bradstreet, y E.A. Hemmingsen.** 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148:339-346.
- van Kooten, O y J.F.H. Snel.** 1990. The use of fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosyn. Res.* 25:147-150

Diagnóstico nutricional y Fertirriego: una propuesta dentro de los sistemas de producción intensivos en cítricos.

Alvaro Otero, Rafael Grasso, Fernando Rivas, Carmen Goñi *

Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay. aotero@inia.org.uy ; rgrasso@inia.org.uy; cfrivas@inia.org.uy (*) Actualmente en retiro jubilatorio.

Introducción.

Aumentar la productividad y sostenibilidad de la producción citrícola es un objetivo priorizado reiteradamente dentro de la citricultura de exportación en Uruguay. En la actualidad, la brecha existente en los rendimientos de las plantaciones cítricas podría disminuirse con la incorporación de nuevas tecnologías de manejo que combinen sistemas de alta densidad con portainjertos semi-enanizantes, con restricción y manejo del sistema radicular; y el fertirriego como el componente principal que habilita el control de todo el sistema. La incorporación de variedades cítricas de alto valor comercial, muchas de ellas bajo patente comercial, forma parte de los nuevos sistemas de producción de cítricos.

Tradicionalmente se piensa en el fertirriego solamente como una herramienta para mejorar la eficiencia de la aplicación de los nutrientes a la planta, para la reducción en los costos de aplicación de los fertilizantes, para la disminución de la contaminación (nitratos y fosfatos) o para la reducción de mano de obra.

Las nuevas tecnologías en los sistemas de plantación de alta densidad incluyen al fertirriego dentro de un paquete integrado de medidas de manejo, la razón principal es que el fertirriego posibilita un mayor control del agua alrededor del sistema radicular y de los nutrientes; y en consecuencia permite intensificar e inducir algunos de los procesos fisiológicos más importantes de la planta, relacionados con las brotaciones, la floración, el cuajado y la calidad de la fruta. Asociada a esta propuesta de manejo, se encuentran los nuevos sistemas avanzados de producción (ACPS, *Advanced Citrus Production System*) desarrollados en USA y los sistemas de hidroponía abierta (OHS, *Open Hydroponic System* desarrollados inicialmente en España.

Estas opciones tecnológicas de vanguardia adoptadas en los últimos años en otros países (Shumman *et al*, 2009; Stover *et al*, 2008 y Martínez-Valero, 2004) no han sido investigadas en un régimen climático como el de Uruguay, con precipitaciones altamente variables entre años y entre estaciones. La escasez de mano de obra, la facilidad de acceso a sistemas de riego-fertirriego automatizados, la disponibilidad de diferentes opciones tecnológicas de las nuevas fuentes de fertilizantes, junto con la necesidad imperiosa de reducir el tiempo de retorno del capital invertido y, entre otras razones, por la apertura del mercado de Estados Unidos para los cítricos, ofrecen una coyuntura inmejorable para validar estos sistemas de fertirriego en nuestras condiciones.

Estos sistemas de plantación están diseñados con el objetivo de lograr un incremento muy importante en la precocidad de los montes citrícolas, con altos y rápidos retornos del capital invertido, en ciclos productivos no mayores a los 12 años. A pesar de todas las ventajas de estos nuevos sistemas, ellos presentan también ciertas desventajas, pues requieren un mayor volumen de agua disponible y una infraestructura específica, inicialmente más costosa (tanques, inyectores, sensores varios, fuentes de fertilizantes específicas). Se requiere a su vez, que el **sistema de riego esté diseñado y funcione en óptimas condiciones.**

INIA-Salto Grande ha implementado un área experimental de fertirriego especialmente diseñada para lograr estos objetivos; que está integrada con una plataforma de fertirriego computarizada y automatizada que permite el control individual de los tratamientos.

Vista de la plantación en diciembre 2012 y aspecto general de la misma en mayo del 2013.



La estrategia experimental incluye tres objetivos: a) determinar la mejor frecuencia para realizar el fertirriego y la forma más adecuada de aplicación de los nutrientes para el régimen pluviométrico de UY y las características de los suelos existentes en la región cítrica de Salto; b) generar índices de suelo y de planta que expliquen y corroboren los resultados obtenidos, a los efectos de monitorizar con mayor frecuencia el estado nutricional del cultivo; y c) evaluar la productividad y recuperación del capital de sistemas de alta densidad de plantas con restricción del sistema radicular y portainjertos semienajantes.

Objetivo estratégico 1. En INIA-Salto Grande se instalaron dos ensayos contiguos: a) en uno se investigan los efectos de tres frecuencias de fertirriego, donde se aplica la misma dosis de agua y nutrientes en base semanal, pero fraccionada en aplicaciones con frecuencia: diaria, cada tres días y semanal; b) en el otro ensayo, se comparan tres sistemas de fertilización bajo condiciones óptimas de riego: i) fertilización en cobertura, con los fertilizantes clásicos de las propuestas tecnológicas actuales en Uruguay, ii) fertilización en cobertura, pero con fuentes de liberación lenta (particularmente Nitrógeno) y iii) fertirriego con una frecuencia de aplicación de los nutrientes cada 3 días. Los tratamientos de ambos ensayos reciben el mismo volumen de agua y similar dosis de macro y micronutrientes en base semanal. Asociado a este objetivo se encuentra la evaluación de nuevas tecnologías de fertilizantes disponibles en Uruguay, relacionadas al nitrógeno, y potasio fundamentalmente.

Objetivo estratégico 2. Involucra la generación de índices de nutrientes de suelo y de planta que expliquen y corroboren los resultados obtenidos. Estos indicadores buscan mejorar el monitoreo de las plantas y del suelo, especialmente pretendiendo prever el estado nutricional de las plantas desde la floración hasta el período convencional de muestreo (marzo-abril), permitiendo realizar correcciones nutricionales a lo largo del ciclo productivo, mejorando la calidad de la fruta y manteniendo un alto potencial productivo del árbol en el tiempo.

Objetivo estratégico 3. Involucra dos ensayos en INIA SG, a) la evaluación de sistemas de alta densidad (5,5 x 2,5 m y 2,8 x 1,5) con tres portainjertos (Carrizo, Trifolia y 79AC) y b) la comparación de tres sistemas de plantación: acamellonado, acamellonado con cubierta del suelo y sin acamellonado, en dos densidades de plantación (5,5 x 2 m y 5,5 x 1,5 m), todos los tratamientos con el portainjerto 79AC. Los dos ensayos van con sistemas de fertirriego, para frecuencias de aplicación diaria.

Resultados Objetivo estratégico 1. La información resultante de los dos primeros años desde su implantación nos demuestran el potencial que tiene esta tecnología: se ha logrado un rápido crecimiento con una alta precocidad de las plantas. En la producción de la primera flor (17 meses luego de la plantación) se han obtenido rendimientos equivalentes a 2900 kg/ha con 667 plantas/ha, y la producción para la segunda flor fluctúa en un rango de 13000 y 15500 kg/ha.

Vista de la producción y el tamaño de fruto y de plantas logrado a los 17 meses de la plantación.



Vista de la producción y detalle en la uniformidad del tamaño de fruto esperado (segunda flor) en plantas del ensayo de frecuencia de aplicación del fertirriego



El nivel foliar de N, elemento llave de la producción, no ha sido modificado durante el primer año con las frecuencias de fertirriego, pero si con las formas de aplicar la nutrición y el riego. Como el N llega a las raíces por flujo masal, es decir se mueve con el agua del suelo, esta

información primaria deberá contrastarse con un año extremadamente lluvioso como el actual.

Formas de Fertilizar y Regar		Frecuencia de aplicación	
	% N		% N
Riego+Fertilización Concencional	2.68 b	Fertiriego Diario	2.73 ns
Riego+Fert. Con N de Liberación Lenta	2.96 a	Fertiriego cada 3 días	2.72
Fertiriego cada 3 días	2.83 ab	Fertiriego Semanal	2.68
Pr>F	0.0288	Pr>F	0.8422

Resultados Objetivo estratégico 2. Como indicadores del nivel nutricional de las plantas y complementarios a los clásicos análisis de suelo y foliar se está calibrando el análisis de los nutrientes en las flores y el análisis químico de la savia. Los avances logrados en estos indicadores (nivel de nutrientes minerales en flores y en savia) son muy promisorios, pues permiten un diagnóstico anticipado al diagnóstico foliar clásico, en el caso del análisis de flores y una detección más rápida y sensible a cambios en las medidas de manejo, ejemplo a una aplicación de N que el análisis foliar. Sin embargo es necesario aún complementar esta información para una extrapolación y uso a nivel productivo. Los indicadores usados en suelo son el clásico análisis químico de suelo, el análisis de la solución del suelo y el seguimiento a distintas profundidades del contenido de agua en suelo.

Para el análisis de la solución del suelo se han instalado succionadores de la solución del suelo; estos permiten el control de la solución nutritiva aplicada y el seguimiento de la misma a nivel de la interfase del suelo con el sistema radicular. El seguimiento de la solución en el bulbo y el hecho de trabajar a dos profundidades nos facilita evitar pérdidas de nutrientes en profundidad y generar potenciales problemas de contaminación.

Succionador de solución de suelo y vista del campo experimental con las estaciones de solución del suelo y sensores de agua en suelo.



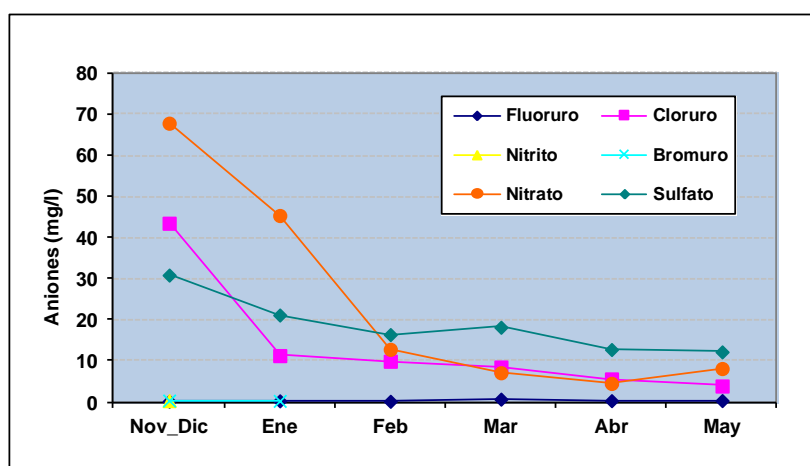
Los extractores de solución del suelo están ubicados a dos profundidades y la solución extraída es analizada en INIA-SG con un cromatógrafo de iones (Dionex ICS 900) que permite el análisis de los aniones y cationes.

Efecto de la profundidad de muestreo de la solución del suelo en el contenido de cationes

Efecto de la profundidad de muestreo de la solución del suelo en el contenido de cationes en el promedio de todos los tratamientos de fertirriego.

Frecuencia de Aplicación	Cationes mg/litro					
	Litio	Sodio	Amonio	Potasio	Magnesio	Calcio
20 cm	0.04 b	3.55 b	0.15 ns	1.11 ns	7.7 a	44.0 a
45 cm	0.06 a	7.60 a	0.29	1.28	3.6 b	28.0 b

Formas de Regar y Fertilizar	Cationes mg/litro					
	Litio	Sodio	Amonio	Potasio	Magnesio	Calcio
20 cm	0.04 b	4.45 b	0.32 ns	0.92 ns	12.5 a	61.0 a
45 cm	0.07 a	8.08 a	0.45	0.92	4.7 b	37.8 b



Evolución general de los aniones de la solución del suelo con la frecuencia de aplicación del fertirriego. Frecuencia cada 3 días 20 cm de profundidad.

Componentes del rendimiento en Afourer bajo fertirriego y con tres sistemas de fertilización. Cosecha 2015, perteneciente a la segunda floración desde la plantación.

Fertilización	Kg/planta	Ton/ha	N° de frutos	Peso fruto (g)
Diaria	22.7 a	15.2 a	173 ns	132 a
Tres días	19.7 b	13.2 b	170	116 b
Semanal	23.1 a	15.4 a	190	122 c

Fertilización	Kg/planta	Ton/ha	N° de frutos	Peso fruto (g)
Convencional	26.5 a	17.7 a	218 a	122 a
Fertirriego 3 días	20.0 b	13.3 b	176 b	114 b
Liberación lenta	26.1 a	17.4 a	214 a	122 a

Medias en las columnas seguidas por diferente letra son significativamente distintas ($p < 0.05$).
Test de Rangos Múltiples de Duncan.

Resultados Objetivo estratégico 3. Este grupo de experimentos está planificado para instalarse en marzo de 2016, actualmente las plantas con los portainjertos semienanizantes (79AC) y los demás están en desarrollo en el invernáculo.

Los avances logrados y esperados en estos trabajos, el ajuste de los indicadores de suelo y planta de estos experimentos, junto con la incorporación de las innovaciones tecnológicas y el manejo selectivo de las nuevas variedades brindarán la seguridad necesaria para que estos sistemas productivos puedan ser adoptados en las condiciones de Uruguay y utilizar las oportunidades significativas que tienen de disminuir la brecha productiva existente.

Referencias Bibliográficas

- Schumann, A. ; Syvertsen, J.P. y Morgan, T.K.** 2009. *Implementing Advanced Citrus Production Systems in Florida- Early Results. Proc. Fla. Hort. Soc.* 122:108-113.
- Martinez-Valero, R. y Fernandez, C.** 2004. *Preliminary results in citrus groves grown under MOHT system. Proc. Int. Soc. Citriculture.*
- Stover, E.; Castle, W.S y Spyke, P.** 2008. *The citrus grove of the future and its implications for huanglongbing management. Proc. Fla. State Hort. Soc.* 121: 155-159.

Estrategias de manejo para la recuperación de plantas cítricas dañadas por heladas.

Alvaro Otero, Carmen Goñi *

Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay. aotero@inia.org.uy. (*) Actualmente en retiro jubilatorio.

Introducción

La región noroeste del río Uruguay se vio afectada en junio del 2012 por tres días consecutivos de heladas de gran intensidad y duración. Las características del evento provocaron cuantiosas pérdidas con una disminución estimada de más de un 40% en la producción del año (F. Montes, com. pers., 2012), afectando con mayor énfasis a las variedades de maduración media y de estación. La intensidad del daño provocado por los efectos del frío fue diferente entre las especies y edades de las plantas. Se registraron daños en la copa de los árboles con defoliaciones intensas, caída masiva de fruta, rajado de ramas y muerte de plantas, en especial en plantaciones jóvenes (INIA, 2012). Las quintas comerciales de cítricos de Uruguay no están preparadas para sortear este tipo de evento como lo hacen otros países (Geisel, 2003); tampoco existían recomendaciones tecnológicas (Johnston, 1949) validadas a nivel del país para mitigar este tipo de daño. El propósito de estos trabajos fue recuperar en el menor tiempo posible la capacidad productiva de las plantas estudiando dos factores: la época de poda de las ramas dañadas por la helada y la fertilización nitrogenada.

Materiales y métodos

El experimento se instaló en el campo experimental de INIA Salto Grande en un cuadro de producción fuertemente dañado por las heladas de junio del 2012. Se seleccionaron plantas adultas de 'Spring Navel' injertadas en *P. trifoliata* de 15 años, con riego y con una historia de buena fertilización. El cuadro fue dividido en áreas con plantas de intensidades crecientes en la expresión del daño en hoja, ramas y tronco. Se determinaron dos factores: época de poda de las ramas dañadas y fertilización de N. La poda se realizó solo en el primer año y fue de igual intensidad para todas las plantas, variando solamente la época de realización. Los tratamientos fueron: a) sin poda, b) poda al comienzo de la primavera (setiembre) y c) poda en diciembre. El segundo factor fue el nivel de N aportado a las plantas: dosis media y alta de N: 400 y 600 g N pl⁻¹ respectivamente. La fertilización fue en cobertura, las plantas fueron suplementadas con aportes de P y K y se aplicó micronutrientes por vía foliar en brotación. En el cuadro se instalaron tensiómetros a dos profundidades para manejar los aportes de agua. Los riegos se realizaron en turnos de 6 h cada vez que fueran requeridos. Se evaluó la floración, los flujos vegetativos de primavera, verano y otoño, el volumen inicial y final de las plantas, los componentes de rendimiento, la calidad de cosecha y el nivel nutricional de N, P y K de las plantas. Los seis tratamientos fueron dispuestos en cinco bloques con cuatro plantas por unidad experimental. El diseño fue en bloques completos aleatorizados.

Resultados y discusión

La repercusión de la defoliación intensa del daño de la helada fue visible a través de una floración muy baja, no encontrándose diferencias significativas para los factores analizados de N, época de la poda y la interacción de ambos. El daño en las plantas por helada se incrementó a medida que las plantas se apartaban de las cortinas rompevientos, como los bloques se realizaron paralelos a estas cortinas, hubo bloques con diferente intensidad del daño de la helada, lo que explica la significancia del efecto bloque. El bloque con mayor intensidad de daño por heladas fue el bloque de menor intensidad de la floración subsiguiente (Cuadro 1). En el bloque con menor daño la fecha de la poda o la fertilización de N, no tuvieron un efecto significativo. Por otro lado, la poda tuvo un efecto depresivo en la floración cuando la intensidad del daño de la helada es alta. La poda temprana disminuyó significativamente el número de flores totales en el bloque de mayor daño. No se vio efecto del N en la floración total, solo un incremento significativo de las inflorescencias con hojas cuando la intensidad del daño es baja. Las plantas no podadas tienen una mayor longitud de brotes en el flujo de verano y otoño, mientras que un aporte alto de N incrementa la longitud del brote de verano pero no el de otoño. (Cuadro 2).

Cuadro 1. Caracterización de la floración 2012 en dos bloques contrastantes en el daño de la helada.

Poda	Nitrógeno	Nº de flores o brotes cada 100 nudos			
		Inflorescencias sin hojas	Inflorescencias con hojas	Flores totales	Brotes Vegetativos
Bloque de menor daño					
Primavera		9,7 ns	13,1 ns	22,7 ns	12,0 ns
Diciembre		8,6	12,8	21,4	13,7
Sin Poda		7,8	13,6	21,3	12,0
	Alto	9,3 ns	15,0 a	24,3 ns	12,9 ns
	Medio	8,0	11,4 b	19,4	12,3
Bloque de mayor daño					
Primavera		1,1 b	3,3 b	4,4 b	24,3 a
Diciembre		5,9 ab	7,3 ab	13,2 ab	17,8 b
Sin Poda		10,4 a	9,8 a	20,1 a	17,0 b
	Alto	7,5 ns	6,9 ns	14,4 ns	17,6 b
	Medio	4,1	6,7	10,7	21,9 a

Medias de columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes (TRM Duncan $p \leq 0,05$)

En la floración de la primavera 2013, los bloques siguen diferenciándose entre sí, no hay un efecto significativo del factor N en los parámetros evaluados, visualizándose el efecto residual de la poda temprana anterior con un aumento significativo de inflorescencias con hojas y de brotes vegetativos comparado al testigo sin poda y con efecto intermedio a la poda de diciembre (Cuadro 3). El volumen de la copa luego de la cosecha no se diferenció con los aportes de N, pero las plantas con poda temprana de primavera tienen significativamente copas más reducidas comparadas al de plantas no podadas hasta esa fecha (testigos y poda tardía). Al siguiente año ninguno de los dos factores estudiados influyó el volumen de copa, ni el efecto bloque (Cuadro 4). Como era de esperarse los

niveles productivos de la zafra 2013 descendieron, siendo entre un 40-50% inferiores a los promedios históricos de plantas del mismo cuadro en condiciones de secano.

Cuadro 2. Flujos vegetativos de la primavera 2012, verano y otoño 2013. Efectos principales comparados con el bloque mayor daño

Poda	Nitrogeno	Primavera		Verano		Otoño	
		Nº brotes /m ²	L. Brotes (cm)	Nº brotes /m ²	L. Brotes (cm)	Nº brotes /m ²	L. Brotes (cm)
Ensayo							
Primavera		38,3 a	8,9 a	2,0 b	7,9 ns	20,3 b	9,2 ns
Diciembre		10,8 b	7,1 b	5,3 b	7,8	20,3 b	9,3
Sin Poda		7,0 b	6,7 b	9,5 a	7,3	27,1 a	9,3
	Alto	23,1 a	7,6 ns	6,6 ns	7,4 ns	21,7 ns	9,4 ns
	Medio	14,2 b	7,7	4,7	7,7	23,3	9,1
Bloque de mayor daño							
Primavera		74,9 a	11,8 a	0,0 b	0,0 ns	8,25 b	9,9 ns
Diciembre		29,3 b	8,8 ab	6,5 a	9,3	8,75 b	8,7
Sin Poda		9,9 b	6,5 b	6,5 a	7,1	21,5 a	8,3
	Alto	46,2 ns	9,1 ns	2,0 b	3,4 ns	18,2 a	9,4 ns
	Medio	29,8	8,4	6,6 a	5,2	7,5 b	8,1

Medias de columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes (TRM Duncan $p \leq 0,05$)

Cuadro 3. Caracterización de la floración 2013. Efectos principales

Poda	Nitrógeno	Nº de flores o brotes cada 100 nudos			
		Inflorescencias		Flores	Brotes
		sin hojas	con hojas	totales	Vegetativos
Primavera		30,4 b	23,9 a	54,3 ns	6,2 a
Diciembre		40,8 a	20,0 ab	60,8	5,7 ab
Sin Poda		42,6 a	13,7 b	56,3	3,1 b
	Alto	37,8 ns	18,6 ns	56,4 ns	51,0 ns
	Medio	38,0	19,9	57,9	51,5

Medias de columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes (TRM Duncan $p \leq 0,05$)

Cuadro 4. Comparación del volumen de copa evaluado al finalizar la cosecha

Poda	Nitrógeno	Vol. Copa (m ³)	
		2013	2014
Sin Poda		13,6 a	17,5 ns
Poda Primavera		11,9 b	15,8
Poda Diciembre		12,9 ab	17,6
	Medio	13,0 ns	16,4 ns
	Alto	12,6	17,5

Medias de columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes (TRM Duncan $p \leq 0,05$)

El rendimiento por planta siguiente a la helada no fue afectado por el nivel de N aplicado (Cuadro 5) pero sí lo fue con la poda. Los árboles no podados rindieron significativamente más que los podados, manteniendo los tenores de SST y acidez dentro de los valores normales y, contrariamente a lo esperado, la menor intervención en planta disminuyó el daño de rameado en fruta (datos no presentados). Al siguiente año el número de frutos por planta se duplica. La productividad por planta hubiera sido mayor de no suceder una fuerte purga de frutos entre 30-40 mm a nivel regional a mediados de enero como consecuencia de muy altas temperaturas 34-35°C y bajas humedades relativas que con el manejo del riego no se pudo evitar (García Delgado *et al*, 2004). La producción por planta fue significativamente mayor en las plantas no podadas o con poda temprana de primavera y con dosis media de N, así como su eficiencia productiva (datos no presentados), persistiendo las diferencias significativas por zonas de intensidad de daño.

Cuadro 5. Componentes del rendimiento de las zafras 2012-13 y 2013-14. Efectos principales.

Poda	2013			2014			% Exp 72-86 mm	
	Nitrógeno	Nº frutos/pl	Rendimiento Kg/pl	Peso Fruto(g)	Nº frutos/pl	Rendimiento Kg/pl		Peso Fruto(g)
Sin Poda		268 a	71,1 a	272,8 b	508 a	98,2 a	194,1 b	87,6 a
Poda Primavera		193 b	51,6 c	269,4 b	438 b	88,9 ab	204,3 a	87,8 a
Poda Diciembre		211 b	62,2 b	294,2 a	401 b	83,7 b	210,9 a	83,5 b
	N-Alto	216 ns	62,6 ns	278,4 ns	419 b	84,8 b	204,0 ns	86,0 ns
	N-Medio	231	62,6	274,5	476 a	95,4 a	202,6	86,5

Medias de columnas con letras diferentes son estadísticamente diferentes (TRM Duncan $p \leq 0,05$)

Conclusiones

- Plantas con defoliación intensa y con caída de frutas pueden recuperar su capacidad productiva al segundo año de producido el daño. La poda de las plantas en primavera temprana o tardía, no mejora el rendimiento en la siguiente cosecha al daño por helada.
- La fertilización de nitrógeno resultó más importante para explicar el rendimiento al segundo año, aunque persisten las diferencias productivas entre los bloques. En el área de menor daño resulta mejor una dosis media de N sin poda mientras que en área de mayor daño una dosis media de N con una poda de primavera.

Referencias bibliográficas

- García Delgado, M. A.; Zermeño Gonzalez, A.; Lee Rodriguez, V.; Castro Messa, V. I.; Briones Encinia, F. y Aguirre Bortomi, F. 2004. Efecto de la nebulización en la temperatura y humedad del aire y su relación con el cuajado y rendimiento de Navel. *Agrociencia* 38:643-651.
- Geisel, P.M. 2003. Frost protection for Citrus and Other Subtropicals. University of California. ANR Publication. 8100, 4 p.
- Johnston, J.C. 1949. Citrus tree freeze damage. Possible effect of the January cold spell on the 1950 crop and recommended treatment of injured trees. *California Agriculture* 6 p.
- INIA-Programa Nacional de Producción Citrícola. 2012. Daños en la citricultura: Análisis y recomendaciones agronómicas para montes afectados. INIA SAD 685.

Disipación de fungicidas e insecticidas utilizados en campo en el cultivo de mandarinas, naranjas y limones.

**Natalia Besil^{1,2}, Verónica Cesio^{1,2}, Franco Bologna³, Eleana Luque³, Pedro Pintos³
Fernando Rivas³, Horacio Heinzen^{1,2}.**

¹Polo Agroalimentario y Agroindustrial de Paysandú. Departamento de Química del Litoral. CENUR Litoral Norte, Universidad de la República.

²Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química, Universidad de la República.

³Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.

Contacto: nbesil@fq.edu.uy

Introducción.

Las frutas cítricas, al igual que cientos de cultivos, están sometidas a distintos tratamientos para el control de plagas tanto en su fase agraria como de poscosecha (Fava Neves et al., 2012). A nivel de campo es común el uso de fungicidas e insecticidas como difenoconazol, pyraclostrobin, imidacloprid y spinosad, entre otros (Guía SATA, 2014). Como resultado de dichas aplicaciones, residuos de estos agroquímicos quedan sobre la fruta (Ortelli et al., 2005), los que deben cuantificarse para asegurar calidad e inocuidad para el consumidor y satisfacer así las exigencias de los mercados internacionales, buscando no exceder los límites máximos de residuos (LMRs) admitidos. Con tal fin, se han desarrollado diversas metodologías analíticas miniaturizadas, amigables con el medio ambiente y de bajo costo para la determinación en simultáneo de los principios activos de interés como las reportados por Anastassiades et al. (2003) y Ferrer et al. (2010). El desarrollo y validación de estas metodologías multirresiduos (MRM) que permiten en una sola inyección cromatográfica determinar los compuestos de interés a monitorear, ofrecen también una herramienta para evaluar el comportamiento de distintos principios activos en el tiempo sobre distintos cultivos. Estos estudios brindan a toda la cadena productiva información suficiente para ajustarse a aspectos específicos y cumplir con las buenas prácticas agrícolas así como saber cuáles son los tiempos de espera para una comercialización segura (Omirou et al., 2009; Galetta et al., 2011). Con tal fin, se emplea la representación gráfica de la concentración de pesticidas respecto al tiempo conocida como curva de disipación y a partir de la misma se puede conocer el decaimiento y la vida media de cada principio activo bajo las condiciones del estudio.

En este trabajo se presenta una evaluación de la dinámica de disipación de 4 principios activos utilizados habitualmente en instancias de pre-cosecha respecto al tiempo, sobre las variedades 'Navelina', 'Nova' y limón 'Criollo' cultivadas en condiciones experimentales controladas, cada una en dos zonas de Uruguay (norte y sur), de forma de asegurar la inocuidad alimentaria y las buenas prácticas agrícolas y al mismo tiempo evaluar cómo afectan las condiciones geográficas y medioambientales.

Materiales y Métodos.

Reactivos e instrumentos. Los estándares de los pesticidas (Cuadro 1) fueron suministrados por Dr. Ehrenstorfer GmbH. Los solventes y reactivos fueron AcOEt y MeCN calidad para análisis de pesticidas y MgSO₄ y NaCl de Bruker. La centrifuga utilizada para la separación de fases fue la SL16 de ThermoScientific y el equipo de evaporación un TurboVap® LV. Las soluciones stock de los pesticidas en estudio se prepararon en MeCN a 2,0 g L⁻¹ para cada uno y se guardaron a -18 °C hasta su uso. A partir de las soluciones estándares se preparó una solución de una concentración de 100,0 mg L⁻¹ de los pesticidas en MeCN y a partir del mismo, se realizó la dilución necesaria hasta llegar a una concentración de pesticidas de 10 mg L⁻¹.

Los residuos de los pesticidas fueron analizados utilizando un Cromatógrafo de Líquidos (LC) Agilent 1200 acoplado a un Espectrómetro de Masas (MS/MS) ABSCIEX 4000 Q TRAP (sistema LC-MS/MS) equipado con una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6x150 mm d.i., 5 µm; velocidad de flujo 0,6 mL min⁻¹, la temperatura de la columna 20 °C y el volumen de inyección 5 µL. Se utilizó un gradiente binario del 1% de HCOOH en agua y MeCN. Las transiciones monitoreadas y los tiempos de retención de cada analito se pueden ver en el Cuadro 1. El software utilizado fue Analyst® 1.5.1.

Cuadro 1. Tiempo de retención (tR) y transiciones de cuantificación (SRM1) y detección (SRM2) de los analitos con sus respectivas energías de colisión (EC).

Pesticida	tR (min)	SRM 1 (m/z)	SRM 2 (m/z)	Voltaje (eV)	EC (eV)
Imidacloprid	5,38	256,1>209,1	256,1>175	86	22/23
Spinosyn A	8,78	732,6>142,2	732,6>98,3	136	81/21
Spinosyn D	9,25	746,5>142,2	746,5>98,1	66	39/79
Difenoconazol	12,76	406,0>251,1	406,0>337,0	90	37/21
Pyraclostrobin	13,23	388,1>194,2	388,1>163,1	67	17/39

Ensayo a campo. Este trabajo se realizó en forma controlada a nivel de campo. Cada uno de los principios activos fue aplicado en forma individual sobre 5 árboles adultos de naranja 'Navelina', mandarina 'Nova' y limón 'Criollo' seleccionados para cada tratamiento. Las dosis empleadas fueron las recomendadas por los proveedores (dosis de etiqueta) y se aplicaron con mochila a punto de goteo. El ensayo se llevo a cabo evaluando tres variables:

- 1) Condición geográfica (norte y sur),
- 2) Especie cítrica (mandarina, naranja y limón)
- 3) Exposición a factores ambientales:
 - a) muestras que luego de la aplicación quedaron totalmente expuestas a factores ambientales (muestras sin capuchón, SC),
 - b) muestras que fueron protegidas con capuchones (CC).

Formulados comerciales

SPINGARD 35F concentrado soluble (350 g L⁻¹ imidacloprid) fue adquirido de Cibeles; COMET concentrado emulsionable (250 g L⁻¹ de pyraclostrobin) de BASF; TRACER I concentrado soluble (480 g L⁻¹ de spynosad) de Rutilar y SCORE 250 concentrado emulsionable (250 g L⁻¹ de difenoconazol) de Syngenta fueron utilizados en este trabajo.

Muestreo. Los muestreos se realizaron a los 0 (1 h después de realizada la aplicación), 6, 21 y 35 días pos-aplicación, coincidiendo el último muestreo con el día de cosecha de la fruta. Las frutas se tomaron de forma aleatoria de los distintos árboles de cada tratamiento. La muestra de cada tratamiento se compone de una mezcla de 5-7 frutas que conformen aproximadamente 1 kg de muestra. Posteriormente las frutas completas (incluida su cáscara tal como lo establece el Codex Alimentarius) fueron cortadas en cuartos y se descartaron los cuartos opuestos para finalmente triturarlos otros dos cuartos hasta obtener una mezcla homogénea.

Preparación de muestra: método AcOEt.

Se pesaron 10 g de la muestra homogeneizada en un tubo de centrifuga de 50 mL. Se agregó 10 mL de AcOEt y se agitó manualmente durante 1 min. Posteriormente se agregó 8 g de MgSO₄ anhidro y 1 g de NaCl. Se agitó durante 1 min y se colocó en baño de ultrasonido durante 15 min. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min. Se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante y se llevó a sequedad bajo corriente de N₂ en un equipo TurboVap® LV. El extracto se retomó con 1 mL de MeCN. Esta metodología ha sido previamente evaluada y validada siguiendo las directrices de la guía SANCO.

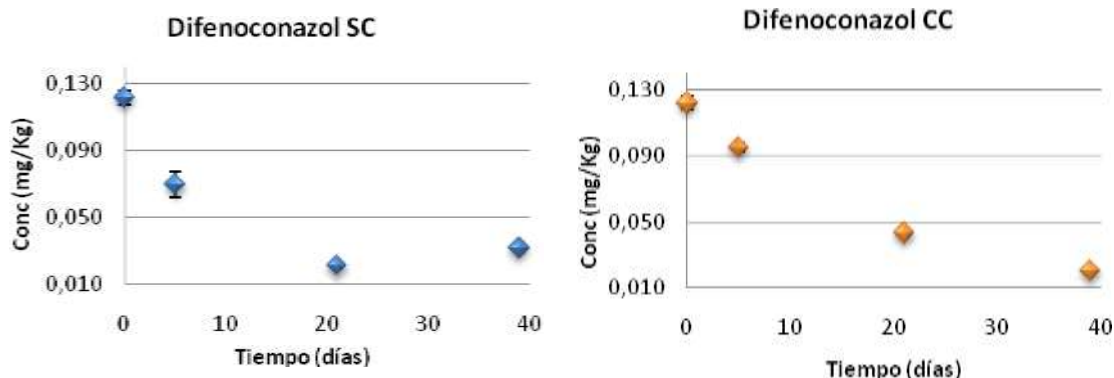
Resultados y Discusión.

Previo a la realización del ensayo se desarrolló un método instrumental por HPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tándem, que permite la detección de todos los analitos incluidos en el estudio de forma simultánea. El mismo fue validado siguiendo las directrices de la guía SANCO. En el Cuadro 2 se muestran las cifras de mérito evaluadas; la precisión y la exactitud del método a un nivel de 0,2 mg kg⁻¹ de naranja.

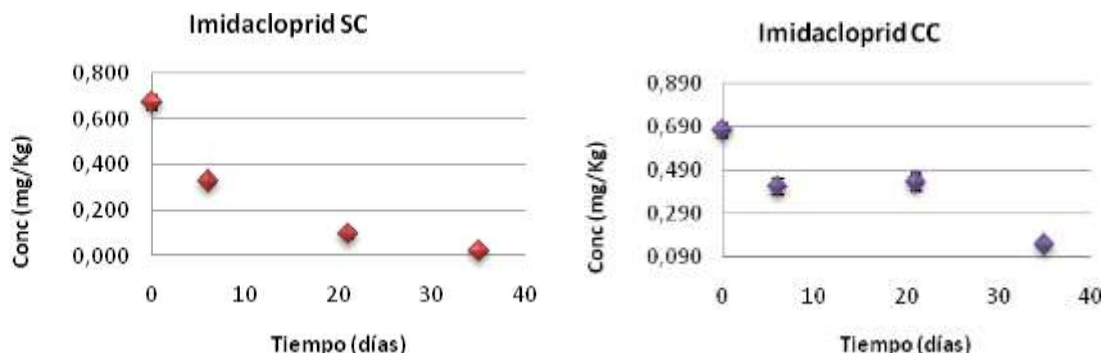
Cuadro 2. Porcentajes de recuperación (Rec %) y desviación estándar relativa (DSR) a 0,2 mg kg⁻¹ en naranja. *Expresado como suma de spinosyn A y D, tal como lo indican las normativas para análisis de residuos de pesticidas en alimentos

Pesticida	Rec (%)	DSR (%)
Imidacloprid	102,3	6,8
Spinosad*	69,7	3,6
Difenoconazol	96,2	6,9
Pyraclostrobin	98,9	5,9

Como resultado del análisis de las distintas muestras se observó que, para todos los pesticidas evaluados, al momento de la cosecha la cantidad de los mismos sobre la fruta no supera los LMRs, mientras que en el día de aplicación solamente difenoconazol superó su LMR (0,1 mg kg⁻¹) en mandarina 'Nova'. A continuación se muestran las curvas de disipación para difenoconazol en tratamientos sin y con capuchón en mandarina 'Nova' e imidacloprid en naranja 'Navelina'.



Figuras 2 y 3. Comportamiento de la concentración (mg Kg⁻¹) de difenoconazol en mandarina respecto al tiempo de aplicación en tratamientos sin y con capuchón. Barras de desvio indican desviación estandar de 3 replicas de analisis. Variedad: 'Nova', Salto, Uruguay.



Figuras 4 y 5. Comportamiento de la concentración (mg Kg⁻¹) de imidacloprid respecto al tiempo de aplicación (días) en tratamientos sin y con capuchón. Barras de desvio indican desviación estandar de 3 replicas de analisis. Variedad: 'Navelina', San José, Uruguay.

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de los principios activos para una misma variedad en las dos zonas geográficas evaluadas en este estudio donde no existieron diferencias significativas en las temperaturas (T^omáxima promedio 23,1-27,8 °C), la suma de radiación solar por heliofanía (6645-13846 cal/cm²/dia) y las precipitaciones (71,7-113,8 mm). Para imidacloprid, cuando la fruta es protegida de la radiación solar y de la lluvia mediante el uso de capuchones de nylon rojo, se favorece la permanencia del principio activo sobre la fruta tanto en naranjas como en mandarinas, y esto sucede en ambas zonas del país.. Por otro lado, para pyraclostrobin e imidacloprid se observaron diferencias significativas entre la cantidad de residuos remanentes al momento de la cosecha sobre las dos variedades cítricas evaluadas en los tratamientos sin capuchón. En ambos casos, se determinaron mayores cantidades de dichos principios activos sobre mandarinas; pyraclostrobin 0,24 respecto a 0,15 mg kg⁻¹ en naranja mientras que la concentración de imidacloprid fue 0,12 y 0,03 mg kg⁻¹ para mandarina y naranja respectivamente.

Conclusiones

Los resultados obtenidos (concentración de pesticidas menores a los LMRs al momento de la cosecha) permitirían asegurar la inocuidad alimentaria de los frutos cítricos y el

cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas por parte de los productores si los cultivos fueran realizados y tratados en las condiciones del experimento

Bibliografía

- Fava Neves, M., Trombin, V., Fonseca Lopes, F., Kalaki, R., Milan, P.** 2012. The orange juice business. Chapter: Pesticides in citrus farming. 78. DOI 10.3920/978-90-8686-739-4_20
- Ortelli, D., Edder, P., Corvi, C.** 2005 Pesticide residues survey in citrus fruits. *Food Additives and Contaminants* 22 (5): 423-428.
- Anastassiades, M., Lehotay S. J., Štajnbaher D., Schenck F.J.** 2003 Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* 86: 412–431.
- Ferrer, C., et al.** 2010 Efficiency Evaluation of the Main Multiresidue Methods Used in Europe for the Analysis of Amitraz and its Major Metabolites. *Journal of AOAC International* 93,380-
- M. Omirou, Z. Vryzas, E. Papadopoulou-Mourkidou, A. Economou.** 2009. Dissipation rates of iprodione and thiacloprid during tomato production in greenhouse. *Food Chemistry* 116: 499–504.
- Codex Alimentarius Commission.** Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Report No. 08/31/24; FAO/WHO: Hangzhou, China, 2008
- DG- SANCO.** 2013. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed.
- Guía SATA.** Guía para la protección y nutrición vegetal. <http://www.laquiasata.com/> consulta on-line 02-02-2014.

Tratamientos cuarentenarios: Impacto en la calidad de fruta y estrategias pre y postcosecha para su minimización.

Joanna Lado, Franco Bologna¹, Eleana Luque, Pedro Pintos, Fernando Rivas.

Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay.

¹Asesor privado

Contacto: jlado@inia.org.uy

Introducción

La presencia de mosca de la fruta (*Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus*) en el territorio nacional conlleva la necesidad de un tratamiento cuarentenario para erradicar larvas vivas en los frutos cítricos exportados a Estados Unidos. Los protocolos de exportación sugieren la posible adopción de tres tipos de tratamientos para los frutos cítricos: irradiación (rayos gamma), bromuro de metilo y bajas temperaturas (tratamiento de frío) (USDA-APHIS).

Los tratamientos mencionados anteriormente pueden provocar cambios a nivel de la calidad externa o interna de la fruta, muchas veces no deseados. Se ha descrito un posible deterioro del sabor y la aparición de manchas en la piel de frutos cítricos tratados con rayos gama (McDonald et al., 2013). El bromuro de metilo es utilizado como tratamiento cuarentenario para evitar la presencia de larvas de la mosca vivas en otros cultivos, como es el caso del arándano, en donde el deterioro que provoca en la calidad del fruto es mínimo durante el almacenamiento refrigerado (Feippe et al., 2010). La aplicación de bajas temperaturas durante el almacenamiento postcosecha es también una de las principales tecnologías utilizadas para extender la vida útil de frutos cítricos. Sin embargo, la mayoría de los frutos cítricos son sensibles a las bajas temperaturas, desarrollando diversos síntomas de daño en la piel, conocidos como daño por frío (DF), los cuales no afectan la calidad interna del producto, pero sí deterioran la calidad comercial del mismo (Lafuente y Zacarías, 2006).

Para las condiciones de Uruguay, se desconoce la sensibilidad de las diferentes variedades exportadas a estas opciones de tratamientos cuarentenarios. Este trabajo plantea la evaluación de la calidad de fruta e incidencia de DF en la piel durante el almacenamiento refrigerado de frutos tratados con rayos gamma, bromuro de metilo y bajas temperaturas. Este trabajo también aborda la evaluación de diferentes tecnologías postcosecha con el objetivo de reducir o minimizar la incidencia de DF durante la cuarentena por frío.

Materiales y Métodos

Los frutos fueron sometidos a tres tipos de tratamientos cuarentenarios reconocidos para la exportación de fruta fresca a Estados Unidos: Irradiación, bromuro de metilo, frío (USDA-APHIS). Los tratamientos de irradiación se aplicaron a cajas comerciales de la variedad Afourer y las dosis fueron de 0,150, 250, 500 y 1000Gy. Posteriormente se evaluó la calidad de fruta durante el almacenamiento refrigerado. De forma similar, cajas comercialmente empacadas de las naranjas Navelina, Salustiana y W. Navel, así como limones plateados y amarillos, la mandarina Clemenules y Nova y la variedad Afourer fueron sometidas al tratamiento

cuarentenario con bromuro de metilo (32 g/m^3 2 horas a 21°C). Luego del tratamiento se evaluó la calidad de la fruta durante el almacenamiento refrigerado.

Para el caso del tratamiento por bajas temperaturas, la fruta fue cosechada en condiciones comerciales y el procesamiento y empaque se realizaron en una minilínea experimental de dimensiones semi-comerciales ubicada en la Estación Experimental de INIA Salto Grande. El primer año se utilizaron las variedades Afourer, Newhall y Salustiana en las cuales se evaluó el efecto del agregado de Giberelinas (GA_3 , 20ppm) en solución acuosa en forma previa al encerado. También se evaluó el posible efecto de dos tipos de ceras (14 y 18% de sólidos) en la incidencia de daño por frío en estas tres variedades y también en la mandarina Nova.

Paralelamente, se evaluó el efecto del estado de madurez en la incidencia de DF en la variedad Clementina de Nules. Para esto se cosecharon y compararon frutas en estado totalmente coloreado y frutas verdosas. El segundo año se evaluó nuevamente el efecto de la aplicación de dos tipos de ceras contrastantes en la proporción de sólidos (12 y 18% de sólidos) y de la adición de GA_3 (20 ppm) aplicada conjuntamente con la cera. Se trabajó con las variedades: Satsuma Okitsu (*Citrus unshiu*), Satsuma Owari (*Citrus unshiu*), Clementina de Nules (*Citrus reticulata*), Navelina (*Citrus sinensis*), Afourer (*Citrus reticulata*), Limón Lisbon verdosos (Pintón) y Limón Lisbon amarillos (*Citrus limon*).

La incidencia de DF en la piel de los frutos se determinó mediante el índice de DF (IDF). Para ello se utilizaron 3 repeticiones de 20 frutos por tratamiento, los cuales se clasificaron en diferentes categorías utilizando una escala visual, según el siguiente criterio: 0=sin daños visibles; 1= daños ligeros, abarcando hasta un 10% de la superficie del fruto; 2=daños moderados, abarcando entre 10 y 50% de la superficie del fruto y 3= daños severos, abarcando más del 50% de la superficie del fruto (Lafuente et al., 1997). El IDF se calculó mediante la fórmula: $\sum (\text{número de frutos de cada categoría} \times \text{valor de cada categoría}) / \text{número total de frutos examinados}$. Destacar que con un IDF inferior a 0,5 la fruta es completamente comercial; valores superiores indican un creciente deterioro de la calidad cosmética de los frutos.

En todos los casos, los frutos fueron sometidos a un **tratamiento cuarentenario según protocolo para USA** ("Treatment Manual, Plant Protection and Quarantine"; T107-A-1; USDA-APHIS) y simulando una **doble cuarentena por frío** más la posterior vida mostrador de 7 días. En todos los casos se realizaron dos repeticiones del ensayo para todas las variedades evaluadas. El diseño experimental fue completamente aleatorio para todos los experimentos, con cinco repeticiones de 15 o 20 frutas por variedad, realizándose un ANOVA de los datos para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el DF y una comparación de medias mediante la prueba Tukey ($p \leq 0,05$). Los datos porcentuales fueron analizados luego de la conversión arcosen de los datos.

Resultados

Irradiación

Los frutos fueron tratados con diferentes dosis 0, 150, 250, 500, 1000 Gy. La fruta presentó manchas intensas en la superficie de la piel incluso 3 días después del tratamiento. No existió un efecto en el control de *Penicillium* (cepas S y R a IMZ) compatible con la calidad de la fruta (datos no mostrados).

Bromuro de metilo

Los frutos tratados presentaron diferentes niveles de manchas en la piel, siendo más marcado en Afourer (50%), limones (20-50%) y en Salustiana y W.Navel (5-10%). A su vez la fruta presentó un sabor inaceptable.

Bajas temperaturas-Frío

Los frutos mostraron un comportamiento aceptable durante el tratamiento cuarentenario de frío, mostrando en todos los casos una IDF menor a 0,5, siendo fruta comercialmente aceptable. Destacar además que con estos niveles de daño no existió efecto observable de los diferentes tipos de ceras (12, 14 y 18% de sólidos) y tampoco de la aplicación de GA₃ (20ppm) tanto en solución acuosa como conjuntamente con la cera. Destacar sí la menor pérdida de peso en los frutos encerados en comparación con el control (datos no mostrados). Los principales resultados se presentan en la Figura 1.

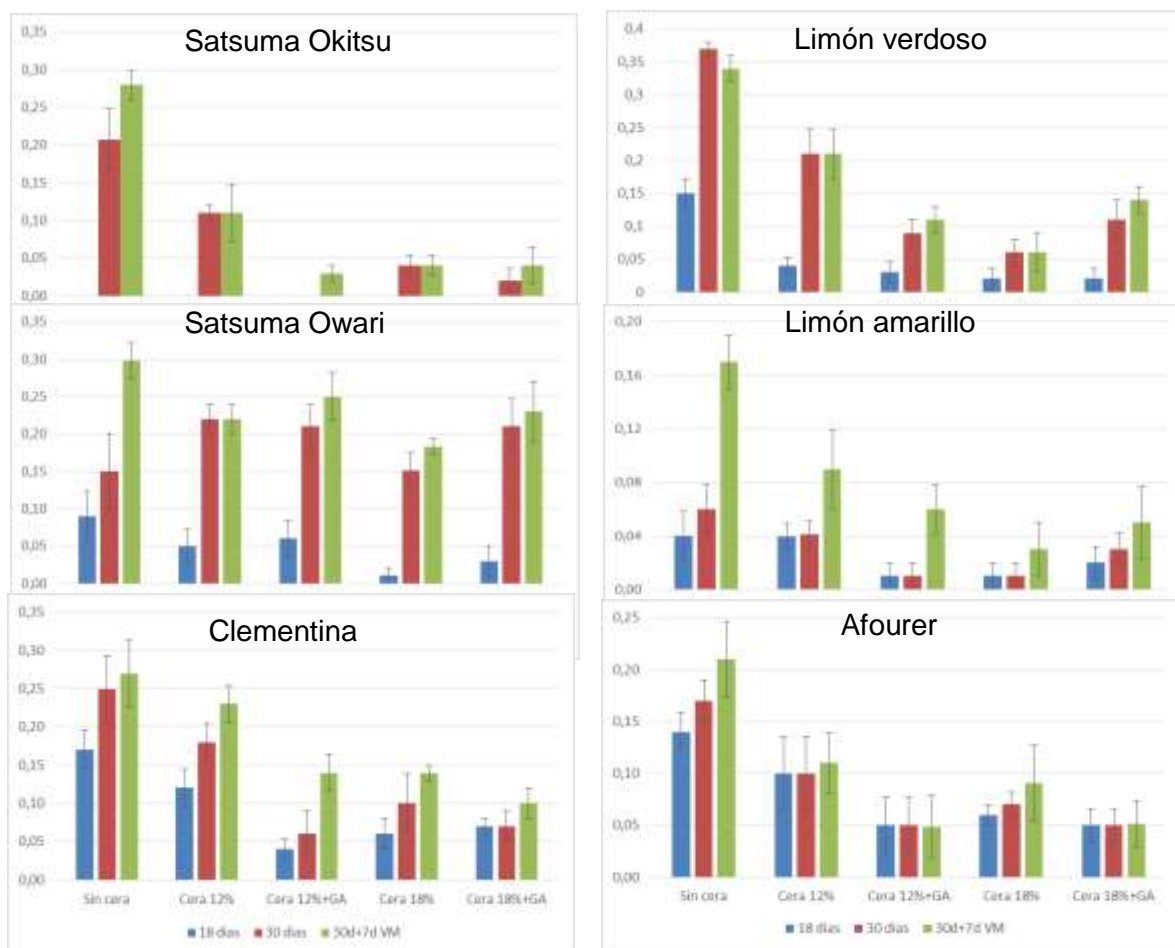


Figura 1. Incidencia de daño por frío medida como índice de daño (0-3) en Satsuma Okitsu y Owari, Clementina, Limones var. Lisbon verdesos y amarillos y Afourer tras 18 y 30 días a $1,0 \pm 0,5$ °C y posterior vida mostrador (VM) a 20°C durante 7 días (30d + 7d VM). Los frutos fueron tratados con ceras de 12 y 18% de sólidos con o sin adición de GA (20ppm) en la misma. Las barras de desvíos representan $\pm EE$.

En la variedad Nova, el IDF fue mayor en frutos sin encerar que en frutos encerados, aunque en ningún caso sobrepasó el valor de 0,3, incluso luego de una doble cuarentena (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia del tipo de encerado (14 y 18% de sólidos) en el índice de daño por frío (IDF) en frutos de la variedad Nova después del tratamiento cuarentenario convencional (18d, $1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), de una doble cuarentena (30d, $1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) y posterior 7 días de vida mostrador (30, $1 \pm 0,5^{\circ}\text{C} +7\text{d}$, 20°C)

Nova	IDF		
	18d	30d	30+7d
Control	0,03	0,22 a	0,25 a
14%	0,01	0,06 b	0,06 b
18%	0,03	0,06 b	0,06 b

Medias en columnas seguidas de igual letra no difieren significativamente (Tukey $p \leq 0,05$). La ausencia de letras indica que no existen diferencias significativas entre tratamientos.

En Clementina de Nules se observó un efecto del estado de madurez en el IDF, en donde los frutos verdes presentaron una mayor incidencia que los frutos completamente coloreados (Tabla 2), sugiriendo que la resistencia al frío estaría asociada al estado de madurez de la fruta y con ello a la composición de la piel de los frutos. Por lo tanto, es importante destacar que la resistencia a las bajas temperaturas se determina en gran medida a nivel de campo y que el manejo durante la postcosecha podría aportar a mitigar la incidencia de daño.

Tabla 2. Incidencia de daño por frío evaluada como el índice de daño por frío- (IDF) en frutos de Clementina de Nules en dos estados de madurez (coloreado y verdes) y sometidas a dos tipos de encerado (14 y 18% de sólidos), después del tratamiento cuarentenario convencional (18d, $1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), de una doble cuarentena (30d, $1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) y posterior 7 días de vida mostrador (30, $1 \pm 0,5^{\circ}\text{C} +7\text{d}$, 20°C).

Clementina de Nules		IDF		
		18d	30d	30+7d
Fruta Coloreada	Control	0	0 b	0,14 b
	14%	0	0 b	0,01 b
	18%	0	0 b	0,01 b
Fruta Verdosa	Control	0,08	0,17 a	0,38 a
	14%	0,11	0,22 a	0,29 ab
	18%	0,03	0,12 a	0,16 b

Medias en columna seguidas de igual letra no difieren significativamente (Tukey $p \leq 0,05$). La ausencia de letras indica que no existen diferencias significativas entre tratamientos.

Conclusiones

Los tratamientos de irradiación o aplicación de bromuro de metilo no son recomendables para ser aplicados en frutos cítricos ya que deterioran tanto la calidad externa como interna a niveles inaceptables. En general se observó un comportamiento favorable de las variedades producidas a nivel nacional al ser sometidas al tratamiento cuarentenario por frío. La incidencia de daño por frío fue baja durante los años de ensayos en los que se aplicó el tratamiento cuarentenario obligatorio. En los dos años se contó con fruta completamente comercial ($IDF < 0,5$), independientemente del tratamiento postcosecha. La aplicación de ceras (12-14 o 18% de sólidos) logró reducir en forma significativa la pérdida de peso y mitigar en algunos casos la incidencia de DF. La adición de GA (20ppm), tanto en aplicación acuosa como con la cera, no mostró un efecto diferencial en el DF. Se observó una mayor incidencia de DF en la mandarina Clementina cosechada verdosa, por lo que es necesario cosechar la fruta en el estado de madurez adecuada. Destacar que el tratamiento por frío no afectó significativamente la calidad interna de las diferentes variedades evaluadas (datos no mostrados).

Bibliografía

Feippe A, Ibañez F, Calistro P, Pereira C, Lado J. 2010 Avances de Resultados de Investigación en Arándanos. SAD 607.

Lafuente MT, Zacarías L. 2006. Postharvest physiological disorders in citrus fruit. *Stewart Postharvest Review*, 2: 1–9.

Lafuente M, Zacarías L, Sala J, Sánchez-Ballesta, MT Gosalbes M, Marcos J, González-Candelas, L Lluch Y, Granell A. 2005. Understanding the basis of chilling injury in citrus fruit. *Acta Horticulturae*, 682: 831–842.

McDonald H, Arpaia ML, Caporaso F, Obenland D, Were L, Rakovski C, Prakash A. 2013. Effect of gamma irradiation treatment at phytosanitary dose levels on the quality of 'Lane Late' navel oranges. *Postharvest Biology and Technology*, 86: 91-99.

Manejo de fungicidas y sales en el control de patógenos postcosecha

Joanna Lado, Elena Pérez, Natalia Besil, Horacio Heinzen, Pablo Varela, Eleana Luque, Pedro Pintos, Oribe Blanco, Fernando Rivas

Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay.

Contacto: jlado@inia.org.uy

Introducción

El desarrollo de resistencia a diferentes principios activos (P.A.) por parte de los principales patógenos postcosecha, así como los cambios en la reglamentación referente a los principios activos permitidos, en combinación con las nuevas reglamentaciones en inocuidad que establecen la presencia de un número máximo de principios activos sobre la fruta, ha llevado a la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para el manejo integrado de patógenos en postcosecha.

Penicillium spp. constituye la principal causa de pérdidas durante la postcosecha de frutos cítricos. A su vez, trabajos anteriores han demostrado la existencia de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes al imazalil (IMZ) a nivel nacional (Pérez et al., 2011), principal fungicida aplicado para su control en postcosecha. Con el objetivo de analizar esta problemática y brindar alternativas para el manejo de esta situación, el presente trabajo recopila los diferentes avances en la temática a nivel nacional. También se abordará la relación entre el nivel de residuos de los principales fungicidas aplicados en postcosecha de frutos cítricos y su velocidad de disipación o efectividad en el control de patógenos. Aportes para el manejo integrado de *Penicillium*

Basados en resultados previos, se trabajó con la inoculación de un aislamiento sensible y uno resistente a IMZ según metodología detallada en Pérez et al. (2011), de forma de comparar la efectividad de nuevas alternativas para controlar ambos biotipos, pero especialmente para potenciar el control de aquellas cepas resistentes al IMZ. Durante varios años de trabajo, se han evaluado diferentes alternativas, entre las que destacan principios activos que pueden potenciar el control del IMZ en biotipos resistentes, así como también la adición de sales o altas temperaturas en las diferentes etapas de aplicación de productos. Durante la aplicación de productos en postcosecha, es clave el método de aplicación seleccionado ya que el mismo determina directamente el residuo logrado sobre la fruta y por tanto, la efectividad del control. Los resultados obtenidos indican que la aplicación mediante inmersión es el método más eficiente para maximizar los residuos del producto en la fruta y por lo tanto, el control del patógeno. A su vez, la aplicación mediante cascada ha demostrado ser más eficiente que el método de aspersión, siempre y cuando el caldo re-circulante se mantenga en condiciones adecuadas. De la misma forma, cuando se trabaja con caldos re-circulantes en el drencher, es fundamental la adición de un filtro al sistema, de forma de maximizar la durabilidad de dicho caldo, evitando la presencia de materia orgánica en el mismo.

Nivel de residuos efectivo para el control de patógenos postcosecha y disipación durante el almacenamiento refrigerado

El nivel de residuos del producto logrado sobre la fruta es clave a la hora de maximizar el control del patógeno. El mismo depende de varios factores: 1) Dosis y concentración del caldo/producto; 2) método de aplicación (inmersión>cascada>aspersión para una misma concentración de producto); 3) condiciones de la aplicación (temperatura, adición de sales u otros productos al caldo; presencia de materia orgánica) y 4) variedad o especie cítrica (Naranjas vs. Mandarinas o Limones).

Trabajos realizados indican que es necesario lograr un residuo en la fruta de entre 2 y 3ppm para controlar efectivamente el patógeno sensible al IMZ, mientras que el biotipo resistente no es controlado efectivamente con ningún residuo de este P.A. (Lado et al., 2013). Es más, el control del biotipo sensible no fue eficiente con residuos en fruta de entre 0,60 y 0,89ppm. Sin embargo, sí se logró un control efectivo de este biotipo con los siguientes tratamientos y niveles de residuos en fruta entera:

Tratamiento aplicado en cascada	Residuo inicial logrado en fruta entera
IMZ 1000ppm a 50°C:	1,50-1,80 ppm
IMZ 1000ppm + 3% BIC:	0,60-0,90 ppm
IMZ 3000ppm en la cera:	3,0-4,8 ppm

Lo anterior demuestra que la adopción de otras estrategias (agua caliente 50°C o sales en el caldo) pueden potenciar el control de *Penicillium*, incluso con un menor nivel de residuos en fruta (Lado et al., 2013). La aplicación en agua caliente (50°C) provoca un aumento en el nivel de residuos en la fruta, el cual puede llegar a duplicarse, mientras que la adición de sales (bicarbonato o sorbato) no lleva a mayores cambios en los residuos en la fruta. Sin embargo, se ha descrito un posible efecto asociado a cambios en el pH del caldo, lo cual puede llegar a modificar la absorción del P.A., y por tanto, aumentar el nivel de residuos en la fruta (Cerioni et al., 2013). Es importante tener en cuenta también que la disipación del residuo durante el almacenamiento depende de la temperatura, pudiendo existir diferencias importantes con pocos grados de variación en esta variable, siendo la misma más rápida a 4°C (Besil et al., 2015) que a 2°C (Lado et al., 2013). En mandarinas clementinas tratadas mediante cascada (1000 o 2000ppm IMZ) se logró un residuo de 0,43-0,48ppm, permaneciendo un 35% del residuo inicial luego de 28 días de almacenamiento a 4°C (Figura 1).

La utilización de otras moléculas también complementa el control de biotipos resistentes al IMZ, por lo que es importante conocer la dinámica del residuo de estos otros principios activos durante el almacenamiento. A nivel nacional se ha evaluado la efectividad del pirimetanil (PYR) (Figura 2 y Tabla 1) y del fludioxonil (Figura 1) para el control de biotipos sensibles y resistentes a IMZ, destacando el primero como una posible alternativa a ser aplicada en conjunto con IMZ. La concentración propuesta para lograr un control efectivo se sitúa entre 500 y 1000ppm en el caldo, siendo deseable también su aplicación conjunta con otras alternativas de manejo integrado. Es importante tener en cuenta que el PYR es una molécula altamente estable a 4°C, por lo que la disipación es mínima, siendo importante lograr un residuo adecuado (efectivo en el control y por debajo del LMR) en el momento de la aplicación (Figura 1). Por otro lado, el uso

continuado de este P.A. puede provocar desarrollo de resistencia por parte del patógeno, como se ha descrito en Argentina para una cepa aislada de plantas de empaque, la cual no fue controlada por la aplicación de 1000ppm (Vásquez et al., 2014). También se ha descrito recientemente en Sudáfrica la existencia de cepas con resistencia múltiple (IMZ, guazatina, tiabendazol y propiconazol) (Erasmus et al., 2015). Es así como la adopción de nuevos principios activos debe ser realizada en combinación con otras estrategias de manejo integrado (adición de sales, alta temperatura, desinfección y limpieza de bins, líneas de procesamiento de fruta y cámaras de almacenamiento) que permitan minimizar el posible desarrollo de resistencia a nuevos principios activos.

A continuación se presentan resultados nacionales sobre la evaluación de diferentes alternativas para ser aplicadas en combinación con fungicidas durante la postcosecha de frutos cítricos.

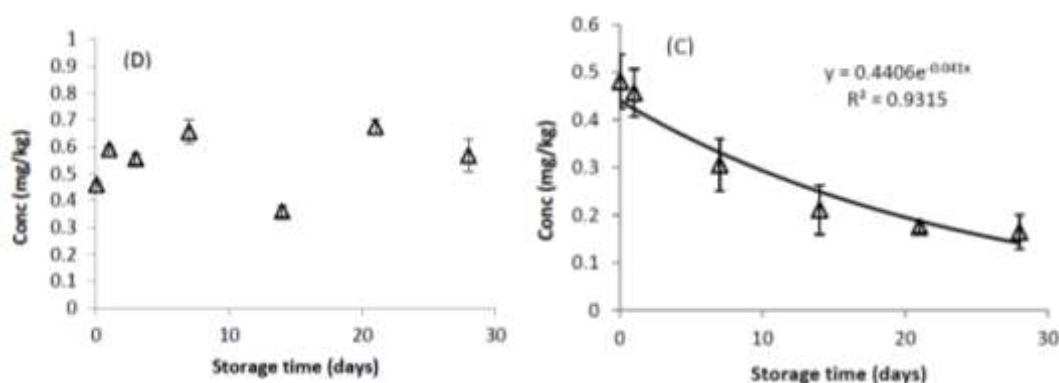


Figura 1. Curva de disipación del PYR (D) e IMZ (C) aplicados mediante cascada a razón de 1000ppm durante el almacenamiento a 4°C.

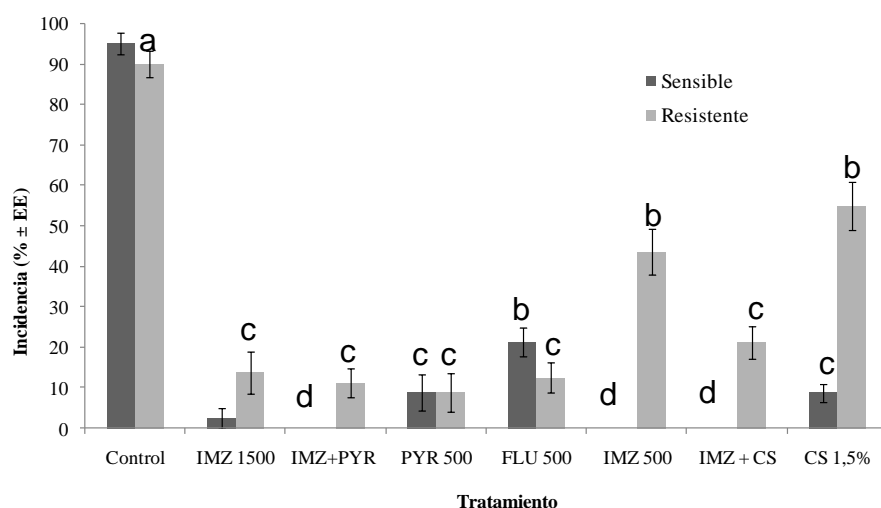


Figura 2. Incidencia de *P. digitatum* sensible y resistente al IMZ según tratamiento aplicado en Ellendale, luego de 15 días a 20°C. Medias seguidas de igual letra entre tratamientos no difieren significativamente (Tukey $p \leq 0,05$). Referencias: Control (fruta tratada con agua); IMZ1500= imazalil aplicado a 1500 mg L⁻¹; IMZ+PYR= imazalil 500 μ L L⁻¹ + pirimetanil 500 μ L L⁻¹ (Philabuster 500 μ L L⁻¹); PYR500= pirimetanil 500 μ L L⁻¹; FLU500=fludioxonil 500 μ L L⁻¹; IMZ500=imazalil 500 mg L⁻¹; IMZ+CS= imazalil500 mg L⁻¹+carbonato de sodio 1,5 %; CS1,5%= carbonato de sodio 1,5 %.

Tabla 1. Incidencia y esporulación (%) de *P. digitatum* sensible y resistente al IMZ según tratamiento aplicado en naranjas Valencia, luego de 15 días a 20°C

Tratamiento	Incidencia (%)		Esporulación (%)	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
Control (agua)	83,0 a	65,0 a	72,5 a	58,8 a
Sorbato de K (SP) 1 % (p/v)	30,5 b	60,0 a	22,5 c	50,0 a
SP 2 % (p/v)	58,5 a	28,0 b	47,5 b	25,0 b
SP 3 % (p/v)	29,0 b	35,5 b	21,3 c	30,0 b
Philabuster 750 µL L ⁻¹	3,50 c	5,25 d	2,60 d	6,25 d
IMZ 1500 mg L ⁻¹	1,10 c	10,0 cd	1,25 d	10,0 cd
IMZ 500 mg L ⁻¹	6,25 c	23,5 b	5,10 d	18,0 bc
IMZ 500 mg L ⁻¹ + SP 2 %	10,5 c	25,5 b	10,0 cd	22,5 b
Philabuster 750 µL L ⁻¹ + SP 2 %	4,10 c	3,55 d	5,10 d	3,75 d

Medias seguidas de igual letra dentro de la misma columna no difieren significativamente (Tukey $p \leq 0,05$)

*Evaluación de alternativas complementarias a los fungicidas en el manejo integrado de *Penicillium**

Diferentes opciones han sido evaluadas para apoyar el manejo integrado de *Penicillium* durante la postcosecha de frutos cítricos. En este contexto, destacan las aplicaciones de sorbato de K, bicarbonato o carbonato de Na y la aplicación de fosfitos (principalmente de Ca o K). Es importante destacar que todos estos compuestos no pueden ser pensados como sustitutos de los fungicidas sino como posibles “co-adyuvantes” que potencien el control del patógeno, enlenteciendo el crecimiento del mismo o modificando las condiciones del medio para que sea menos propicio para su desarrollo. Es así como la adición de carbonato de Na al 1,5% al IMZ potenció el control de biotipos resistentes en Ellendale (Figura 2), así como también provocó un enlentecimiento del crecimiento de ambos biotipos del patógeno en frutos sin fungicida (Figura 2). La adición de sorbato de K (2%) al caldo también provocó una reducción del crecimiento, principalmente del biotipo resistente (Tabla 1), aunque su adición a los fungicidas en el caso de naranjas Valencia no provocó una diferencia significativa en el control (Tabla 1). Este efecto sí fue observado en otras variedades, siendo más importante en el caso de mandarinas. En mandarina Satsuma Owari, la adición de sorbato de K-2%, fosfito de Ca (1%) o bicarbonato de Na (3%) en el drencher ha demostrado potenciar el control de ambos biotipos del patógeno a la salida del desverdizado en mandarina satsuma (Figura 2).

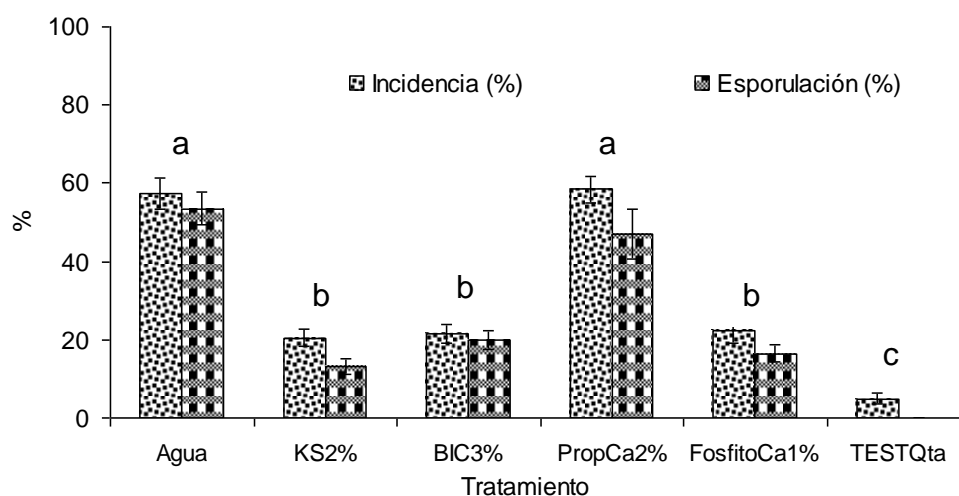


Figura 2. Incidencia y esporulación de *Penicillium digitatum* en Satsuma Owari inoculada según tratamiento en salida de desverdizado (96 horas 19-21°C 1-3ppm etileno y 95%HR) y 24 horas T ambiente. Referencias: KS2%=sorbato de potasio 2%p/v; BIC3%=bicarbonato de sodio al 3%p/v; PropCa2%=propionato de calcio al 2%p/v; Fosfito Ca 1%=fosfito de calcio al 1%v/v; TestQta=(guazatina1000ppm + procloraz 1000ppm + 2,4D 25ppm). Medias seguidas de igual letra entre tratamientos no difieren significativamente (Tukey $p \leq 0,05$).

La aplicación de fosfito de Ca (1%) puede constituirse como otra alternativa para ser combinada con fungicidas de forma de potenciar el control de *Penicillium* en mandarinas tempranas y durante el desverdizado (Tabla 2). Diferentes fosfitos, así como su efectividad han sido evaluados también por Cerioni et al (2013), presentando resultados alentadores. Resultados a nivel nacional muestran que existe cierta sinergia en el control en la mezcla de IMZ y fosfito de Ca 1% para el control de aislamientos resistentes al IMZ. Lo mismo ocurre con el PYR y los aislamientos sensibles (datos no mostrados). El fosfito de Ca 1% en mezcla con bicarbonato de Na 3%, así como la mezcla de este último con sorbato de K 1% alcanzaron un control efectivo de *P. digitatum* luego de 7 días a 20°C, no diferenciándose del testigo con fungicidas (guazatina y procloraz) (datos no mostrados). La combinación de sorbato de K y bicarbonato de Na posee una acción importante en sí misma, potenciando también el control de ambos aislamientos por parte de los fungicidas evaluados (IMZ y PYR) (datos no mostrados).

Tabla 2. Incidencia (%) de *Penicillium digitatum* en naranja navel inoculada según tratamiento aplicado en drencher, luego de 10 días a 20°C.

Cepa	Resistente	Sensible	p S vs R
Control	87,5 a	85,5 a	0,573
FCa1%	15,5 b	29,0 b	0,026
IMZ	12,0 b	6,0 cd	0,048
PYR	6,0 bc	10,5 c	0,069
FCa + IMZ	2,5 c	2,0 d	0,868
FCa + PYR	5,0 bc	5,5 cd	0,932

Referencias: FCa 1%=fosfito de calcio al 1%v/v; PYR= pirimetanil 487ppm; IMZ=imazalil 1000ppm. Medias seguidas de igual letra entre tratamientos no difieren significativamente (Tukey $p \leq 0.05$). Se presenta la comparación (p S vs. R) del aislamiento sensible versus el resistente al IMZ para cada tratamiento.

Conclusiones

El control de patógenos postcosecha no puede estar basado únicamente en la aplicación de fungicidas durante la postcosecha, sino en la integración de un paquete de medidas de control integrado que tiendan a minimizar la presencia del patógeno en el campo y planta de empaque. Es así como la limpieza y desinfección de cajones y bins, así como de cámaras y planta de empaque se vuelven claves para minimizar el inóculo del patógeno. El cambio de madera por plástico es una medida altamente recomendable para minimizar la presencia de inóculo. La adición de sales (sorbato de K y carbonatos) ha demostrado ser una alternativa para enlentecer el crecimiento y desarrollo de la infección y por tanto, colaborar en el control. La adición de fosfitos, durante el drencher o en la línea, puede constituirse como una estrategia integrada de control para potenciar los fungicidas.

El nivel de residuos en la fruta determina directamente el control, por lo tanto es deseable que la aplicación de IMZ alcance al menos 2-3 ppm en fruta entera, de forma de que el control del biotipo sensible sea adecuado. En el caso del biotipo resistente, la adición de sales o de PYR (500-1000ppm) potencia el control del patógeno. En relación a este P.A. hay que tener en cuenta que es una molécula muy estable y su disipación es mínima, por lo que esto debe ser tomado en cuenta a la hora de la aplicación, así como su persistencia en diferentes superficies. A su vez, también es posible el desarrollo de resistencia a esta molécula, ya descrita en Argentina, por lo que es imperioso integrarlo con otras medidas de manejo que aporten a reducir el nivel de inóculo del patógeno en plantas de empaque, minimizando el posible desarrollo de resistencia.

Bibliografía

Cerioni L, Rapisarda VA, Doctor J, Fikker S, Ruiz T, Fassel R, Smilanick, JL .2013. Use of phosphite salts in laboratory and semicommercial tests to control citrus postharvest decay. *Plant Disease*, **97**: 201-212.

Erasmus A, Lennox CL, Korsten L, Lesar K, Fourie PH. 2015. Imazalil resistance in penicillium digitatum and P. italicum causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. *Postharvest Biology and Technology* **107**:66-76.

Lado J, Pérez E, De Nigris A, Dol I, Knochen M. 2013. Residuos en frutos de naranja del fungicida imazalil aplicado en postcosecha y su efecto en el control de moho verde. *Agrociencia (Uruguay)*,**17**: 83-90.

Pérez E, Blanco O, Berreta C, Dol I, Lado J. 2011. Imazalil concentration for in vitro monitoring of imazalil resistant isolates of Penicillium digitatum in citrus packinghouses. *Postharvest Biology and Technology* **60**: 258-262.

Vázquez D, Panozzo M, Almirón N, Bello F, Burdyn L, Garrán S. 2014. Characterization of sensitivity of grove and packing house isolates of penicillium digitatum to pyrimethanil. *Postharvest Biology and Technology*, **98**:1-6.

Pudrición amarga: Evaluación del fruitgard pz100 (p.a. propiconazole) para el control de *Geotrichum citri aurantii*

Pérez, E¹., Besil, N²., Heinzen, H², Lado J¹.

¹Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay. ²Polo Agroalimentario y Agroindustrial Paysandú, Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República

Contacto: elenaperez@inia.org.uy; jlado@inial.org.uy

1. Introducción

La pudrición amarga en cítricos es provocada por un hongo similar a una levadura conocido como *Galactomyces citri-aurantii* E.E. Butler (anamorfo *Geotrichum citri aurantii* (Ferraris) E.E. Butler. El hábitat natural del hongo es el suelo y llega a la fruta por el salpicado de agua, por partículas de tierra movidas por el viento o por insectos. Generalmente no es capaz de provocar infecciones en campo, pero sí en postcosecha bajo ciertas condiciones tales como: fruta sobremadura, desverdizada o expuesta a condiciones de temperatura y humedad relativa altas. En Uruguay, tradicionalmente el patógeno ha sido controlado mediante la aplicación postcosecha de sulfato de guanidina (Guazatina). Sin embargo, este producto fue restringido para su uso en la Unión Europea, no está registrado en Estados Unidos y esto obliga a pensar en otros fungicidas alternativos para controlar la enfermedad. Los objetivos del presente trabajo fueron: a) evaluar el efecto del Fruitgard PZ100 (Propiconazole 9,8%) en el control de la pudrición por *Geotrichum citri aurantii* en fruta cítrica b) conocer la mínima concentración del fungicida que inhibe *in vitro* el desarrollo del patógeno y, c) evaluar el residuo efectivo sobre la fruta para el control de una cepa sensible al producto.

2. Materiales y métodos.

2.1 Patógeno

Para las inoculaciones artificiales, se utilizó un aislamiento de campo de *Geotrichum citri aurantii* (G0FL). La concentración fue ajustada a 10^6 esporas.mL⁻¹ con el auxilio de una cámara de Neubauer y se agregó cicloheximida a razón de 10 µg.mL⁻¹.

2.2 Evaluación de la efectividad del fungicida. Tratamientos e inoculación

Se trabajó con frutos de naranja dulce var. Valencia cosechada en predios comerciales el 28 de febrero y 12 de marzo de 2014 (un día previo a la inoculación). En laboratorio, la fruta fue lavada y desinfectada superficialmente. Luego de enjuagada y secada fue inoculada con un punzón de 2 mm de profundidad y 1 mm de ancho embebido en la solución de esporas. Posteriormente, la fruta se mantuvo a temperatura controlada a 20 °C durante 18-20 h, hasta la aplicación de los distintos tratamientos por inmersión durante 30 s a razón de 600 mL cada 100 L. El testigo consistió en fruta inoculada y bañada con agua. La fruta fue colocada sobre maples de cartón y se cubrieron durante 7 d con bolsas de nylon asperjadas internamente con agua para mantener las condiciones de humedad necesarias para el

desarrollo de las infecciones del patógeno. Los productos utilizados fueron: Fruitgard AG20 (p.a. Guazatina 20,4 %) y Fruitgard, PZ 100 (Propiconazole 9.8%) ambos proporcionados por la firma Enzur S.A.

2.3 Evaluación del residuo efectivo de Propiconazole en fruta.

Se utilizó fruta de mandarina Clementina madura, la cual fue desinfectada y tratada con 500 ppm de Imazalil para evitar las infecciones con *Penicillium* spp. Posteriormente la fruta fue inoculada con *G. citri aurantii* y la misma se mantuvo en cámara húmeda por 18-20 h, cuando fue tratada por inmersión 60s con el fungicida. Las concentraciones de Propiconazole aplicadas fueron 600, 1000 y 2000 ppm. El testigo fue tratado con agua. Luego de la aplicación y secado de los frutos, se realizó la determinación de residuos de Propiconazole en fruta entera. El resto de la fruta se mantuvo durante 20 d a temperatura de $1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y posteriormente la fruta se mantuvo por un período de 7 d a $15-20^{\circ}\text{C}$, evaluándose la incidencia de la enfermedad y realizando el análisis del residuo de propiconazol remanente sobre la fruta el día de aplicación y tras 20 y 27 d de almacenamiento.

2.4 Mínima concentración Inhibitoria.

Durante la primavera 2014 se realizó una prospección de aislamientos de *G. citri aurantii* de diferentes zonas y cuadros en producción. En total se obtuvieron 151 aislamientos de predios de Salto, Paysandú y San José y 13 aislamientos de plantas de empaque. Para todos los aislamientos se realizaron cultivos monospóricos que fueron testados por patogenicidad en frutos de estación sobremaduros. La mínima concentración inhibitoria fue realizada para 127 aislamientos utilizando placas de 24 pocillos. Las dosis utilizadas fueron entre 0,2 y 2,5 ppm de principio activo.

2.3 Análisis estadístico

Para la evaluación del efecto fungicida, se realizaron 6 repeticiones de 25 frutas cada una por tratamiento y para la evaluación del efecto del residuo efectivo sobre la fruta se utilizaron 3 repeticiones de 10 frutas cada una. En ambos casos se realizó un diseño completamente al azar. Los datos fueron analizados mediante el procedimiento GLM programa SAS (SAS Institute INC., Cary, NC.). La comparación de medias se realizó mediante el test de Tukey ($p \leq 0,05$). El experimento se repitió dos veces.

3. Resultados

3.1 Evaluación de la efectividad del fungicida

La efectividad del Propiconazole para controlar *Geotrichum* fue similar o incluso superior al control logrado con Guazatina en ambos ensayos realizados en naranja Valencia (Cuadro 1). Esto sugiere a este principio activo como una posible alternativa para el control postcosecha de este patógeno.

Cuadro 1. Incidencia de *Geotrichum citri aurantii* (%) en naranja Valencia artificialmente inoculada y tratada con fungicidas.

Tratamiento	Ensayo1	Ensayo2
Control	90,0 a	76,0 a
Guazatina	20,0 b	2,60 b
Propiconazol	2,60 c	0,60 b
C.V.	21,9%	15,9%

Medias seguidas de la misma letra no se diferencian significativamente Test de Tukey ($p \leq 0,05$)

3.2 Evaluación del residuo efectivo de Propiconazole para el control de podredumbre amarga

Durante el almacenamiento refrigerado a 1°C no se registró incidencia del patógeno (tampoco en los frutos control no tratados con fungicidas), lo que sugiere una incapacidad del hongo para desarrollarse efectivamente a esta temperatura. Se comprueba la necesidad de contar con fruta bien madura y condiciones de alta humedad relativa para que se desarrolle la enfermedad. La incidencia de podredumbres se registró únicamente al trasladar los frutos a condiciones de vida mostrador (Cuadro 2) en donde la incidencia fue de un 80% en el control y de 30% en los frutos tratados con 600ppm (dosis de etiqueta). En el caso de frutos tratados con 1000 y 2000ppm, el control fue efectivo, siendo menor al 10% la incidencia registrada y sin diferencias entre ambos tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Incidencia (%) de *Geotrichum* en mandarinas clementina tras 20 d de cuarentena por frío y 7 d de vida mostrador a 20°C.

Tratamiento	Incidencia (%)
Control	80 ± 10^a
600ppm	30 ± 5,0 ^b
1000ppm	6,7 ± 2,0 ^c
2000ppm	3,5 ± 2,0 ^c

Medias seguidas de la misma letra no se diferencian significativamente Test de Tukey ($p \leq 0,05$)

La determinación del nivel de residuos en fruta mostró por un lado, que durante el almacenamiento refrigerado no se observó disipación de los mismos, siendo un producto altamente estable. Por otro lado, durante el almacenamiento en mostrador la disipación fue mínima obteniéndose una vida media de aproximadamente 40 días. Los resultados mostraron también la necesidad de lograr un residuo de al menos 3 mg kg⁻¹ en fruta para un control aceptable del patógeno (Cuadro 3). Cabe destacar que estos resultados deben ser confirmados en otras variedades, aunque en el caso de mandarinas Clementinas, un residuo inferior a 2 mg kg⁻¹ en el momento de la aplicación no sería efectivo para reducir la incidencia del patógeno, una vez que los frutos son removidos del almacenamiento refrigerado (Cuadro 2).

Cuadro 3. Residuos de Propiconazole (mg kg^{-1}) en fruta entera en el momento de aplicación (0d) y tras 20 d de cuarentena por frío (20d) y 7 d de vida mostrador a 20°C (20d+7d)

Tiempo	600 ppm	1000 ppm	2000 ppm
0 d	$1,82 \pm 0,01$	$3,11 \pm 0,11$	$3,68 \pm 0,23$
20d	$1,39 \pm 0,04$	$3,23 \pm 0,07$	$3,63 \pm 0,11$
20d+7d	$1,51 \pm 0,04$	$3,11 \pm 0,11$	$3,01 \pm 0,11$

3.3 Mínima concentración inhibitoria de Propiconazole

Los resultados sugieren la existencia de sensibilidad diferencial a este principio activo entre la población de aislamientos colectada. Se destaca un número importante de aislamientos con capacidad para desarrollarse a concentraciones de 1 mg kg^{-1} o superiores de Propiconazole en placa (Figura 1). Se destaca entonces la importancia de lograr un residuo adecuado sobre la fruta para evitar también el desarrollo de nueva resistencia a este principio activo.

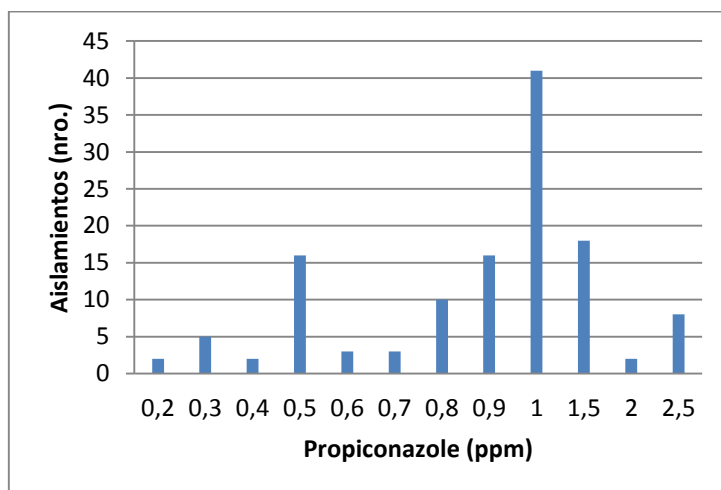


Figura 1. Número de aislamientos inhibidos *in vitro* por diferentes concentraciones de Propiconazole (ppm).

4. Conclusiones

- ✓ Fruitgard PZ100 tuvo un buen comportamiento para el control de *Geotrichum citri aurantirii* inhibidos por 1 mg kg^{-1} de Propiconazole en medio de cultivo.
- ✓ Se recomienda la aplicación de **dosis mayores a 600 ppm**, obteniéndose un control aceptable a partir de 1000 ppm y con un residuo en fruta de al menos 3 mg kg^{-1} en el momento de aplicación
- ✓ Algunas cepas fueron resistentes a $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de Propiconazole *in vitro* lo que confirma la necesidad de tener especial cuidado en las aplicaciones para obtener los niveles de residuos en fruta recomendados.

CORTINAS FORESTALES EN CITRICULTURA: ASPECTOS SANITARIOS Y ALTERNATIVAS

Cortinas forestales en citricultura: aspectos sanitarios

Demian Gómez, Sofía Simeto.

Programa Nacional de Investigación Forestal. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Tacuarembó. Uruguay.

Contacto: dgomez@tb.inia.org.uy

Resumen

La forestación en Uruguay ha crecido considerablemente durante los últimos 20 años a partir del impulso político de la década del 80 con la aprobación de la Ley N° 15939. A partir de la puesta en vigor de dicha ley, el área forestada creció hasta alcanzar al presente 962.000 hectáreas plantadas siendo *Eucalyptus* y *Pinus* los principales géneros plantados.

La especie *Casuarina cunninghamiana* ha sido extensamente utilizada como cortina en el sector citrícola en Uruguay. En los últimos años se ha observado muerte de cortinas en predios citrícolas por parte de escarabajos de ambrosía, principalmente platipodinos. La especie detectada, *Megaplatypus mutatus*, es una especie de distribución sudamericana con un amplio rango de hospederos que produce galerías en el xilema para reproducirse y alimentarse, siendo causante de quiebre y muerte en ataques severos. Si bien existen especies alternativas de *Eucalyptus* o *Pinus* para ser utilizadas como cortinas, es importante considerar la implementación de buenas prácticas silvícolas para asegurar la viabilidad de las cortinas ante potenciales problemas sanitarios. En nuestro país, el incremento del área forestada y la apertura de fronteras al tránsito de productos forestales, han generado un aumento de los problemas sanitarios debidos a la introducción y establecimiento de nuevas plagas y enfermedades desde áreas donde los árboles son nativos hasta los nuevos ambientes. En este escenario resulta de importancia considerar aspectos sanitarios al momento de la elección de especies alternativas para utilizar como cortinas.

Evaluación del crecimiento de especies de *Eucalyptus*

Fernando Resquin, Gustavo Balmelli.

Programa Nacional de Investigación Forestal. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Tacuarembó. Uruguay.

Contacto: fresquin@tb.inia.org.uy

Resumen

La evaluación del comportamiento de especies de *Eucalyptus* surge como una necesidad que tenía el sector forestal a partir de la ley de promoción de la forestación implementada a finales de los años 80.

Si bien el país contaba con cierta experiencia en el rubro había una importante carencia de información en cuanto al comportamiento de varias especies plantadas en el país desde el punto de vista de su adaptación a los denominados suelos de prioridad forestal definidos por la mencionada ley la cual se mantiene vigente en varios de los aspectos originales.

A raíz de esto, el Programa Forestal del INIA instaló una serie de ensayos en todos los grupos de suelos referidos y en algunos casos en sitios considerados marginales para el crecimiento de los árboles. A su vez, se comenzó con la evaluación de las especies contenidas en la ley y con otro grupo que por su comportamiento en su país de origen (Australia) se asumía que podían tener un buen desempeño en nuestras condiciones.

Como resultado de esto se generó información de especies y orígenes en las distintas zonas del país desde el punto de vista del crecimiento, forma del fuste, propiedades de la madera, comportamiento sanitario, entre otras. A su vez, se instalaron montes para la producción de semilla mejorada de las especies más plantadas tanto por las empresas del sector como por productores que utilizan a la forestación con el objetivo de sombra, abrigo y madera para uso propio.

Bibliografía - CORTINAS FORESTALES EN CITRICULTURA: ASPECTOS SANITARIOS

Alonso, R. 2014. Cancro resinoso del pino. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 35. 2 p.

Bollazzi, M. 2014. Hormigas cortadoras de hojas *Acromyrmex* spp. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 36. 2 p.

Cibils, X.; Gómez, D. 2014. Avispa taladradora de la madera. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 26. 2 p.

Cibils, X.; Gómez, D. 2014. Gorgojo del eucalipto. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 29. 2 p.

Gómez, D. 2012. Escarabajos de corteza en Uruguay: situación actual y perspectivas. Revista INIA 30: 48-51.

Gómez, D.; Martínez, G; Beaver, R. A. 2012. First record of *Cyrtogenius luteus* (Blandford) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in the Americas and its distribution in Uruguay. The Coleopterists Bulletin 66: 362–364.

Gómez, D.; Martínez, G. 2013. Bark beetles in pine tree plantations in Uruguay: First record of *Orthotomicus erosus* Wollaston (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). The Coleopterists Bulletin 67(4): 470–472.

Gómez, D.; Reyna, R.; Pérez, C.; Martínez, G. 2013. First Record of *Xyleborinus saxesenii* (Ratzeburg) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in Uruguay. The Coleopterists Bulletin 67(4): 536–538.

Gómez, D. 2014. Escarabajos de ambrosía. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 24. 2 p.

Gómez, D. 2014. Escarabajos de corteza de pino. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 25. 2 p.

Gómez, D. 2014. Estacionalidad del vuelo en escarabajos de corteza de pino en Uruguay. Serie Técnica INIA 213: 9-15.

Gómez, D. 2014. Gorgojo del pino. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 44. 2 p.

Gómez, D. 2014. Variación estacional de escarabajos de corteza en pino. Revista INIA 37: 55 - 58.

Gómez, D. 2015. Desarrollo e implementación del nuevo sistema de monitoreo de escolítidos en plantaciones comerciales de pino. Revista INIA 41: 31-34. ISSN 1510 9011

Gómez, D. 2015. Escolítidos en Uruguay; situación actual y perspectivas. SAD 750. 26 pp. ISSN 1688 9258.

Gómez, D. 2015. Taladro de los forestales. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 55. 2 p.

Jorge, C. 2014. Avispa agalladora del eucalipto. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 31. 2 p.

Jorge, C.; Gómez, D. 2014. Escarabajo amarillo del eucalipto. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 39. 2 p.

Jorge, C., Gómez, D., Martínez, G. 2014. La avispa agalladora del eucalipto *Leptocybe invasa*: reconocimiento, daños y posibles estrategias de manejo. Serie Técnica INIA 213: 1-8.

Jorge, C.; Gómez, D. 2014. Taladro de los eucaliptos. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 27. 2 p.

Martínez, G. 2014. Chinche del eucalipto. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 28. 2 p.

Martínez, G. 2014. Psílido de escudo. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 30. 2 p.

Martínez, G. 2014. Psílicos de los eucaliptos. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 40. 2 p.

Martínez, G., Gómez, D., Taylor, G. 2014. First record of the Australian psyllid *Blastopsylla occidentalis* Taylor (Hemiptera, Psylloidea) from Uruguay. Transactions of the Royal Society of South Australia 138 (2): 231-236.

Martínez, S.; Lupo, S.; Bettucci, L. 2014. Podredumbre de árboles en pie. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 41. 2 p.

Palladino, C.; Pérez, G.; Pérez, C. 2014. Mancha foliar bacteriana. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 43. 2 p.

Palladino, C.; Pérez, G.; Pérez, C. 2014. Tizón apical bacteriano. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 45. 2 p.

Pérez, G.; Pérez, C. 2014. Cancro por *Botryosphaeria*. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 37. 2 p.

Reyna, R.; Pérez, C. 2014. Marchitamiento por *Ceratocystis*. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 38. 2 p.

Simeto, S. 2014. Roya del eucalipto. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 33. 2 p.

Simeto, S.; Balmelli, G. 2014. Cancros por *Coniothyrium*. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 32. 2 p.

Simeto, S.; Balmelli, G.; Pérez, C. 2014. Mancha por epicoccoides. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 42. 2 p.

Simeto, S.; Balmelli, G.; Torres, D.; Pérez, C. 2014. Mancha amarilla del eucalipto. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 34. 2 p.

Simeto, S.; Balmelli, G.; Pérez, C.; Pérez, G. 2014. Mancha foliar causada por *Teratosphaeria nubilosa*. Montevideo, UY: INIA. Cartilla de reconocimiento a campo de plagas y enfermedades forestales N° 46. 2 p.

Bibliografía - EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE ESPECIES DE EUCALYPTUS

Resquin, F.; Balmelli, G. 2010. COMPORTAMIENTO INICIAL DE DIFERENTES FUENTE DE SEMILLA *Eucalyptus tereticornis* EN ZONA 7. En: Alternativas Tecnológicas para suelos de Arenisca/Día de Campo en la Unidad Experimental La Magnolia. Diciembre. P.27-32

Resquin, F.; Balmelli, G. 2008. SAD 557. Desarrollo de una raza local de *E.tereticornis* de buen potencial productivo para las condiciones del Uruguay: inicio de un plan de mejora genética. p. 39-48. En: Jornada Técnica: "Eucaliptos colorados: mejoramiento genético, propiedades y usos de la madera" INIA Tacuarembó.

Resquin, F.; Balmelli, G. 2008. Seminario sobre Eucaliptos colorados. 9. 12-15. Forestal – 36. Revista de la Sociedad de Productores Forestales. Año XII.

Resquin, F.; Balmelli, G. 2009. Comportamiento inicial del diferentes fuentes de semilla de *Eucalyptus tereticornis* en zona 8. SAD 584. INIA Tacuarembó. p.7-14

Resquin, F.; Balmelli, G. 2009. Evaluación de varias fuentes de semilla de *Eucalyptus dunnii* al noveno año. SAD 584. INIA Tacuarembó Agosto 2009. p.21-26

Balmelli, G.; Resquin, F. Mejora genética en *Eucalyptus grandis*: Productividad y calidad de la madera. SAD 584. INIA Tacuarembó. p.27-34

Balmelli, G.; Resquin, F. 2009. Evaluación del comportamiento en zona 8 de la semilla de *E.grandis* mejorada por el INIA. SAD 584. INIA Tacuarembó p.35-38.

Resquin, F. Bennadji, Z. Productividad de varias fuentes de semilla de *E.maidenii* al noveno año. En: Día de campo Forestal "Mejoramiento genético y manejo de especies de *Eucalyptus*" Serie Actividad de Difusión 491 INIA Tacuarembó. Mayo de 2007. p. 5-11.

Resquin, F. Evaluación de especies y fuentes de semilla de *Pinus*. En: "30 años de investigación en areniscas" p. 335-347. Octubre 2006. Serie Técnica 159. INIA Tacuarembó

Resquin, F. Evaluación de fuentes de semilla de *Eucalyptus maidenii*. Día de campo forestal en la región sureste. Setiembre 2006. Serie Actividades de Difusión No. 462. p. 11-16.

Balmelli, G.; Resquin, F. Productividad de diferentes especies de Eucalyptus sobre areniscas de Tacuarembó-Rivera. En: "30 años de investigación en areniscas" p. 305-312. Octubre 2006. Serie Técnica 159. INIA Tacuarembó.

Balmelli, G.; Resquin, F. Comportamiento productivo de la semilla de Eucalyptus grandis en primera generación. En: "30 años de investigación en areniscas" p. 317-320. Octubre 2006. Serie Técnica 159. INIA Tacuarembó.

Balmelli, G.; Resquin, F. Comportamiento de especies de Eucalyptus para sombra y abrigo en suelos sobre basalto. Revista INIA No. 5 2005. p. 25-27.

Balmelli, G.; Resquin, F. E.colorados: una alternativa para la diversificación productiva. Revista INIA No. 7. 2006 p. 35-37.

Balmelli, G.; Resquin, F.; COMPORTAMIENTO DE ESPECIES DE EUCALYPTUS PARA SOMBRA Y ABRIGO EN SUELOS SOBRE BASALTO. En. Día de campo: Producción animal, pasturas y forestación ". Serie Actividades de Difusión Nro 431. INIA Tacuarembó Octubre 2005.

Bibliografía adicional

A continuación se enlista una breve revisión bibliográfica sobre el tema cortinas forestales con el objetivo de tener información específica sobre el tema.

Algorta, G.. Las casuarinas: un género útil con poca mejora. 2012. INIA Serie Actividades de Difusión ; 697. p. 41-47

J.R. Brandle¹, L. Hodges and X.H. Zhou. **Windbreaks in North American agricultural systems. 2004.** Agroforestry Systems. Vol 61. Issue 1.p. 61: 65–78

John Owen-Turner, Sandra Hardy. Citrus Fact Sheet: Windbreaks for Citrus. 2006. CITTgroups, Australia.
Bill Castle, Lake Alfred. Windbreak Plant Species for Florida Citrus Groves. Citrus Research and Education Center. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. 2009.

Bijay Tamang, Michael G. Andreu, Melissa H. Friedman, and Donald L. Rockwood. Management of Field Windbreaks. 2009. FOR290. School of Forest Resources and Conservation Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida

Michael G. Andreu, Bijay Tamang, Donald L. Rockwood, and Melissa H. Friedman. 2009. FOR286. School of Forest Resources and Conservation Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida

Wray, P., L. Sternweis, and J. Lenahan. Farmstead windbreaks: establishment, care, and maintenance. 2005. PM 1717. Iowa State University Extension publication.

Craig Stange and James R. Brandle. Windbreak Management (series). 2006. EC1768. University of Nebraska - Lincoln Extension.

Rosenfeld, Moshe; Marom, Gil; Bitan, Arieh. Numerical Simulation of the Airflow Across Trees in a Windbreak. Boundary-Layer Meteorology. 2010, Vol. 135 Issue 1, p89-107.

Zhu Jiao-jun <mailto:jiaojunzhu@iae.ac.cn>, Jiang Feng-qj, Matsuzaki Takeshi. Spacing interval between principal tree windbreaks. Journal of Forestry Research June 2002, Volume 13, Issue 2, pp 83-90.

Alberto Daniel Golberg, Ulfilas Boldes & Jorge Colman. La protección de los cultivos de los efectos del viento. Viento, suelo y plantas. Libro. A. Golberg y A Kin (Eds.). 2003. INTA.

Aportes al conocimiento de las moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en el Uruguay

María V. Calvo¹, Felicia Duarte², Soledad Delgado¹, Mónica Ziminov¹, Alejandra Borges¹, Gabriela Asplanato¹, Elina Zefferino², Iris B. Scatoni¹

¹Facultad de Agronomía, UDELAR; ²Dirección General de Servicios Agrícolas, MGAP, Uruguay

Contacto: iscatoni@fagro.edu.uy

Introducción

Las moscas de la fruta son especies particularmente dañinas y cuarentenarias que limitan el acceso de la fruta fresca a diferentes mercados. La conquista de esos mercados, en general los de mayor poder adquisitivo, pasa por bajar los niveles de prevalencia de la o las especies (según el destino) para que estas no constituyan un riesgo para el país importador. La solución al problema de las moscas de la fruta pasa por desarrollar y validar una serie de tácticas de control que trascienden al predio y que deben integrarse en un manejo regional o de áreas extensas (Vreysen et al. 2007, Vargas et al. 2008), para lo cual sin duda hay que ensayar dichas tácticas pero también generar información de base no existente a nivel del país para poder implementarlas con éxito.

El **objetivo** de la línea de investigación que aquí se presenta es generar conocimiento para disminuir la incidencia de las moscas de la fruta a niveles aceptables y reducir las aplicaciones de insecticidas en los cultivos de frutales. El fin último es que se pueda desarrollar en el país un programa específico para estas plagas, que incluya la integración de tecnologías basadas en la biología de los insectos, económicamente viable, ambientalmente amigable y sostenible en el tiempo. Según Vargas et al. (2008) las medidas a integrar son la recolección y destrucción de la fruta de descarte, la aplicación de cebos tóxicos, el trampeo masivo, la liberación de machos estériles y la conservación o liberación de parasitoides. Estas medidas deben integrarse en un orden preciso, las dos últimas tácticas solo pueden aplicarse una vez que las anteriores han logrado bajar los niveles de la población, lo cual se determina a través del monitoreo exhaustivo.

La abundancia de las poblaciones de las moscas van a depender de la disponibilidad de hospederos en la zona, razón por la cual la primera pregunta que nos planteamos responder fue: ***Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus* comparten los mismos hospederos?** Según la literatura la polifagia observada por estas dos especies y la presencia de hospederos cultivados y silvestres asegura que las poblaciones puedan desarrollarse durante todo el año por lo menos en algunas zonas (Ovrusky et al. 2003). La mosca del mediterráneo puede prosperar en ambientes muy perturbados y la mosca sudamericana vive mejor en áreas donde existen remanentes de vegetación nativa o en los sitios donde predominan sus hospederos nativos en relación a los introducidos (Ovrusky et al., 2003).

Lo anterior llevó a plantear la segunda pregunta: ***Ceratitís capitata* y *Anastrepha fraterculus* comparten el mismo hábitat?**

Además de la disponibilidad de hospederos, los factores abióticos como temperaturas máximas y mínimas, humedad relativa y lluvias influyen de forma significativa en la abundancia de las poblaciones de las moscas de la fruta (Segura et al., 2004; Santos, 2008; Vayssières et al., 2009). Estos factores afectan el desarrollo, la sobrevivencia de los diferentes estados de desarrollo, la fecundidad y la longevidad de los adultos. En algunas zonas la temperatura es el único factor climático que parece tener efecto en la abundancia de adultos de *C. capitata* y en la infestación de los frutos (Segura et al., 2004). En zonas subtropicales donde la temperatura fluctúa dentro de niveles óptimos, la abundancia de *C. capitata* está afectada principalmente por las precipitaciones y la humedad relativa (Harris y Lee, 1987). Los factores climáticos también pueden incidir indirectamente en las poblaciones de los tephritidos al afectar la regulación ejercida por factores bióticos. Por ejemplo la humedad del suelo afecta la sobrevivencia de las pupas de las moscas de las frutas al afectar el desarrollo de hongos entomopatógenos (Ekesi et al., 2003). También este factor unido al tipo de suelo, influye en la emergencia de los adultos de forma diferencial según la especie. Bento (2008) encontró que la emergencia de *C. capitata* es mayor en suelos secos independiente del tipo, sin embargo la emergencia de *A. fraterculus* está influenciada por la interacción entre tipo de suelo y humedad, siendo mayor en suelos con mayor capacidad de retención de agua. En función de la literatura antes citada, formulamos la tercera pregunta: **las condiciones climáticas permitirán explicar las diferencias en abundancia que se observan en los diferentes períodos?**

Otro de los factores bióticos que influyen en las poblaciones son los enemigos naturales. En cada región existe un guild de parasitoides larval-pupal que está viviendo sobre las moscas de la fruta. Se ha encontrado que la variedad hospedante juega un papel importante en el parasitismo, en algunas de ellas no se encuentran parasitoides, por ejemplo en cítricos en algunas regiones y sin embargo son abundantes en las especies frutales nativas. Una explicación puede ser la especie de tephritido que ataca en cada especie frutal. Los parasitoides nativos no atacarían *C. capitata* y sí parasitarían a *A. fraterculus*. La estrategia de conservación de enemigos naturales puede ser empleada para el control de *A. fraterculus* en zonas donde existen remanentes de vegetación nativa adyacentes a los frutales cultivados (Ovrusky et al., 2004). Este es un aspecto no investigado hasta el presente, entonces nos planteamos una pregunta para ello: **cuál será el papel del parasitismo en nuestro país?**

Materiales y Métodos

Para responder las preguntas antes planteadas, se están llevando a cabo trabajos en los Departamentos de Salto, Paysandú, San José, Canelones y Montevideo. Para determinar si *Ceratitís capitata* y *Anastrepha fraterculus* se desarrollan en los mismos hospederos, se realizaron colectas periódicas de noviembre 2013 a mayo 2015 de frutos maduros susceptibles al ataque de tephritidos en hospederos silvestres y cultivos comerciales. En frutales, las colectas estuvieron dirigidas a cultivos donde se contaba con antecedentes de ataques de moscas de la fruta o se registraron capturas en trampas, así como en sus alrededores. Esta prospección se realizó también en sitios con diversidad de hospederos nativos en áreas con historial de daños de moscas. Dado que la fruta atacada por estos insectos se puede caer prematuramente, la colecta se realizó tanto en la planta (P) como

en el suelo (S) debajo de la copa. Los frutos fueron llevados al laboratorio donde se los pesaron y acondicionaron individualmente en recipientes de plástico con el fondo cubierto por arena. Los recipientes fueron observados diariamente y la arena tamizada para detectar la presencia de larvas y pupas de moscas de la fruta. Las pupas fueron contabilizadas y trasladadas a placas Petri a la espera de la emergencia de adultos o parasitoides. Los adultos y parasitoides obtenidos en laboratorio fueron contados, sexados e identificados. Un mes antes de iniciados los muestreos de frutos se colocaron trampas McPhail cebadas con proteína hidrolizada y Jackson cebadas con trimedlure en distintos establecimientos comerciales de las zonas norte y sur del país, con diversidad de hospederos cultivados: frutales de hoja caduca, nativos y cítricos. Se colocaron entre 15 y 30 trampas por establecimiento dependiendo de la superficie, separadas entre sí al menos por 50 m, tratando de cubrir los diferentes cultivos presentes. En la mayoría de los establecimientos frutícolas las trampas se mantiene aún colocadas, se revisan quincenalmente y se les hace el mantenimiento y recambio con la frecuencia necesaria según el tipo de trampa. Los adultos colectados se contabilizaron, se sexaron en el caso de las trampas McPhail y se calcularon los MTD. La metodología aplicada además de aportar información sobre la fluctuación de las poblaciones de las moscas de la fruta objeto de estudio permitió determinar si ambas especies estaban presentes en el mismo establecimiento y cultivo simultáneamente.

Las variables climáticas, temperaturas máximas, mínimas, medias y las precipitaciones registradas en las Estaciones Meteorológicas de INIA Salto Grande e INIA Las Brujas desde junio de 2012 a agosto 2015, fueron analizadas y comparadas con los registros de capturas en las diferentes trampas.

Resultados

A continuación se presentan los resultados de esta línea de investigación, organizados por cada una de las preguntas que se formularon y para las cuales hay a la fecha algunos avances. Más detalles pueden encontrarse en Calvo et al (2014), Delgado et al (2014, 2015).

Ceratitis capitata y *Anastrepha fraterculus* comparten los mismos hospederos?

Los resultados corresponden a las emergencias de tefrítidos ocurridas hasta mediados de junio de 2015. Se recogieron 5802 frutos (430.5 kg), de los cuales 3858 (253.2 kg) provenían de los Departamentos de Salto y Paysandú y 1944 (177.3 kg) de la zona sur. Aproximadamente el 60% de los frutos fue colectado en la planta y el otro 40% provenía de frutos caídos, que se recogieron en el suelo, debajo de la copa (Cuadro 1).

Emergieron de los frutos acondicionados en laboratorio 674 especímenes de *A. fraterculus* y 848 de *C. capitata*, el 67% y 69% de los adultos respectivamente se obtuvieron de frutos recogidos en el suelo. No se observan diferencias significativas ($\chi^2 > 0.05$) entre machos y hembras emergidos de fruto, por lo cual la proporción sexual en ambas especies es cercana a 1:1. En general, *A. fraterculus* se detecta con mayor frecuencia sobre frutos nativos, no está presente en cítricos excepto en pomelo, en cambio *C. capitata* está presente en casi todos los hospederos. En *A. sellowiana* y *Acanthosyrus spinescens* (quebracho flojo) se registraron emergencias de ambas especies de moscas en el mismo fruto, lo cual ocurrió solo excepcionalmente.

***Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus* comparten un mismo hábitat?**

En función de las capturas registradas en cítricos y frutales de hoja caduca pudo observarse que ambas especies de moscas están presentes en un mismo establecimiento, a densidades diferentes, pero no lo hacen en forma simultánea (Figura 1). Lo anterior nos lleva a plantear dos hipótesis, la primera es que *C. capitata* está mejor adaptada al ambiente de cultivos y es más agresiva por lo que desplaza a *A. fraterculus* del hábitat, y la segunda es que las condiciones climáticas favorables para ambas especies son diferentes y por ello una predomina en primavera y la otra lo hace hacia el verano y otoño. Si bien este comportamiento se determinó a través de las trampas, también pudo ser corroborado en algunos casos a partir de los muestreos de frutos. El guayabo del país, *Acca sellowiana*, fue el hospedero donde se observó una gran abundancia de ambas especies en sus frutos, no obstante *C. capitata* aparece en este hospedero tardíamente, cuando los frutos de las especies comerciales no están presentes por haber sido cosechadas o por no estar próximos a maduración.

Cuadro 1. Especies de moscas de la fruta registradas en diferentes hospederos, e intensidad del ataque registrado a través del número de pupas/kg de fruta colectada en la planta o en el suelo, debajo de la copa.

Fruto	<i>Ceratitis capitata</i>	<i>Anastrepha fraterculus</i>	Pupas/kg fruta muestreada en la planta	Pupas/kg fruta muestreada en el suelo
Durazno	P	P	18	
Pera William's	P	P	2	15
Manzana	N	N		
Mandarina Clementina	P	N	8	
Mandarina Ortanique	P	N	9	
Naranja Navel	P	N	0	3
Naranja Valencia	P	N	9	6
Pomelo Duncan	P	P	6	
Pomelo StarRuby	P	P	1	
Mandarina Afourer	P	P*	0	34
Bergamota	N	N		
Cidra	N	N		
Lima	N	N		
Limon rugoso	N	N		
Toronja	N	N		
Arazá Amarillo	P	P	100	54
Arazá Rojo	P	P	29	
Guaviyú	P	P		31
Guayabo brasileiro	P	P	1	3
Guayabo del País	P	P	45	128
Maclura	P	N		0
Mataojo Colorado	P	N		56
Mburucuyá	P	N	585	
Nispero	P	P	94	
Quebracho flojo	P	P	240	68
Ubajay	N	P	11	
Butiá	N	N		
Higo	N	N		
Kaki	N	N		
Kumquat	N	N		
Pitanga	N	N		

P = positivo, N = negativo, * = colectada en el suelo

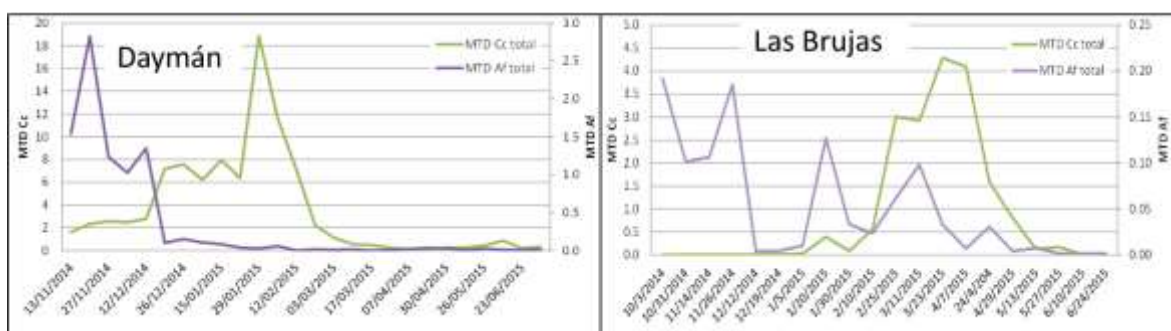


Figura 1. Capturas de *Ceratitís capitata* y *Anastrepha fraterculus* en Trampas McPhail, expresadas como MTD, en dos establecimientos cítricola (izquierda) y con frutales de hoja caduca (derecha) en Paysandú y Canelones respectivamente.

Las condiciones climáticas permitirán explicar las diferencias en abundancia que se observan en los diferentes períodos?

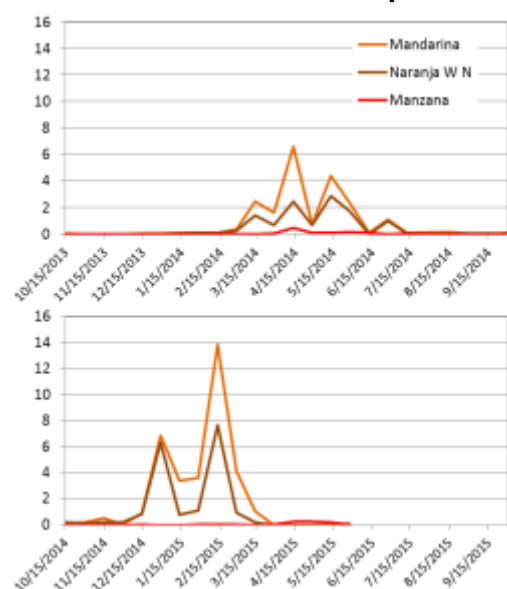


Figura 2. Capturas de *Ceratitís capitata* en trampas Jackson, expresadas como MTD, ubicadas en un mismo Establecimiento (Kiyú, San José) y en los mismos cultivos durante dos temporadas consecutivas.

En la temporada 2013-2014 las poblaciones de moscas de la fruta fueron menos abundantes y aparecieron hacia el otoño, en cambio en la siguiente temporada los primeros vuelos se registraron en primavera y se incrementaron hacia el verano y otoño. Algunos de los factores climáticos analizado y que incidieron para que ello sucediera fueron las intensas lluvias ocurridas en el verano 2014, que seguramente actuaron como uno de los factores de mortalidad retrasando la aparición de los vuelos de *C. capitata* lo que no ocurrió en la siguiente estación, que se caracterizó por un período de lluvias escasas. Seguramente contribuyeron también al crecimiento y aparición más temprana de las poblaciones en la temporada 2014-2015, las temperaturas invernales más elevadas y la ausencia de heladas.

Cuál es el papel del parasitismo en nuestro país?

Se obtuvieron 30 himenópteros parasitoides pertenecientes a cinco especies diferentes, todos incluidos en la Familia Braconidae. Estas especies han sido reportadas en la región como parasitoides nativos. El 77% de los parasitoides emergieron del mismo fruto que especímenes de *A. fraterculus*, por lo cual se puede asumir que los parasitoides utilizaron como hospedero a este tefrítido. El 23% de los parasitoides emergieron de frutos donde no se constató la emergencia de tefrítidos, pero si emergieron *A. fraterculus* de los demás frutos

que integraban la muestra, por lo cual podemos concluir que los parasitoides encontrados utilizaron también como especie hospedera a *A. fraterculus*.

Se registraron parasitoides tanto en el sur como en el norte del país, encontrándose tres especies de parasitoides en cada región, siendo *Opius bellus* el más frecuente en ambas regiones y las restantes solo fueron registradas para el norte o para el sur respectivamente. Los parasitoides se colectaron de frutos provenientes de cinco especies vegetales, cuatro fueron en frutos nativos y una en una pera que se encontraba en una plantación no comercial. El nivel de parasitismo fue muy bajo considerando los casi 6000 frutos que ingresaron al laboratorio, siendo sobre *Psidium cattleianum* donde se detectó el mayor nivel de emergencia de parasitoides. Esto resalta la importancia de los frutos nativos como reservorio para los parasitoides.

Conclusiones

La presencia de las moscas de la fruta en una zona particular sin duda está determinada por la presencia de sus hospederos, no obstante en su abundancia y momento de aparición de sus picos poblacionales influyen los factores abióticos, principalmente temperatura y precipitaciones, así como factores bióticos, como la presencia escasa de enemigos naturales.

Agradecimientos: A la ANII y al INIA por la financiación de los Proyectos FMV 6521 y FPTA 289 respectivamente.

Bibliografía

Bento, F. 2008. Influencia da umidade em quatro tipos do solo no desenvolvimento pupal de *Ceratitis capitata* (Wiedeman, 1824), *Anastrepha fraterculus* (Wiedeman, 1830), do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmed, 1905) e de *Gymnandrosoma aurantianum* Lima, 1927. Tesis. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brasil

Calvo, M.V.; Delgado, S.; Araujo, E.; Duarte, F.; Lorenzo, M.E.; Techeira, W.; Zefferino, E.; Asplanato, G.; García, F.; Scatoni, I.B. 2014. Fluctuación de poblaciones de las moscas de la fruta en la zona sur de Uruguay y su relación con los hospederos. In IV Simposio Nacional y I Congreso Latinoamericano de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus. Salto, 3-5 de noviembre de 2014. 4 p.

Delgado, S.; Calvo, M.V.; Araujo, E.; Duarte, F.; Lorenzo, M.E.; Techeira, W.; Zefferino, E.; Asplanato, G.; García, F.; Scatoni, I.B. 2014. Hospederos de las moscas de la frutas, *Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae), en Uruguay. In IV Simposio Nacional y I Congreso Latinoamericano de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus. Salto, 3-5 de noviembre de 2014. 4 p.

Delgado, S.; Techeira, W.; Calvo, M.V.; Zefferino, E.; Araujo, E.S.; Duarte, F.; Lorenzo, M.E.; Asplanato, G.; García, F.; Scatoni, I.B. 2015. Las moscas de las frutas, *Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) y su relación con los diferentes hospederos. In: 7º Encuentro Nacional de Frutos Nativos, Colonia 9 y 10 de abril. 6p.

Ekesi, S.; Maniania, N.; Mohamed S.; Lux S. 2005. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. Biological Control 35:83-91

Harris, E.J.; Lee, C.Y.L. 1987. Seasonal and annual distribution of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Honolulu and suburban areas of Oahu, Hawaii. Environ. Entomol. 16: 1273-1282.

- Ovruski, S.; Schliserman, P.; Aluja, M. 2003.** Native and introduced host plant of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in northwestern Argentina. J. Econ. Entomol. 96: 1108-1118.
- Ovruski, S.; Schliserman, P.; Aluja, M. 2004.** Indigenous parasitoids (Hymenoptera) attacking *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in native and exotic host plants in Northwestern Argentina. Biological Control 29: 43-57.
- Santos, W. 2008.** Zoneamento ecológico de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) em dois cenários climáticos no Brasil. Tesis Doutorado. Piracicaba, 2008. 96p.
- Segura, D.; Vera, T.; Cladera, J. 2004.** Fluctuación estacional en la infestación de diversos hospedadores por la mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), en la provincia de Buenos Aires. Ecología Austral 14: 3-17.
- Vargas, R.; Mau, R.; Jang, E.; Faust, R.; Wong, L. 2008.** The Hawaii fruit fly areawide pest management programme. In Koul, O., Cuperus, G., Elliot, E. (eds). 2008. Areawide pest management. CAB International, p 300-325.
- Vayssieres, J.F.; Korie, S.; Ayegnon, D. 2009.** Correlation of fruit fly (Diptera: Tephritidae) infestation of mango cultivares in Borgou (Benin) with abiotic and biotic factors and assessment of damage. Crop Protection 28: 477-488.
- Vreysen, M. J.; Robinson, A. S.; Hendrichs, J. 2007.** Area-Wide Control Insect Pests: From Research to Field Implementation. Springer, 792 P.

Aportes al manejo de Mosca de la Fruta mediante trapeo masivo.

Eficiencia de distintos tipos de trampas para el trapeo masivo de Mosca de las frutas en Uruguay, *Ceratitis capitata* (Wiedemann).

Buenahora, José ¹; Otero, Alvaro ¹

¹ Programa Nacional de Investigación en Producción Cítrica, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay.

jbuenahora@sg.inia.org.uy, aotero@sg.inia.org.uy

En la citricultura uruguaya se observan cada año considerables daños provocados por las moscas de las frutas, siendo una de las plagas que presenta gran interés económico por los enormes perjuicios que ocasiona (Bentancourt *et al.*, 2009). Dentro de los géneros *Ceratitis* y *Anastrepha*, pertenecientes a la familia *Tephritidae*, hay especies en nuestro medio extremadamente polífagas y de gran incidencia económica como *Ceratitis capitata* (Wiedemann) y *Anastrepha fraterculus* (Schiner). Si bien se han implementado distintos métodos de control químico (aplicaciones aéreas, cebos tóxicos, entre otros), no han sido eficientes y tampoco una solución sustentable para prevenir daños en las frutas.

En la década pasada, a nivel mundial, se incorporó una técnica para el control de esta plaga que permite la producción de fruta libre o con muy bajos niveles de residuos (Ros *et al.*, 2002). El control por trapeo masivo de las moscas de la frutas satisface estos requisitos y consiste en la colocación de una densa red de trampas con atrayentes, en los cuadros de producción del cultivo a fin de capturar y eliminar la mayor parte de la población de adultos (Alonzo Muñoz y García Marí, 2009). Desde el año 2000, la técnica ha sido evaluada en diferentes países para probar su eficacia (Cohen and Yuval, 2000; Putruele y Mousques, 2005). Tanto a nivel mundial como en Uruguay, en los últimos años ha avanzado su adopción en cultivos de cítricos alcanzando cada vez mayores superficies, proporcionando en general resultados favorables (Martínez-Ferrer *et al.*, 2012; Buenahora y Otero, 2013).

Materiales y métodos

Para evaluar la eficacia de la técnica de trapeo masivo y la reducción del daño en la fruta, se realizaron durante los años 2012 y 2013 dos experimentos en cuadros comerciales de Satsuma Okitsu, ubicados en la zona de Chapicuy (Paysandú), comparando tres tipos de trampas con un tratamiento químico convencional (cebo tóxico). El primer experimento se instaló el 30 de enero de 2012, mientras que el segundo fue instalado el 4 de febrero de 2013. Cada tratamiento fue aplicado en parcelas de aproximadamente 1 ha. El diseño experimental fue en bloques completos al azar con cuatro repeticiones en el año 2012 y tres repeticiones en el año 2013.

Tratamientos 2012	Tratamientos 2013
60 trampas Susbin/ ha.	60 trampas Susbin/ ha.
120 trampas Ceratrap/ha	120 trampas Ceratrap/ha
400 trampas M4/ha	400 trampas M3/ha
Aplicación semanal de cebo tóxico	Aplicación semanal de cebo tóxico

Las aplicaciones de cebo tóxico se realizaron con Amadene (Proteína hidrolizada 420 g/l) 600 cc/100 l + Tracer (Spinosad 480 g/l) 15 cc/100 l a razón de 250 l de caldo/há, para ello se ingresó en todas las entrefilas del cuadro, utilizando dos emisores (picos), uno para cada lado de la fila, dirigidos hacia el tercio medio y superior de las plantas. Las trampas de los tratamientos fueron ubicadas desde la periferia hacia el interior del cuadro formando una barrera perimetral (Cohen and Yuval, 2000). La población de moscas fue monitorizada con 5 trampas Jackson y 5 McPhail en cada parcela durante el primer año mientras que el segundo año se utilizaron solo trampas Jackson. Las capturas de moscas se registraron semanalmente y fueron utilizadas para el cálculo de los MTD (moscas/trampa/día).

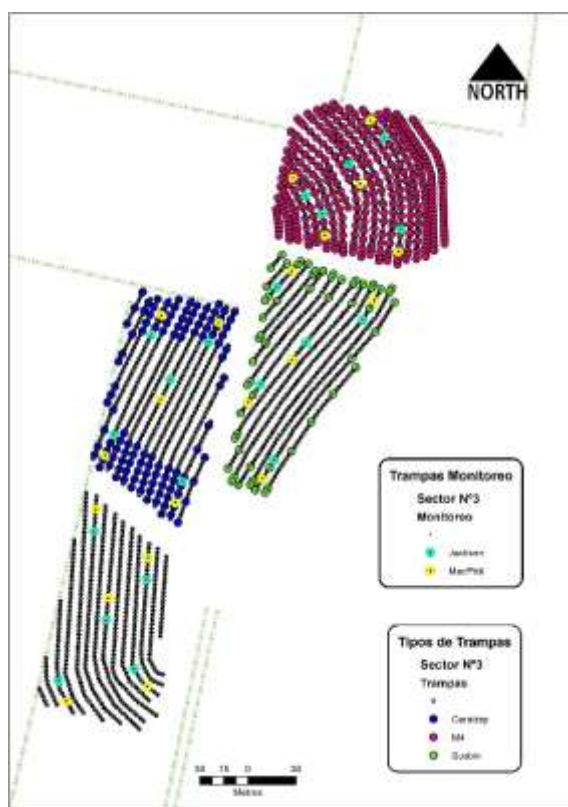


Figura 1. Disposición espacial de los tres tipos de trampas para el control masivo y de las trampas para monitoreo de la población de moscas, en uno de los bloques del experimento de Chapicuy.

En ambos experimentos se realizaron muestreos de frutos en dos momentos para cuantificar el daño. Este fue evaluado *in situ* y luego del desverdizado. En cada tratamiento,

se identificaron y georeferenciaron 10 sitios de 3 árboles cada uno, seleccionándose por color 50 frutas de los 2/3 superiores de cada planta (Color 0,5 de la Tabla de colores para cítricos de INIA). En total se colectaron 500 frutas de cada parcela.

Para el análisis estadístico se utilizó el procedimiento GENMOD del programa de SAS 9.2 asumiendo una distribución Poisson, con una función de enlace de tipo log para las capturas en trampas. Mientras que para la proporción de frutos afectados se utilizó el procedimiento GENMOD asumiendo una distribución Binomial, con una función de enlace Logit. La separación de medias fue realizada con el procedimiento LSMEANS.

Resultados

Durante el año 2012, el tratamiento químico tuvo significativamente mayor porcentaje de daño en fruta en la primera cosecha que los otros tratamientos, a pesar de que los valores fueron relativamente bajos (0,15%). En la segunda cosecha, después del desverdizado todos los tratamientos con trapeo masivo fueron significativamente mejores que el tratamiento químico. Durante el año 2013 el porcentaje de fruta afectada fue bajo (no mayor al 0,93%), no constatándose diferencias significativas entre los tratamientos. La diferencia en el daño en la fruta entre los tratamientos tampoco fue significativa, posteriormente al desverdizado de los frutos.

Los resultados concuerdan con lo reportado por Ros *et. al* (2002) quienes mencionan el buen comportamiento de la proteína hidrolizada y de los atrayentes sintéticos para el trapeo masivo de las moscas de las frutas. Putruele y Mousques (2005) indican también que los tratamientos utilizados para el trapeo masivo fueron tan eficaces como el control químico.

Conclusiones

El trapeo masivo en mandarina Satsuma Okitsu permite obtener, independientemente de la trampa utilizada, fruta totalmente sana sin ningún tratamiento con insecticidas para su control, lo que nos aporta un método muy útil para incorporar al manejo integrado de plagas de cítricos en la región.

Referencias bibliográficas

Alonzo Muñoz A, García Marí F. 2009. Factores que influyen en la eficiencia del trapeo masivo para el control de la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas, 35: 401-418.

Bentancourt CM, Scatoni IB, Morelli E. 2009. Insectos del Uruguay. Montevideo, Facultad de Agronomía- Facultad de Ciencias. 658 p.

Buenahora J, Otero A. 2013. Eficiencia de distintos tipos de trampas utilizadas en el trapeo masivo de mosca de las frutas en Uruguay, *Ceratitis capitata* Wiedemann. Primeras experiencias. *In*: Libro de Resúmenes, VII Congreso Argentino de Citricultura, Misiones 15-17 de mayo.

Cohen H, Yuval B. 2000. Perimeter trapping strategy to reduce mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) Damage on Different Host Species in Israel. Journal of Economic Entomology, 93 (3): 721-725.

INIA. 2000. Tabla de Colores para Citricos. INIA. Uruguay.

Putruele G; Mousques J. 2005. Mass trapping of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Argentina. In: Proceedings of a final Research Coordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, pp. 121-124.

Martinez-Ferrer MT, Campos JM, Fibla JM. 2012. Field efficacy of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) mass trapping technique on clementine groves in Spain. *Journal of Applied Entomology*, 136: 181–190.

Ros JP, Wong E, Oliver J, Castillo E. 2002. Mejora de los mosqueros, atrayentes y sistemas de retención contra la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* Wied. Como hacer de la Técnica del Trampeo Masivo una buena herramienta para controlar esta plaga. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 28: 591-597.

SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT 9.2 Users Guide. Cary, North Caroline: SAS Institute Inc. USA.

Manejo integrado de Mosca de la fruta con trampeo masivo en empresa privada.

Ing Agr. Alvaro Ceriani

Empresa San Miguel

Contacto: aceriani@sanmiguelglobal.com

La citricultura en Uruguay es afectada por la mosca de las frutas como en muchos lugares del mundo, la cual en ocasiones llega a niveles de afectación severa generando importantes pérdidas económicas directas, así como también indirectamente por limitar el ingreso a diferentes mercados internacionales por ser una plaga cuarentenaria, lo que genera un escenario productivo que incrementa la complejidad del negocio con destino a la exportación para consumo en fresco. En este mismo sentido en los últimos años se ha venido acotando cada vez más la posibilidad de arribar a destino (especialmente de países que valoran el producto y cuidan a sus ciudadanos) con cítricos que no tengan restos de productos químicos que procedan del campo en general y dejando acotado este aspecto casi exclusivamente para productos de postcosecha.

En esta ocasión queremos narrar nuestra experiencia en el control de la plaga utilizando el trampeo masivo, una metodología que apunta a controlar la plaga con muy pocas intervenciones químicas convencionales y logra reducir el residuo de productos fitosanitarios sobre la fruta proveniente de campo. Cabe resaltar que nuestra empresa viene trabajando en el tema desde el año 2009 y ha ido ajustando la técnica de acuerdo a nuestras condiciones internas así como las fluctuaciones climáticas para cada año.

En esta ocasión nos vamos a referir al manejo realizado en uno de sus predios ubicado en el departamento de Paysandú, en la zona de Chapicuy, ubicado sobre ruta nacional N° 3 Km 457. Cabe mencionar que la misma metodología de control que se realiza en este predio, también es desarrollado en las demás quintas de la Empresa.

Actualmente la superficie efectiva de cítricos es de 98.2 ha, el cual tiene la siguiente composición varietal; Mandarinas: Satsumas 46%, Clementinas de Nules 9%, Novas 10.4%, Ellendale 20%, Orri 4%, Tami 0.6% y Naranjas como Valencia Late con el 10%.

Esta composición varietal hace que el sistema sea complejo, por lo cual el manejo integrado de la mosca de la fruta pasa a ser un aspecto clave en su control y todos aquellos aspectos culturales de mitigación de la misma cobran una real importancia, así como por otro lado monitorear sistemáticamente su población dentro del predio y especialmente en cada variedad y para determinado estado fenológico hace que podamos encarar su control con ciertas ventajas y así poder manejar certezas en el combate de esta plaga.

La tecnología del control con trampeo masivo para mosca de la fruta presenta con algunas ventajas relativas al control químico:

- 1) Su inocuidad para la fruta.

- 2) Su permanente acción de control en el campo independientemente de factores ajenos al momento de hacer las aplicaciones de control químico, por ejemplo: días feriados y domingos, lluvias, rupturas de máquinas, faltas del personal, etc.
- 3) Buena relación costo/beneficio de esta tecnología.
- 4) Semejanza en los resultados obtenidos para ambas tecnologías.
- 5) Posibilidad de reutilización, en campañas posteriores, de parte de los componentes de las trampas bajando el costo global.
- 6) Fácil armado de las trampas y “poca posibilidad a equivocarse”.

Como desventajas:

- 1) La cuidadosa metodología de colocación de las trampas en el campo, haciendo énfasis en cuidar la distribución espacial de las mismas en el cuadro.
- 2) La corta duración de los cebos (atrayente y agente control).
- 3) No permitió reducir el costo de control vs el control químico.
- 4) No ser biodegradables. Ello implica recoger elementos de las trampas de los lotes de cultivo.

No podemos dejar de mencionar que esta última zafra (2014-2015) fue muy especial en cuanto a la abundancia de la plaga, la cual hizo disparar las capturas por encima de los MTD aceptados por nuestra empresa e hizo que tuviéramos que intervenir con control químico en algunas oportunidades. Luego de restablecer los niveles poblacionales aceptados, dejamos que el método de control masivo siguiera haciendo su efecto.

A modo de resumen, en las últimas zafras de exportación hemos logrado ajustar la técnica del trapeo masivo de mosca de la fruta y lograr niveles aceptables de daño en fruta para el trabajo en packing, lo cual nos permitió arribar a destino sin mayores inconvenientes originados por esta plaga.

Situación regional de HLB y presencia del vector en Uruguay.

Elina Zefferino¹, Juan Luis Corti¹, Alvaro Otero², Wuillan Techeira¹.

¹ Dirección General de Servicios Agrícolas. MGAP. Uruguay. ezefferino@mgap.gub.uy

² Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.

Introducción.

El monitoreo de *Diaphorina citri* fue realizado en el período comprendido entre marzo de 2014 y marzo de 2015, sobre 34 lugares de producción citrícola de todo el país, 10 lugares en la zona citrícola del sur y 24 en la zona norte, que representa un área de 6.100 ha efectivas de montes cítricos. Esto corresponde a un 36% de la superficie citrícola comercial del Uruguay.

Dentro de los 34 lugares de producción seleccionados, se evaluaron 134 cuadros con cítricos, de los cuales 108 corresponden a la zona norte y 26 a la zona sur de Uruguay, dentro de ellos se monitorearon 26 variedades cítricas.

En cada uno de los 134 cuadros de producción se seleccionaron 5 o 10 estaciones de monitoreo, dependiendo del tamaño del mismo (ver protocolo de monitoreo en anexo); cada estación de monitoreo (793 en total) se realizó el conteo de adultos de *Diaphorina* en 10 plantas.

Inicialmente estaba previsto que cada cuadro de producción sea monitoreado mensualmente con 12 monitoreos en el período de trabajo. Al final del período de evaluación, muy pocos cuadros fueron relevados todos los meses, con lo que el resultado monitoreo tiene en cuenta el número de veces que se repitió la evaluación del cuadro individual.

Se definió el número de adultos capturados por cuadro, como la variable de trabajo para poder comparar variedades, y lugares de producción entre sí. El número de adultos por cuadro, consiste en la suma de todos los adultos capturados en las cinco estaciones dentro del cuadro, compuestas cada una de ellas de 10 plantas. Cada cuadro muestreado de menos de 1 ha está compuesto por 50 árboles relevados. Las capturas de los cuadros con 10 estaciones (100 árboles en cuadros de más de 1 há), fueron llevadas a una base común de 50 árboles para poder ser comparada con los demás cuadros.

Análisis de los datos.

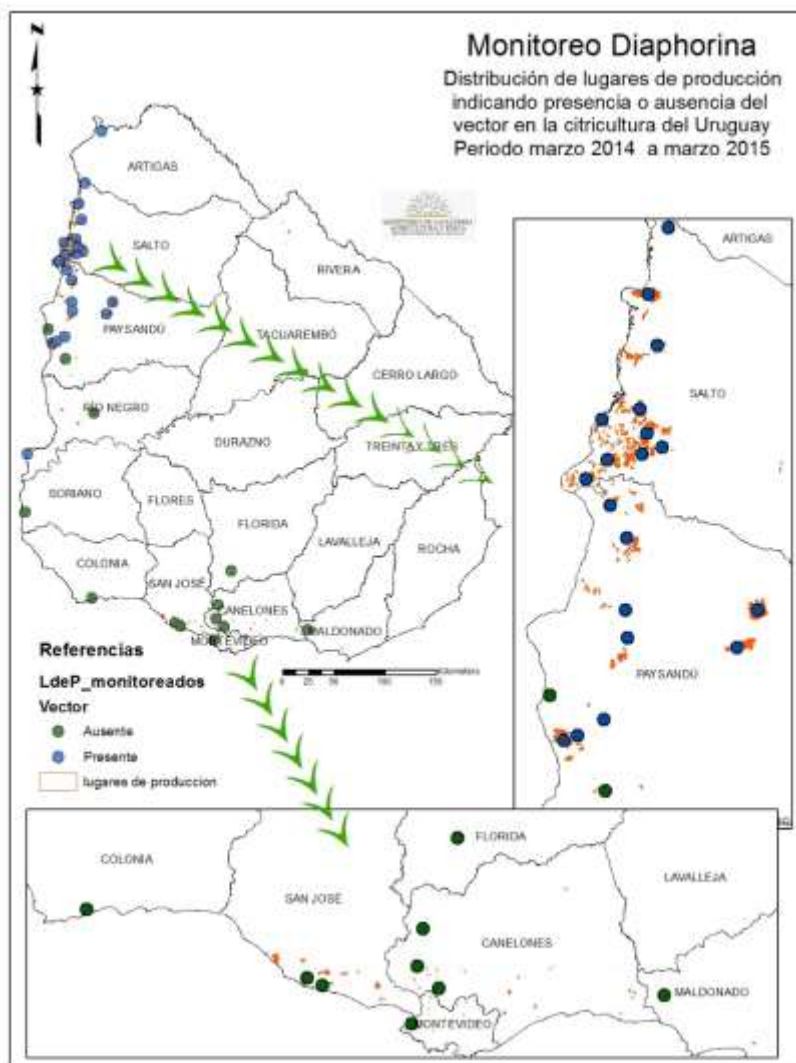
La presencia de adultos de *Diaphorina citri* solo se constató en los predios citrícolas de la zona norte del país, lo que hace que solo se analicen los datos de los 24 predios y 108 cuadros de la zona norte.

De acuerdo al diseño del monitoreo, el conteo de adultos de *Diaphorina* se realiza de acuerdo al siguiente criterio: a) cuando el cuadro es menor de 1 ha se seleccionan 5

estaciones dentro del cuadro compuestas cada una de 10 árboles y b) cuando el cuadro de producción es mayor a 1 ha se seleccionan 10 estaciones dentro del mismo.

A los efectos de poder comparar los resultados entre los cuadros, variedades y lugares de producción, con las capturas de los monitoreos de cuadros con 5 o 10 estaciones, se llevó el dato de captura -en todos los cuadros evaluados- a una base común de 5 estaciones por cuadro.

En el cuadro siguiente se ven los resultados de conteos de capturas de adultos de *Diaphorina* en cada lugar de producción, comprendidos en el periodo analizado



Mapa 1. Distribución de *Diaphorina* en Uruguay. Período marzo 2014 - marzo 2015.

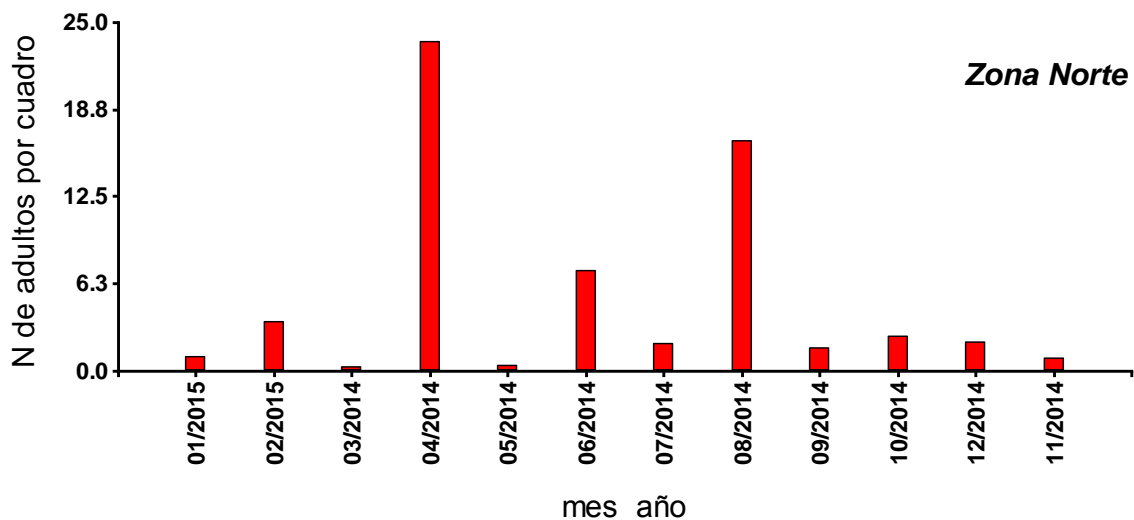


Figura 1. Número promedio de adultos de *Diaphorina* por cuadro (cuadros de 5 estaciones). El número de adultos de cada cuadro está compuesto por la suma de las capturas de las 50 plantas; (5 estaciones con 10 árboles por estación). Zona Norte.

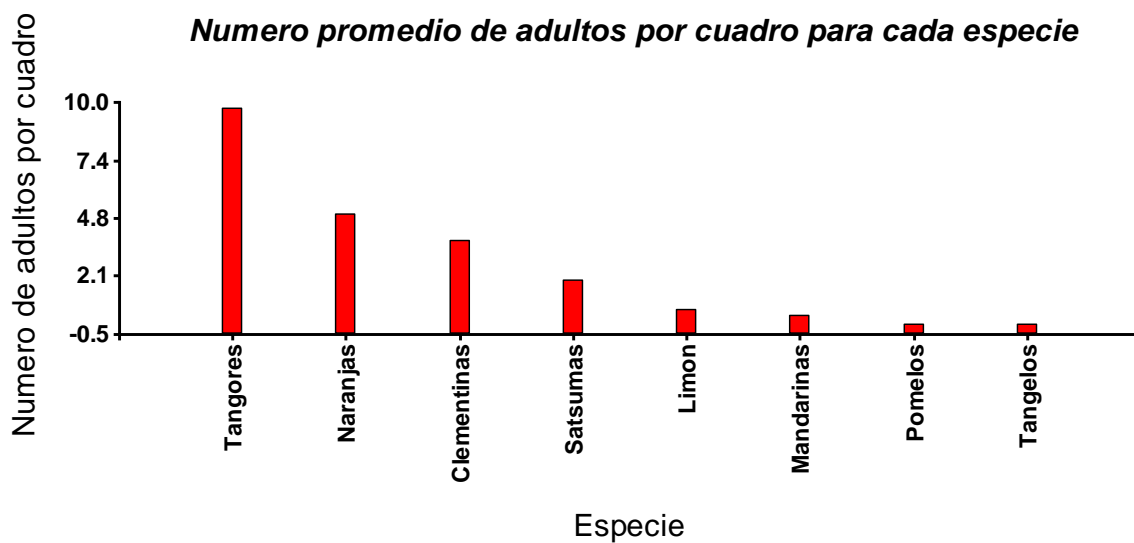


Figura 2. Número promedio de adultos de *Diaphorina* por cuadro (cuadros de 5 estaciones) durante todo el período de muestreo para cada especie. El número de adultos de cada cuadro está compuesto por la suma de las capturas de las 50 plantas, (5 estaciones con 10 árboles por estación). Zona Norte

Conclusiones.

- La presencia de adultos de *Diaphorina citri* solo se constató en los predios citrícolas de la zona citrícola norte del país.
- La mayor cantidad de adultos capturados fue encontrada en el cultivar Ortanique y en general entre los tangores y en segundo lugar el cultivar Navel.
- La mayor frecuencia de adultos capturados promedio por cuadro (suma de las 5 estaciones en el cuadro) es menor a 25 ejemplares.
- Se evidencia una variabilidad importante de la captura de *Diaphorina* entre lugares de producción cercanos entre sí.

Avances en el control integrado de *Diaphorina citri* mediante enemigos naturales y productos selectivos.

José Buenahora, Virginia Pereira Das Neves, Verónica Galvan, María Eugenia Amorós, Abel Rodríguez¹, Juan Amaral

Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.

Equipo externo: Gabriela Asplanato¹, Carmen Rossini¹, Jorge Franco³, Philip Stansly⁴, Pedro Yamamoto⁵.

¹Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Montevideo.

³Universidad de la República, Facultad de Química, Montevideo.

³Universidad de la República, Facultad de Agronomía, EEMAC, Paysandú.

⁴Universidad de Florida, EEUU.

⁵Universidad de San Pablo, ESALQ.

Contacto: jbuenahora@inia.org.uy

Introducción

El Huanglongbing (HLB) es actualmente la enfermedad más destructiva de los cítricos en el mundo (Grafton-Cardwell et al., 2013) y el psílido asiático *Diaphorina citri*, uno de los insectos vectores de las bacterias asociadas al HLB, está presente en Uruguay. Aunque este problema sanitario no ha sido detectado hasta el momento, la presencia de la enfermedad en la región y del psílido en el país, hace que la citricultura esté enfrentada a una amenaza muy importante.

D. citri es un insecto de difícil control y no se debe descartar ninguna medida de acción para reducir sus poblaciones, sin embargo cualquiera que se emplee no debería afectar el medio ambiente, el complejo de enemigos naturales ni generar un incremento en el nivel de residuos de las frutas para un país con un perfil predominantemente exportador además de ser compatible con el manejo de plagas que actualmente se utiliza.

Se busca profundizar en el conocimiento bio-ecológico del psílido y desarrollar diferentes métodos de control de forma de contar con múltiples herramientas de supresión de sus poblaciones antes del ingreso de la bacteria a nuestro territorio. Se pretende conocer con más profundidad la capacidad de dispersión del insecto, los factores bióticos y abióticos que influyen en la abundancia de las poblaciones de forma de establecer la base para el manejo de la plaga en el cultivo. Además se plantea el desarrollo del control biológico con la utilización de enemigos naturales (parasitoides) y la evaluación de insecticidas selectivos, bio-insecticidas y repelentes.

1. Estudio de la abundancia y fluctuación de poblaciones

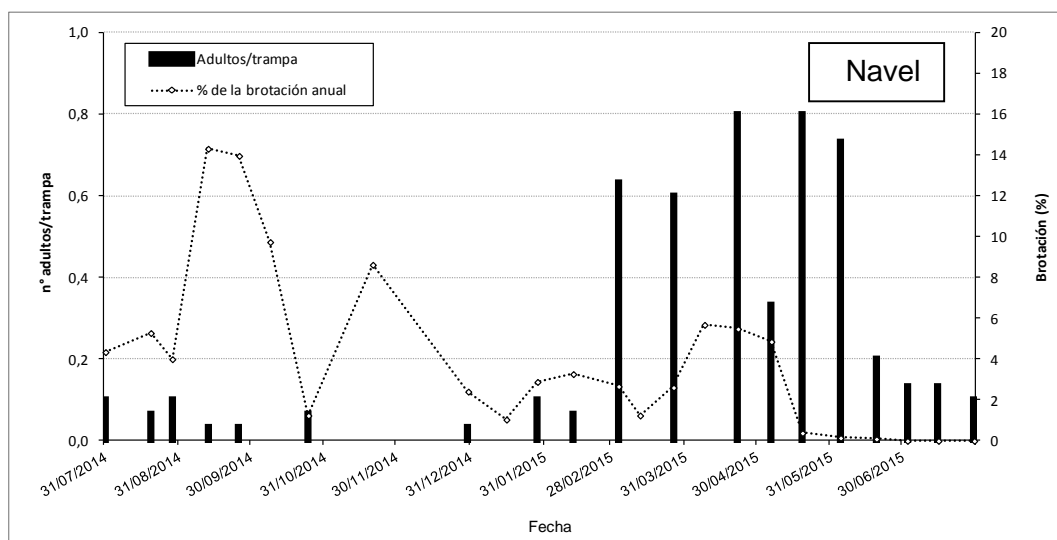
Para el estudio de la evolución poblacional de *Diaphorina citri* se seleccionaron cuadros de variedades de cítricos en 2 predios de diferentes zonas del norte del país con presencia de la plaga (4 cuadros): Departamento de Paysandú, paraje Queguay: Washington Navel y Nova, con riego; Departamento de Salto, paraje Colonia Itapebí: Lane Late y tangor Ortanique, sin riego. Los mismos no reciben tratamientos insecticidas durante el período de estudio a excepción de algún uso muy restringido para la mosca de la fruta y la aplicación de aceite mineral para el control de cochinilla roja. Se llevan registros climáticos mediante sensores de temperatura, humedad relativa y lluvia.

En cada cuadro se monitorea la población de huevos y ninfas así como los adultos mediante trampas amarillas y el método de golpeo. También se registra la evolución de la brotación de las plantas.

Primeros resultados

Todas las brotaciones pueden ser afectadas por la plaga, aunque ello puede variar entre sitios y cultivares. Esto está de acuerdo a lo mencionado por Asplanato et al. (2009). Sin embargo la sola existencia de brotación no significó la presencia del psílido en la parcela. En la brotación de primavera, en Lanelate y el tangor Ortanique en Itapebí, se pudo observar tanto adultos como estadios inmaduros. Sin embargo en W. Navel (Queguay) se detectó mayoritariamente adultos pero en baja densidad. En este cultivar la población de adultos, independientemente del método de muestreo, incrementó notoriamente hacia fines del verano y otoño. A su vez esta parcela mostró los mayores valores de captura de adultos por trampa/rama (Figuras 1 y 2).

El golpeo de ramas permite una mayor colecta de adultos, aunque ello dependió del material vegetal y de la época del año (Figura 2). Específicamente para el muestreo invernal parece el método más apropiado.



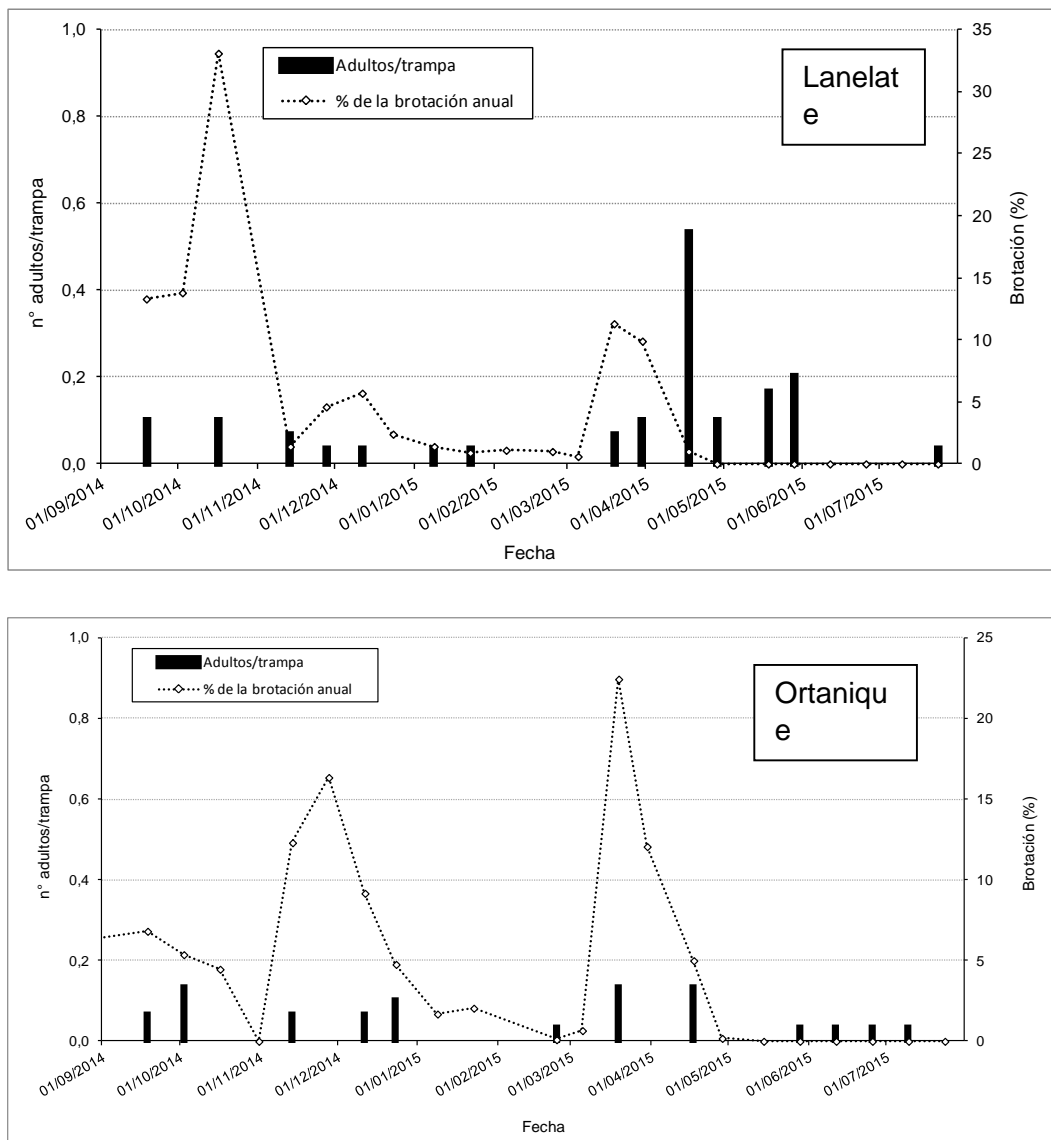


Figura 1. Fluctuación de adultos de *Diaphorina citri* en trampas amarillas con adherente durante la temporada 2014-2015 en tres parcelas de citrus.

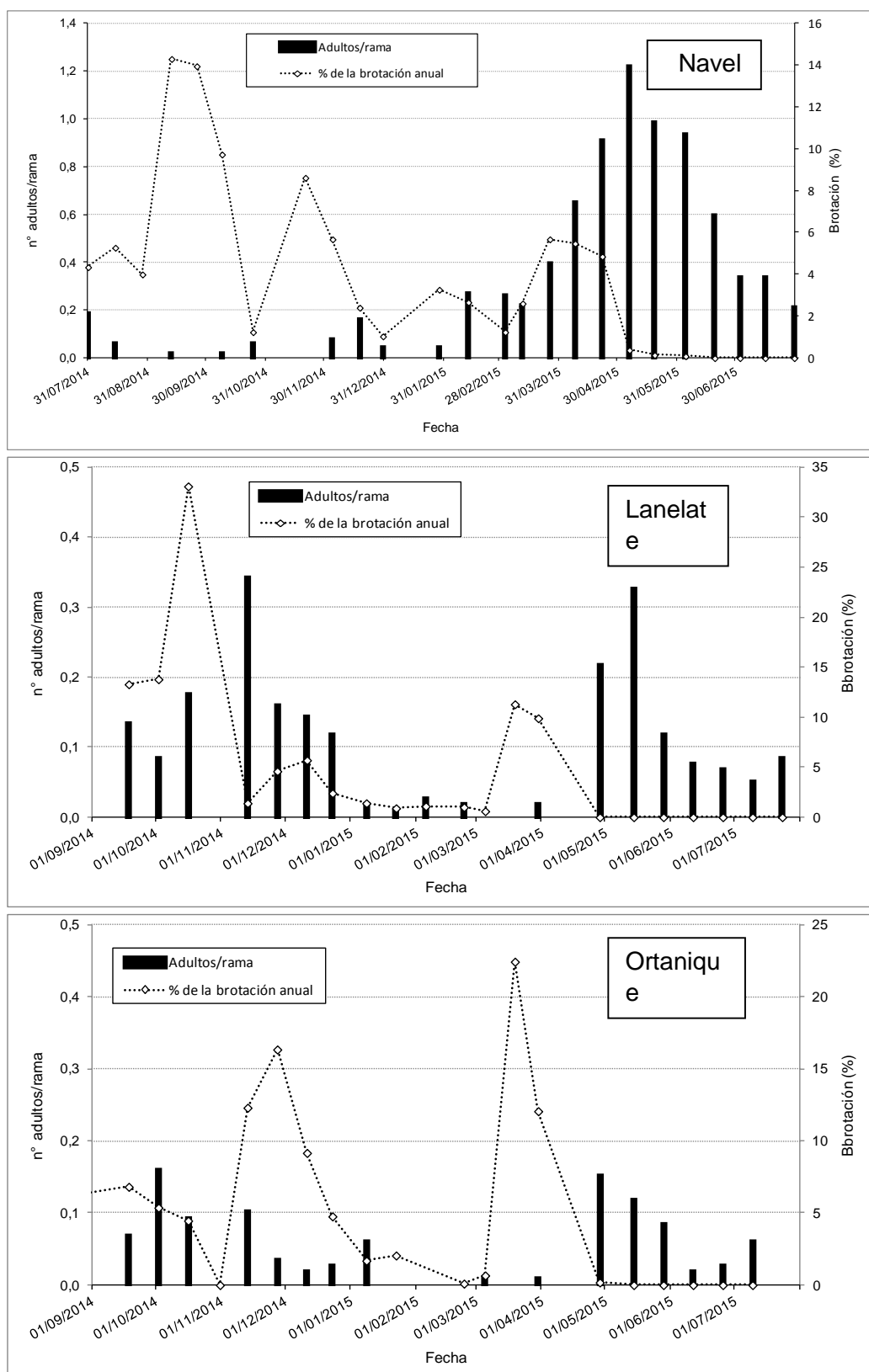
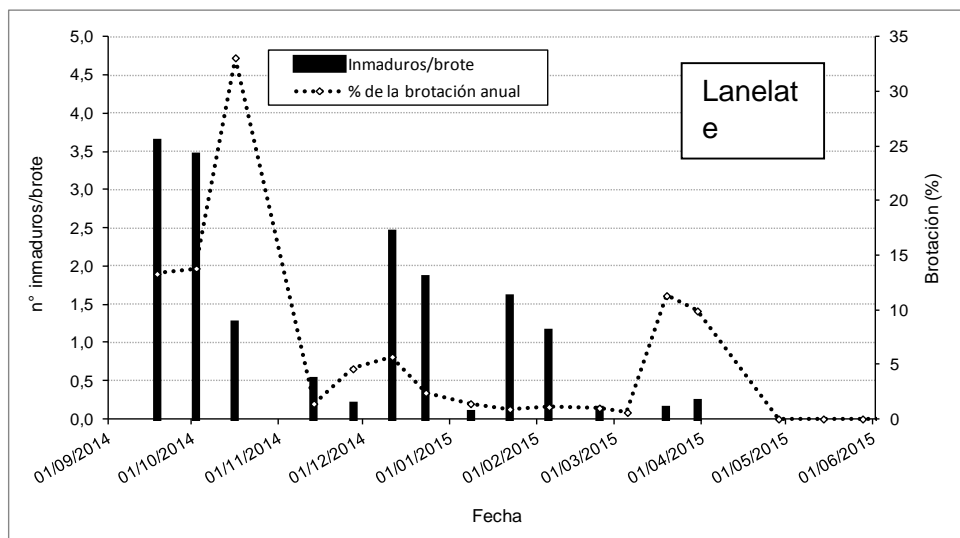
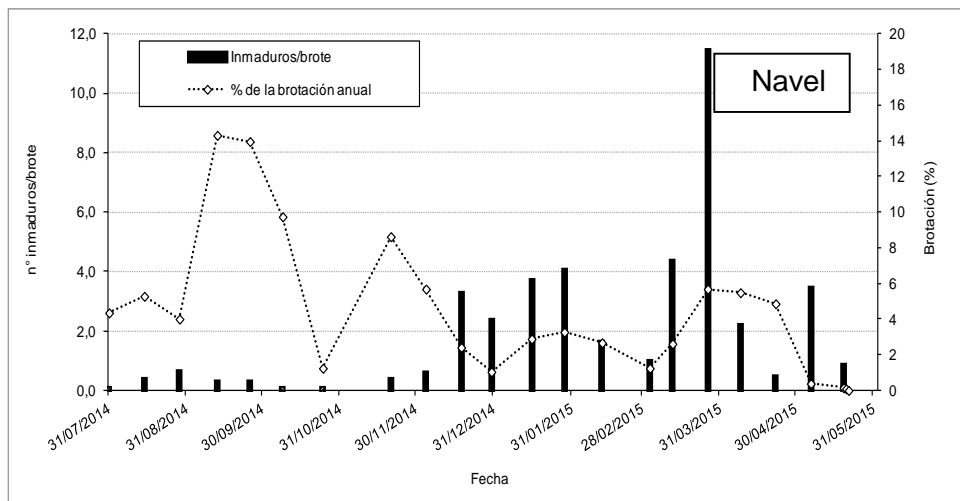


Figura 2. Fluctuación de adultos de *Diaphorina citri*/rama (método de golpeo) durante la temporada 2014-2015 en tres parcelas de citrus.

Tanto Lanelate como el tangor Ortanique (Itapebí-Salto) mostraron presencia de estadios inmaduros en la brotación de primavera, sin embargo en W. Navel (Queguay-Paysandú) esto ocurrió en mayor densidad en las brotaciones de fines verano y el otoño registrándose un máximo de 11,4 inmaduros/brote (Figura 3).



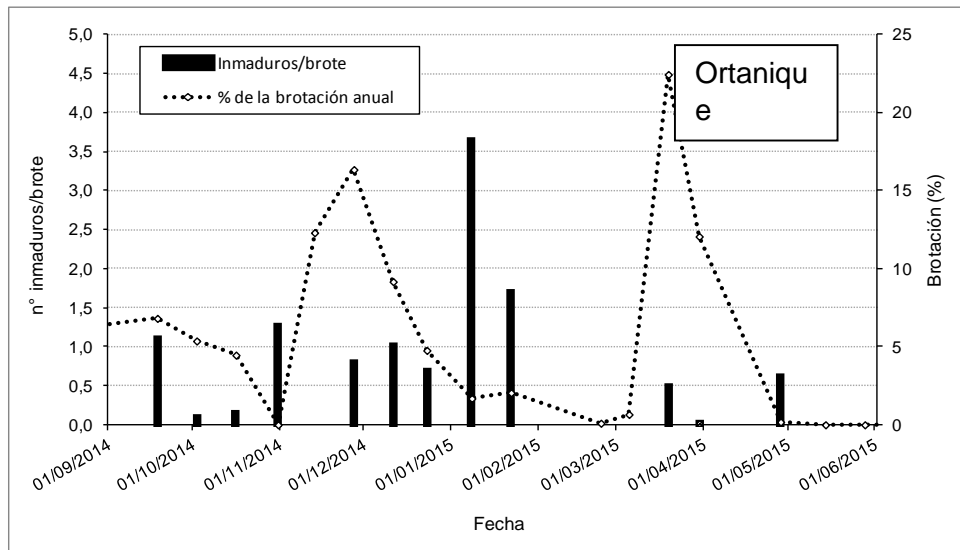


Figura 3. Fluctuación de poblaciones de inmaduros de *Diaphorina citri* durante la temporada 2014-2015 en tres parcelas de cítricos.

Bibliografía

- Asplanato G, Buenahora J, Amuedo S, Rubio L. 2009.** Fluctuación de las poblaciones y parasitismo. Serie de Actividades de Difusión No 569. INIA Salto Grande. pp. 23-28.
- Grafton-Cardwell, E.E., L.L. Stelinski, and P.A. Stansly. 2013.** Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens, in Annual Review of Entomology. p. 413-432.

2. Control biológico de *Diaphorina citri*

Introducción

Se busca implementar el control biológico de la plaga, como medida preventiva, con el fin de contribuir a la reducción de sus poblaciones. En una primera etapa, se planteó la necesidad de ajustar la cría de *Diaphorina citri* sobre hospederos alternativos a *Murraya paniculata* y seguidamente multiplicar a *Tamarixia radiata*, parasitoide reportado a nivel local pero en bajas densidades.

2.1. Selección de hospederos para la cría de *Diaphorina citri*

El objetivo de los presentes trabajos fue identificar el/los materiales vegetales preferidos por la plaga evaluando la oviposición y emergencia total de adultos con y sin chance de elección.

Para todos los experimentos realizados se trabajó con 6 especies diferentes de cítricos: Cidro (*Citrus medica*), Limón Eureka (*Citrus limon*), Limón Cravo (*Citrus limonia*), Limón rugoso (*Citrus jambhiri*), Naranja dulce (*Citrus sinensis*) y Pomelo Duncan (*Citrus paradisi*).

2.1.1. Preferencia en oviposición en diferentes especies de cítricos con chance a elección

Materiales y métodos

Se realizaron tres experimentos. En dos de ellos las plantas fueron distribuidas en dos circunferencias, una a 0,75 cm y otra a 1,5 m del punto de liberación de adultos de *D. citri* en su primera postura. En el primer experimento se liberaron 600 adultos, en condiciones no controladas de temperatura y fotoperiodo, en el otro se liberaron 1000 adultos en una cámara en condiciones controladas. El tercer experimento se realizó en jaulas con 6 macetas, una de cada especie (2 plantas/maceta) y se liberaron 100 adultos en cada una. En todos los experimentos, las plantas presentaban brotes aptos para la postura de huevos al momento de la liberación de adultos. Una vez retirados los adultos se contabilizó el número total de huevos presentes en todos los brotes de cada planta, por especie, con ayuda de lupa binocular.

El número de huevos se analizó con un modelo lineal generalizado, con distribución de Poisson y función de enlace logarítmica. En dicho análisis se aumentó al modelo la covariable “número de brotes”. La separación de medias fue realizada mediante test de Tukey-Kramer para $p \leq 0,05$.

Resultados

Se puede concluir que existió preferencia para oviponer en Pomelo Duncan, Limón Rugoso y Naranja dulce; en todos los casos Cidro fue el material vegetal menos preferido.

2.1.2. Preferencia en oviposición y emergencia de adultos en diferentes especies de cítricos sin chance a elección

Materiales y métodos

Se realizaron dos experimentos para evaluar preferencia en oviposición y uno para emergencia total de adultos. En los dos primeros se trabajó en jaulas. En cada jaula se liberaron 50 y 100 adultos, finalmente se los retiró y se contabilizó la totalidad de huevos por brote con ayuda de lupa binocular.

Para determinar la emergencia total de adultos se liberaron 100 adultos por jaula. Se retiraron los adultos al séptimo día de su liberación y se dejó que se cumpliera el ciclo. Una vez que ocurrió la primera emergencia, se los retiró y se contabilizaron por maceta (2 plantas/maceta) siguiendo con esta metodología hasta el final de emergencia.

Los resultados de oviposición y número de adultos emergidos se analizaron mediante un modelo Lineal Generalizado, asumiendo una distribución de Poisson y una función de enlace logarítmica. En el análisis de número de huevos se aumentó al modelo la covariable "número de brotes". La separación de medias fue realizada mediante test de Tukey-Kramer para $p \leq 0,05$.

Resultados

Si bien los resultados obtenidos en oviposición no han sido muy consistentes entre sí, Limón Cravo, Limón Eureka y Naranja dulce fueron las especies que reiteradamente presentaron buena aptitud para la oviposición independientemente del orden. La emergencia de adultos también se corresponde con dichas especies. De esta forma se puede mencionar que estos materiales vegetales presentan un buen comportamiento como hospedero para la cría de *D. citri*.

Diaphorina citri demostró tener diferente comportamiento en experimentos con y sin chance de elección, de todas formas Naranja dulce es la especie que presentó buena performance ya sea con o sin chance de elección. Limón Cravo tiene buen comportamiento en ensayos sin chance de elección tanto en oviposición como en emergencia total de adultos. Por lo tanto se concluyó que la cría de *Diaphorina citri* se establecerá en ambos hospederos.

2.2. Cría de *Diaphorina citri*

Se utilizan plantas de no más de 30-40 cm de altura y tallos de aproximadamente 1 cm de diámetro, que crecen en macetas de plástico negro.

Se trabaja en invernadero de malla y vidrio en las épocas menos frías del año (primavera a otoño), de acuerdo al método de Ferreira Diniz (2013) mientras que durante el invierno la cría continúa en una sala de cría hermética, con temperatura, humedad relativa y luz controlada (25°C, 60% HR) de acuerdo al método de Skelley y Hoy (2004).

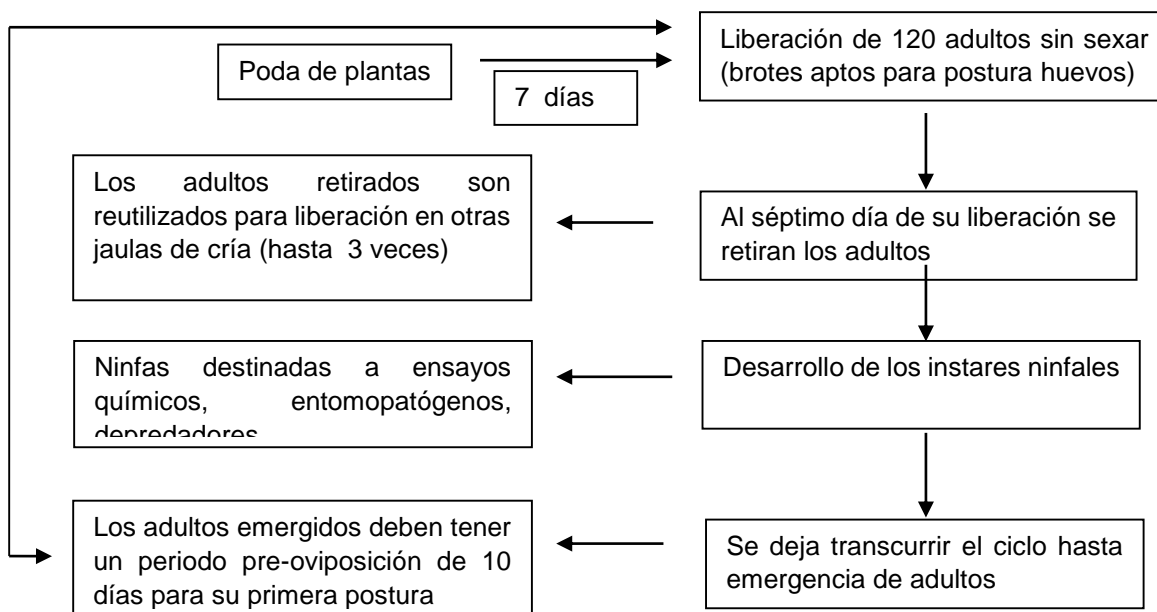


Figura 1: Esquema de la cría de *Diaphorina citri*

Al final del ciclo las plantas son podadas, curadas con jabón neutro y fertilizadas.

La duración del ciclo en verano es de aproximadamente de 10 días desde huevo hasta la primera emergencia de adultos, con temperatura promedio de 26.6°C, humedad relativa 73.2% y luminosidad natural, en invierno y cámara hermética la duración del ciclo aumenta a 13 días.

La producción total de adultos en verano es de 700 por jaula, a fines de otoño e invierno descende a 350-400 por jaula.

Bibliografía

Ferreira Diniz, A. J. 2013. Otimização da criação de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera : Liviidae) e de *Tamarixia radiata* (Waterston, 1922) (Hymenoptera: Eulophidae), visando a produção em larga escala do parasitoide e avaliação do seu estabelecimiento em campo. Tesis Doctoral en Entomología. Piracicaba, Brasil. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 128 p.

Skelley, L. H., and M. A. Hoy. 2004. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. *Biol. Control* 29: 14–23.

3. Control de *Diaphorina citri* mediante el uso de productos químicos selectivos, bio-insecticidas y repelentes

Introducción

Se proponen los primeros estudios en control químico del vector en el país, con énfasis en métodos eco-compatibles, evaluando productos de bajo impacto para enemigos naturales y el medio ambiente.

3.1. Evaluación de actividad anti-alimentaria en Laboratorio

La evaluación de actividad anti-alimentaria implica el estudio de la inhibición o reducción en la alimentación de diferentes preparados frente a adultos de *D. citri*. Conocer dicha propiedad es de gran relevancia para este insecto vector, pues tiene consecuencias directas con la dispersión de la enfermedad. Se testeó dicha actividad en productos de recomendación internacional como insecticidas para estadios inmaduros del psílido.

Materiales y Métodos

Se utilizó una técnica de evaluación indirecta, donde se observan los deshechos de alimentación en forma de gotas sobre papel de filtro (Boina, D.R., et al., 2009). Para esto se sumergieron hojas tiernas de cítricos recién cortadas por 24 h en soluciones acuosas de los productos a testear y en agua destilada como control negativo. Las hojas se secaron y se cortaron en discos que se colocaron en la base de placas de Petri, en cuya tapa se colocó papel de filtro. Se liberaron 10 adultos de *D. citri* por placa y éstas se mantuvieron con su base colocada hacia arriba por 24 h en condiciones controladas.

Ensayo 1. Tratamientos: Extracto de neem 10 (azadiractina 10,0 g.L⁻¹): 2 mL.L⁻¹; Extracto de paraíso (*Melia azedarach*): 20 mL.L⁻¹; CH 9202: 1 mL.L⁻¹; Facily 1,8 CE (abamectina 18 g.L⁻¹): 0,5 mL.L⁻¹.

Ensayo 2. Curva dosis/repuesta para el Extracto de neem. Se realizó a partir de diluciones seriadas del mismo (azadiractina 10,0 g.L⁻¹): 0, 1000, 2500, 5000, 7500 y 10000 ppm.

Se registró las gotas excretadas por placa, las cuales se visualizaron en los papeles de filtro como manchas violeta oscuro mediante tinción con ninhidrina. Se calculó el número de gotas por adulto vivo en cada placa a las 24 h (gotas/vivas).

Resultados

Ensayo 1. La actividad anti-alimentaria se detalla en la figura 1.

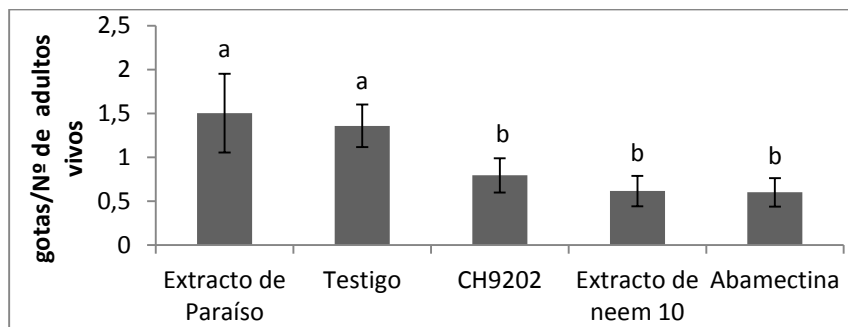


Figura 1. Actividad anti-alimentaria. Resultados expresados como gotas de mielecilla/Nº de adultos vivos a las 24 hs \pm error estándar. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (LSD Fisher, $p < 0.05$)

Ensayo 2. En el estudio de dosis-respuesta para neem 10, se observaron diferencias significativas frente al control a partir de 2500 ppm observándose que bajas concentraciones del producto son suficientes para disminuir la alimentación del insecto.

Conclusiones

Se reporta:

- Actividad anti-alimentaria frente a adultos de *Diaphorina citri* para Abamectina, CH 9202 y Extracto de neem 10.
- Disminución en la alimentación a partir de una concentración de 2500 ppm del Extracto de neem 10.

3.2. Evaluación de actividad insecticida en condiciones controladas

A nivel de invernadero se encuentran en proceso ensayos referidos al testeo de actividad insecticida de productos (de recomendación internacional) con diferentes mecanismos de acción. Los ensayos se dividieron en: evaluación de productos con actividad insecticida frente a ninfas y evaluación de neo-nicotinoides sistémicos frente a adultos. Se pretende hacer una selección primaria de productos factibles de trasladar a ensayos de campo.

3.3. Evaluación de actividad insecticida en condiciones de producción

Se estudió la actividad insecticida de productos (de recomendación internacional) de bajo impacto para enemigos naturales y el medio ambiente, con la finalidad de seleccionar los más eficientes en campo.

Materiales y Métodos

Se evaluaron a campo 6 productos insecticidas frente a estadios inmaduros del psílido (Tabla 1), se pulverizó con agua como testigo e Imidacloprid como control positivo. El ensayo se realizó en un predio comercial sobre un cuadro de Lane-Late de 3 años, en la localidad de San Antonio; se repitió en dos fechas: febrero y abril.

Se extrajo una muestra previamente a la aplicación para evaluar la mortandad natural. Las parcelas fueron conformadas por al menos 50 ninfas, según la metodología propuesta por Lizondo, M., et al. (2014). Los bordes de cada parcela se constituyeron por una planta en cada extremo y una fila entre ellas. Se realizaron pulverizaciones con mochila, siendo el gasto de agua en promedio 1,9 litros por planta. Luego de secos los brotes se cubrieron con bolsas de voile. A los 4 días se extrajeron los brotes y se contó el total de ninfas vivas y muertas. Se realizó el mismo procedimiento para la muestra pre-aplicación en el día 0 del ensayo.

Resultados

Se constató que el testigo no presentó diferencias significativas con la muestra pre-aplicación, lo que asegura su representatividad. Esto demuestra que el embolsado de brotes no afecta la mortalidad en el testigo.

En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos. Se observó que Imidacloprid presentó una mortalidad cercana al 100% en todos los casos, y por esta razón no fue incluido en el análisis, se corrobora su utilidad como control positivo.

Tabla 1. Ensayo de evaluación de actividad insecticida frente a estadios inmaduros de *D. citri*. Se detallan principios activos, dosis y porcentaje de mortalidad de ninfas del 3º al 5º estadio a los 4 días post-aplicación.

Tratamientos (principio activo)	Dosis (%)	Producto comercial	% mortalidad de ninfas
Abamectina 18 g.L ⁻¹	0,05	Facily 1,8 CE	84,7 a*
Aceite de soja 95%	1,0	ProdinOleo	83,3 a
CH 9202 (codificación interna)	0,075	Datos protegidos	74,9 ab
Aceite mineral	1,0	Aceite Mineral	74,1 ab
Extracto de Neem 0,3 - azadiractina 0,3 g.L ⁻¹	0,5	Nico Neem	66,0 ab
Extracto de Neem 10 - azadiractina 10,0 g.L ⁻¹	0,25	Nico Neem	46,7 b
Testigo (agua)	10,8 c
Imidacloprid 350 g.L ⁻¹ (control positivo)	0,04	Spingard 350 g.L ⁻¹	99,7

* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (GLM $p < 0.05$).

Conclusiones

De los productos evaluados, Abamectina y Aceite de Soja presentaron un control mayor al 80%. Ambos productos resultan ser de menor impacto para los enemigos naturales y el medio ambiente, por lo que se postulan como buenos candidatos para ser incluidos en un Manejo Integrado para esta plaga.

Bibliografía

Boina, D.R., et al. 2009. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Management Science*, 65(8): p. 870-877.

Lizondo, M., et al. 2014. Eficacia de Harier en el control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) en cítricos del noroeste argentino, in IV Simposio Nacional y I Congreso Latinoamericano de Citricultura. Salto, Uruguay

Avances en la identificación y evaluación de parasitoides, depredadores y entomopatógenos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: *Psyllidae*).

Gabriela Asplanato¹, Lina Bettucci², Susana Tiscornia², Carmen Viera³, Evelin Pechi¹, Belén Corallo¹, Mariángeles Lacava¹

¹Entomología, Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía

²Unidad de Micología, Facultad de Ciencias

³Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias

Contacto: gasplana@fagro.edu.uy

Introducción

El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: *Psyllidae*) es una plaga de difícil control y no se debe descartar ninguna medida de supresión de sus poblaciones. Las técnicas que se empleen no deberían interferir con el manejo de plagas llevado actualmente en el cultivo. Consideramos que la estrategia de control debe ser multitáctica y enmarcada dentro del concepto de Manejo Integrado de Plagas.

El presente proyecto es complementario al de INIA- Salto Grande: "Manejo integrado de *Diaphorina citri* (Hemiptera: *Psyllidae*) con énfasis en Control Biológico" en donde se plantean estudios de dinámica de poblaciones, control químico selectivo y cría y liberación del parasitoide *Tamarixia radiata*.

Los enemigos naturales juegan un papel sustancial en la regulación de las poblaciones del psílido y su utilización es un pilar básico en el manejo de la plaga. La eficiencia relativa de cada grupo difiere en las diferentes zonas.

El presente proyecto plantea el estudio de los diferentes grupos de enemigos naturales tanto parasitoides como depredadores y hongos entomopatógenos, lo que permitirá el planteo de medidas de conservación y/o aumento en momentos claves. Se generarán conocimientos para el desarrollo de técnicas de control biológico (conservación, aumento y utilización de hongos entomopatógenos), consideradas como un pilar importante en la supresión de las poblaciones del psílido.

Se busca potenciar además las capacidades existentes en el país conformando un equipo de trabajo con investigadores de la Facultad de Ciencias especialistas en control biológico con arañas y hongos entomopatógenos. Se trabaja con el apoyo constante de productores y técnicos del sector citrícola. También se cuenta con el asesoramiento técnico del equipo de trabajo de Manejo Integrado de Plagas de la EEA INTA Bella Vista.

Con las temáticas abordadas en los proyectos se tendrá una amplia base de conocimientos para el desarrollo de una estrategia multitáctica en el control del psílido.

1- Identificación de parasitoides, depredadores y entomopatógenos

Depredadores

En las colectas sistemáticas realizadas en cuatro parcelas se observó que los tres grandes grupos de depredadores se encontraron representados en los todos los casos y estuvieron presentes a lo largo de todo el año en mayor o menor abundancia. Las especies encontradas hasta la fecha fueron *Harmonia axyridis*, *Cycloneda sanguinea*, *Curinus coeruleus*, *Ceraeochrysa tucumana*, dos especies de coccinélidos y dos de crisópidos que aún no han sido identificadas. Las especies identificadas han sido citadas como controladores de *Diaphorina citri* en otras zonas. No se ha realizado aun la identificación de las arañas encontradas.

Se realizó un análisis faunístico calculando índices de abundancia, dominancia, frecuencia y constancia. Este estudio mostró a *H. axyridis* como una especie común o muy abundante en las parcelas de estudio pero solamente en Navel fue constante encontrándose en más del 50% de los muestreos. También *C. sanguinea* apareció como una especie común o muy abundante con la excepción de la parcela de Navel donde fue rara. Sin embargo en todos los sitios fue una especie accidental, se registró en menos del 25% de los muestreos. Solamente se encontraron dos individuos de *C. coeruleus* por lo que no se calcularon los índices. Los crisópidos y la especie de coccinélido aun no identificada fueron comunes o muy abundantes y constantes en todas las parcelas. Los crisópidos tienen un gran potencial para ser utilizados en planes de control biológico aplicados al ser posible su cría de una forma relativamente sencilla.

Entomopatógenos

Se realizaron aislamientos de hongos entomopatógenos a partir de insectos muertos. Se obtuvieron aislamientos de hongos potencialmente entomopatógenos: *Purpureocillium lilacinum*, *Cladosporium* spp. y *Lecanicillium* sp. También se aisló un hongo patógeno de arañas, *Gibellula pulcra* y *Fusarium* sp.

2 - Evaluación de la efectividad en campo

Se realizaron dos experimentos de exclusión con mallas que impiden la acción de depredadores y parasitoides, solamente de depredadores y banda de pegamento para excluir a los que caminan por la rama. Se obtuvieron resultados que consideramos preliminares debido a problemas metodológicos que afectaron el número de huevos por brote y por lo tanto la evaluación de los distintos efectos. Esto se debe fundamentalmente a que las poblaciones en campo eran bajas y se tuvieron que utilizar adultos provenientes de la cría en laboratorio los cuales no eran adecuados.

Consideramos que el método de exclusión y las tablas de vida son un método básico para evaluar el efecto de los distintos grupos de enemigos naturales en las distintas brotaciones y que nos aportará elementos para el diseño de estrategias en el Manejo Integrado de la Plaga. También pensamos que muchas de las dificultades presentadas pueden ser

superadas. Esta temporada se instalaron ensayos en parcelas que presentan naturalmente altas poblaciones de *D. citri* para evitar las limitantes halladas en los experimentos anteriores.

3- Evaluación de depredadores en laboratorio

Con el fin de evaluar el potencial controlador de las arañas sobre *D. citri*, se evaluó la tasa de consumo y los tiempos de inmovilización de una especie de araña de la familia Anyphaenidae y otra de la familia Oxyopidae frente a ninfas de estadio 4 y 5 de *D. citri*. Las arañas de estas familias se encuentran en cítricos en varias regiones y se considera que podrían consumir presas que se encuentren en las hojas y brotes. En la araña de la familia Oxyopidae se registró una aceptación de *D. citri* del 100% mientras que en la de la familia Anyphaenidae fue de un 72%. Los tiempos de inmovilización en ambas especies fueron similares 65 ± 37 segundos. Estas observaciones sugieren que las arañas de estas familias pueden ser controladores potenciales de *D. citri* y podrían capturar grandes cantidades de *D. citri* debido a los cortos tiempos de inmovilización registrados, sin embargo más estudios como la evaluación de la respuesta funcional deberían realizarse sobre este grupo de depredadores.

4- Evaluación de hongos entomopatógenos en laboratorio e invernáculo

Se seleccionaron tres cepas de hongos pertenecientes a la colección del Laboratorio de Micología. Dos cepas corresponden a *Beauveria bassiana* y una a *Metarhizium anisopliae*. Estos hongos se seleccionaron tomando en cuenta trabajos previos realizados en el laboratorio y campo donde mostraron ser eficientes para infectar y matar insectos tales como hormigas cortadoras, *Gonipterus* sp. y *Phoracantha recurva*.

Se logró un porcentaje de infección de los insectos mayor al 80% con las tres cepas de hongos evaluadas, lo que indica que con este sistema de aplicación (pulverizado) se logra llegar bien a los insectos en los brotes. La mortalidad total de los insectos inoculados con entomopatógenos varió entre 96 % y 99 % dependiendo de las cepas de hongos, presentando diferencias significativas frente al porcentaje de mortalidad de 21% en los testigos.

Dados los resultados obtenidos hasta el momento, cualquiera de estas tres cepas de hongos entomopatógenos podría seleccionarse para la aplicación en plantaciones de cítricos ya que todas mostraron ser efectivas controladoras de *D. citri*. Se realizarán evaluaciones de campo.

Búsqueda de aislados de CTV promisorios para su uso en protección cruzada en naranjas Navel.

Rubio, Leticia ⁽¹⁾; Maeso, Diego ⁽¹⁾; Bertalmío, Ana ⁽¹⁾; Rivas, Fernando ⁽¹⁾; Benítez, María José ⁽²⁾; Colina, Rodney ⁽²⁾

(1) Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay.

(2) Laboratorio de Virología, Universidad de la República, Regional Norte, Salto.

Introducción

Citrus tristeza virus (CTV) es el agente causal de una de las enfermedades virales más importantes de los cítricos; a partir de 1930 provocó la muerte de millones de plantas en plena producción injertadas sobre naranjo agrio (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Román *et al.*, 2004). En nuestro país la tristeza es endémica y está presente su vector más eficiente *Toxoptera citricida* (Bentancour *et al.*, 2009), por lo que la producción citrícola se realiza exclusivamente sobre portainjertos trifoliados, resistentes al patógeno. Sin embargo, se han reportado pérdidas de productividad en pomelos y naranjos dulces, aún al estar injertados sobre portainjertos resistentes (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra y Moreno, 2000), debido a que el virus produce acanaladuras en la madera que afectan el vigor de las plantas y el calibre de las frutas. También han sido reportadas cepas del virus que rompen la resistencia ofrecida por *Poncirus trifoliata* (Dawson y Money, 2000). Si bien, es posible eliminar este patógeno durante la etapa de saneamiento, la coexistencia del virus y el vector en el campo, no impiden que una planta saneada sea re-infectada en poco tiempo. La solución al manejo de la enfermedad en países con una situación similar a la de Uruguay (portainjertos tolerante y presencia de *T. citricida*) ha sido utilizar el mecanismo de “protección cruzada”. Esta medida consiste en disminuir los daños ocasionados por la infección de cepas severas de un virus mediante la pre-inoculación con cepas suaves del mismo virus (Roistacher *et al.*, 2010). Se sabe que CTV se encuentra en la planta como una mezcla de aislados que difieren en sus propiedades biológicas y de agresividad (Garnsey *et al.*, 2005) y, en ciertas circunstancias, aislamientos débiles protegen del efecto de los aislamientos severos. La diversidad genética y de reacciones biológicas que genera este virus hace necesario conocer las características de los aislados locales para implementar un programa de protección cruzada. En este contexto, INIA desarrolló el proyecto: “Caracterización molecular y biológica de aislamientos de campo de CTV de Uruguay y su potencial en la protección cruzada”, cuyo objetivo fue conocer las características de las cepas del virus que circulan en el país y seleccionar aislados promisorios para ser usados en protección cruzada. En una primera etapa se analizaron 20 aislados provenientes de diferentes especies cítricas y diferentes localidades, los resultados indicaron que existe un predominio de cepas severas, independientemente de la variedad y localidad. Por este motivo y con la finalidad de encontrar aislados suaves, en este trabajo, se inició un segundo análisis de aislados, en el cual para obtener mayor probabilidad de éxito se decidió acotar el estudio a naranjas del grupo Navel (por su interés comercial) y dirigir el muestreo a los mejores cuadros de esta variedad en el país.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 15 aislamientos de Navel (cultivares: Navelina, Lane Late, New Hall, W.Navel), de montes cítricos comerciales del Norte y Sur del país. Las muestras fueron colectadas de plantas con 10 a 25 años, de buen porte y producción. Se confirmó la presencia de CTV en las muestras mediante la prueba serológica DAS ELISA. Luego se realizó la caracterización biológica y molecular de los aislamientos.

a) Bioensayos. Se realizaron según la metodología propuesta por Garney, *et al.*, 1987, en un invernadero a prueba de insectos y con temperatura controlada (18-26°C). Cada aislamiento fue inoculado, mediante el injerto de dos trozos de corteza, en plantines de las 3 especies indicadoras de referencia: Lima mexicana (LM), Naranja Agrio (NA) y Pomelo Duncan (PD), utilizando 3 plantines de cada indicadora por aislamiento, además se utilizaron 4 controles positivos y negativos para cada indicadora. Se evaluaron las brotaciones post-inoculación registrando los síntomas esperables para cada indicadora. En LM se evaluó: aclaramiento de nervaduras, hoja de cuchara, nervadura corchosa, acanaladuras de la madera y enanismo; en NA: amarillamiento del plantín y enanismo y en PD: clorosis y acanaladuras de la madera. Se valoró la severidad de los síntomas usando una escala de 0 a 3 (0= sin síntomas, 1= leves, 2 moderados y 3= severos), de modo de obtener una respuesta caracterizada en cuanto a tipo y severidad de los síntomas inducidos por los diferentes aislados. Finalmente, se elaboró un índice acumulativo para cada indicadora y para el conjunto de indicadoras.

b) Caracterización molecular. Se utilizó la técnica de amplificación por RT-PCR, utilizando el método “primer específico” para los genes P25, P20 y P23 (genes supresores del silenciamiento por ARN interferencia y que brindan información filogenética) de CTV. Los productos amplificados fueron secuenciados y las secuencias nucleotídicas fueron alineadas con cepas de referencia internacional y se construyeron los árboles filogenéticos por el método de Maximum Likelihood del programa Mega 6.

Resultados y discusión

En el indexaje todos los aislamientos produjeron síntomas esperables en las distintas indicadoras (Tabla 1). Según las respuestas observadas durante la caracterización biológica, fue posible diferenciar 2 grupos de aislados que comparten reacciones. Un grupo, con 66% de los aislados, mostró síntomas moderados en LM y NA, así como marcadas acanaladuras en la madera en PD. Este grupo estaría constituido por aislados severos. Otro grupo produjo síntomas leves en LM y NA, pero generó notorias acanaladuras en la madera en PD.

En cuanto a la caracterización molecular, los resultados obtenidos indican que la mayoría de las secuencias estudiadas se agruparon en los clados pertenecientes a los genotipos: NC, T68 y T3, con menos frecuencia aparecen genotipos RB (Fig.1, Tabla 2). Los genotipos T68 y T3 están asociados a la producción de síntomas moderados a severos, mientras que los genotipos RB quiebran la resistencia de *P. trifoliata* generando infección sistémica, asintomática o con diferentes grados de severidad; no se han descrito características fenotípicas asociados al clado NC. La presencia de distintos genotipos en un aislado estaría indicando la presencia de infecciones mixtas.

Aislamiento	LM			NA	PD	Acumulado	
	VC	HC	Vck	SP	SY	SP	LM+NA+PD
F	1.7	2.0	0.3	3.0	3	2.2	12.2
ME	2	2	0.7	2.7	2.3	2.3	11.9
DS54	0.7	1.3	2.7	2.7	1.3	2.8	11.4
C. Oro	1.3	1.3	0.0	2.3	2	3	10.0
EK 5.1	1	1.7	1.7	2.7	0.3	2.5	9.8
M	1.3	1.3	0.7	2.0	1.3	2.3	8.9
SL	0.7	1	1	1.7	2	1.8	8.1
Q30	0.9	0.4	0.2	0.7	2	2	6.2
DS ST	1	0.7	0	1	1	2	5.7
FOR**	0	1	0	2	1	1	5.0
Q7	0.7	0	0	0	2	2.3	5.0
I 128	0	0.7	0.7	1	0	2.3	4.6
I 58	0.7	0.7	0	1	0	2.3	4.6
QNNL	0	0.3	0	1	1	2	4.3
SNH	1	0.3	0	1	0.7	1	4.0
Q16	0.7	0	0	0	1	1.7	3.4
TR7**	0.5	0	0	0	1	0	1.5

Tabla 1. Resumen de los principales síntomas* producidos por los distintos aislamientos en cada indicadora.

(*) LM: aclaramiento de nevaduras (VC), hoja de cuchara (HC), nevadura corchosa (Vck), acanaladuras de la madera (SP); en NA: amarillamiento del plantín (clorosis y enanismo) y en PD: acanaladuras de la madera (SP). Escala de severidad de síntomas: 0- sin síntomas, 1-leves, 2-moderados y 3-severos.

(**): Testigos positivos utilizados.

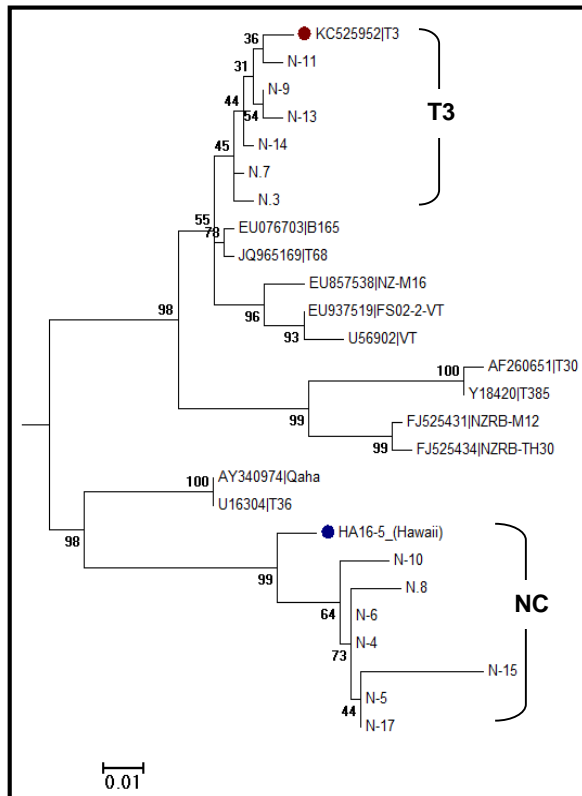


Tabla 2. Resumen de los genotipos obtenidos a partir de árboles filogenéticos para los genes P20, P23 y P25.

Código muestra	Código A. molecular	P20	P23	P25
SNH	3	T3	RB?	NC
ME	4	NC	xx	x
Q30	5	NC	xx	NC
I 128	6	NC	xx	NC
I 58	7	T3	T3	NC
DSST	8	NC	T68	NC
C.Oro	9	T3	T68	RB
DS 54	10	NC	T68	NC
M	11	T3	T3	xx
EK	12	NC?	T68	xx
F	13	T3	xx	xx
QNNL	14	T3	T68	NC
Q7	15	NC	xx	x
Q16	16	x	T68?	RB
SL	17	NC	xx	NC

Fig.1. Árbol filogenético para el gen P23. Los aislados uruguayos se representan con la letra N y el número de muestra

x : no se obtuvo secuencia de calidad
 xx: no amplificó
 ?: es probable que pertenezca a ese genotipo

Esta nueva caracterización refuerza la idea de que en nuestro país circulan principalmente cepas severas de CTV y es difícil encontrar aislados promisorios suaves. Sí bien, hay aislados que dan síntomas leves en la mayoría de las reacciones esperadas en el test biológico, luego mostraron SP moderado a severo en PD. No obstante, conociendo el comportamiento biológico y los genotipos dominantes fue posible seleccionar 3 aislados para comenzar a trabajar en protección cruzada para naranjas Navel.

Referencias bibliográficas

- Bar-Joseph, M.; Marcus, M.; Lee, R. 1989. The continuous challenge of *Citrus Tristeza Virus* control. Annual Review of Phytopathology, 27: 291-316.
- Bentancourt, C.; Scatoni, I. 1999. Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Montevideo, Facultad de Agronomía- PREDEG/GTZ.
- Cambra, M., Moreno, P. 2000. Tristeza. In: Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. N°2: 77-81.
- Dawson, T. y Money P. 2000. Evidence for trifoliolate resistance breaking isolates of *Citrus tristeza virus* in New Zealand. In: Da Graça, JV; Lee, RF; Yokomi, RK (eds.). Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, pp 69-76.
- Garnsey, S.; Civerolo, I.; Gumpf, J.; Paul, C., Hilf, E.; Lee, R.; Brlansky, R.; Yokomi, K.; Hartung, S. 2005. Biological characterization of an International Collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. In: M. E. Hilf, N. Duran-Vila, M.A.Rocha-Peña (eds.). Proceedings of the 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside.75-93.
- Garnsey, S.; Gumpf, J.; Roistacher, C.; Civerolo, I.; Lee, R.; Yokomi, K.; Bar-Joseph, M.1987. Toward standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica* 19:151-157.
- Roistacher, C.; Da Graça, J.; Müller, G. 2010. Cross Protection Against *Citrus tristeza virus* - a Review. In: *Proc. 17th Conf. IOCV*, 1-27.

Detección y caracterización de virus y viroides en la Citricultura del Uruguay: aportes sobre el nuevo linaje de CTV en Sudamérica y su repercusión en la protección cruzada

María José Benítez-Galeano¹; Estefany Bertoni¹; Ana Bertalmío²; Leticia Rubio²; Fernando Rivas²; Diego Maeso²; Rodney Colina¹.

¹Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de la República, CENUR Noroeste, Sede Salto, Uruguay.

²Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay.

Palabras Clave: CTV; CPsV; CEVd, Nuevo Linaje Genético; Técnicas Moleculares; Filogenia; Protección Cruzada.

Contacto: rodneycolina1@gmail.com

Introducción.

Los cítricos son el cultivo frutal más importante a nivel económico en el mundo. Las distintas especies de cítricos son susceptibles a numerosas enfermedades causadas por patógenos intracelulares tales como virus y viroides. Éstas influyen directamente en la producción citrícola, generando importantes pérdidas económicas en todas las zonas afectadas del mundo y en nuestro país se estiman en el orden del 30% de la producción citrícola nacional.

Desde que apareció hace dos siglos atrás, la enfermedad conocida como Tristeza, es la enfermedad viral más devastadora de la industria citrícola a nivel mundial (Roistacher *et al.*, 2010). Su agente etiológico, el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV), es transmitido por injerto de material vegetal infectado o principalmente por áfidos de los géneros *Toxoptera* y *Aphis* (Moreno *et al.*, 2008). La existencia de variantes genéticas del virus con diversos grados de severidad, han sido reportadas en todas las áreas citrícolas afectadas del mundo. La presencia de CTV y su vector más eficiente, *T. citricida*, ha sido descrita en Uruguay desde los años 40 (Koch de Brots & Boaso, 1955).

Como resultado de errores en la replicación, eventos de recombinación y transmisión mediada por el vector, los aislados de CTV se encuentran en la naturaleza como poblaciones de variantes de secuencia que muestran diferentes características biológicas (Kong *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2001). Es así que estudios de la diversidad genética de las poblaciones de CTV se han descrito como altamente relevantes para el desarrollo de estrategias de control, como planes de protección cruzada, que han sido desarrollados satisfactoriamente en países como Brasil, Sudáfrica o Perú (Roistacher *et al.*, 2010). La receta para que la protección cruzada funcione es identificar en primer lugar los aislados severos que necesitan ser controlados y luego encontrar aislados suaves del mismo genotipo pre inmunizar las plantas; la protección cruzada es genotipo específica (Folimonova, 2013).

CTV, junto con el virus de la Psorosis de los cítricos (CPsV) y el viroide que produce la Exocortis (CEVd), son los agentes de esta naturaleza de mayor incidencia en los cultivos cítricos de nuestro país. Con el fin de establecer la incidencia de dichos patógenos a nivel nacional, se realizan colectas en las distintas zonas cítricas del Uruguay y se desarrollaron metodologías de biología molecular para el diagnóstico y caracterización de estos patógenos en variedades de interés comercial como naranjas de los grupos Navel y Valencia, mandarinas del grupo de las Clementinas y también limones.

Materiales y Métodos.

Para la primera etapa del trabajo se utilizaron un total de 15 muestras de campo. La extracción del ARN total se realizó con el *RNeasy Plant Mini Kit* de QIAGEN según recomendaciones del fabricante y la síntesis del ADN copia se realizó utilizando *primers* randómicos. Se estandarizó un sistema de detección rápido y sensible, por PCR en tiempo real con tecnología TaqMan, mediante la amplificación de un fragmento de la región 3'UTR del genoma viral. Para la caracterización de los aislados, se amplificaron por PCR en tiempo final, tres genes del genoma de CTV (p25, p20 y p23) mediante protocolos publicados por Iglesias y colaboradores (2008) y Rubio y colaboradores (2001). Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa al 2% y los amplicones purificados mediante el uso de kits comerciales siguiendo las normas del fabricante. La secuenciación de los aislados se realizó de manera bidireccional en la plataforma del Instituto Pasteur de Montevideo. Por otro lado, y con el objetivo de conocer la composición de las poblaciones virales, se clonaron los amplicones para los tres genes analizados para el total de las muestras. Se analizó un total de al menos 10 clones por muestra y se secuenciaron bidireccionalmente como en el caso anterior. La edición de las secuencias nucleotídicas se realizó con el programa SeqMan, y los alineamientos con sus correspondientes análisis filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 6. Los árboles filogenéticos se realizaron con el método *Maximum Likelihood* bajo el modelo *HKY* con aLRT como soporte estadístico.

Está previsto coleccionar un total de 1070 muestras distribuidas como se indica en la figura 1^a. Al momento se han coleccionado 223 muestras de las regiones cítricas indicadas en la figura 1B. La detección de CTV se realiza mediante PCR en tiempo real con metodología TaqMan (Bertolini *et al.*, 2008), CPsV mediante PCR en tiempo final (Roy *et al.*, 2005) y CEVd utilizando PCR en tiempo real con el kit Quanti Fast SYBR Green RT-PCR (QIAGEN) según recomendaciones del fabricante. La caracterización de los aislados de CTV se realiza mediante secuenciación de los genes p20, p25 y p23 como se realizó en la primera etapa del presente trabajo.

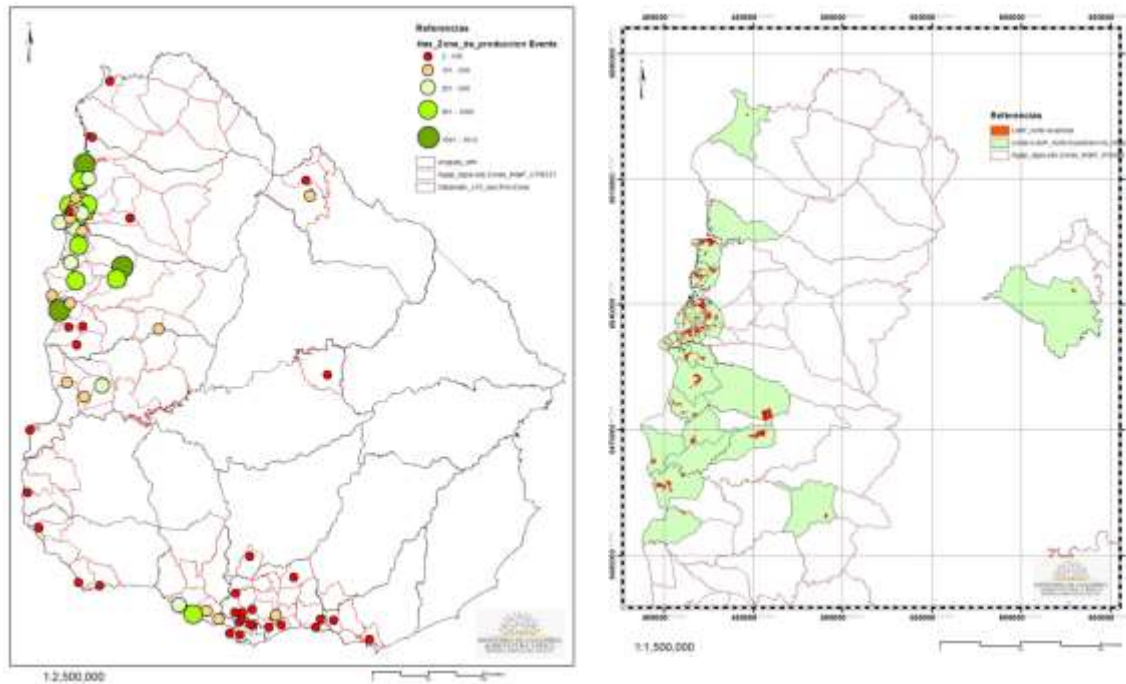


Figura 1. A. Zonas cítricas del país donde se realizarán los muestreos. B. Zona Norte donde el muestreo se ha realizado.

Resultados y Discusión

Como se muestra en la figura 2, mediante este análisis detectamos la presencia de cuatro linajes co-circulantes con distinta prevalencia, tres de ellos previamente descritos (VT, T3 y T36) y el cuarto identificado en este trabajo, denominado nuevo clado, NC (Benítez-Galeano *et al.*, 2015). Este último linaje está compuesto por aislados de Uruguay y Argentina, así como de países de los cinco continentes. El genotipo más prevalente fue el genotipo VT, como ha sido reportado para el resto del mundo. Estos resultados muestran que las cepas que circulan en nuestro país presentan una gran variabilidad genética, así como las que circulan en la región y el mundo.

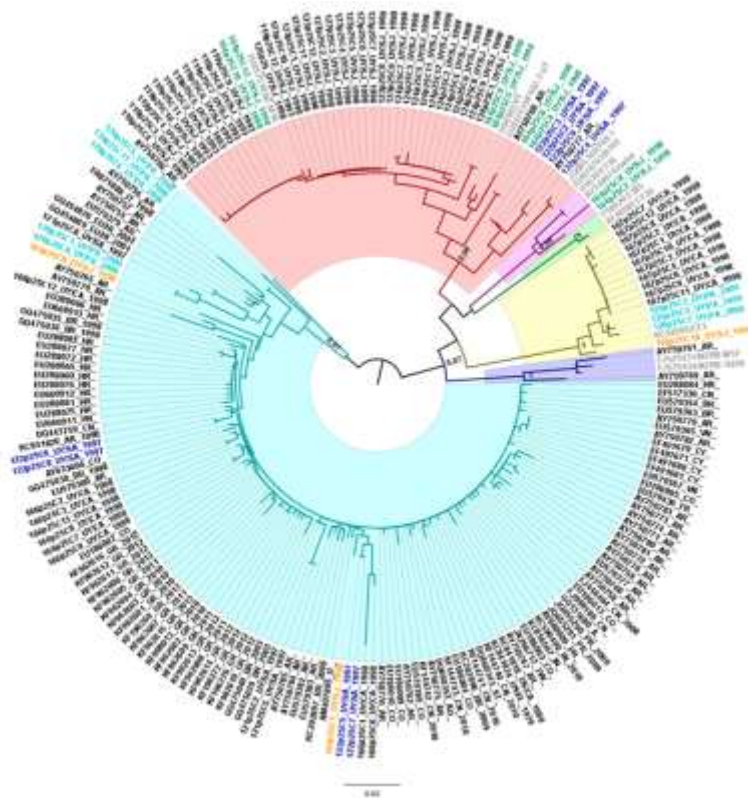


Figura 2. Árbol filogenético para el gen p25 de CTV donde se muestran los distintos genotipos descritos en la literatura (VT, rojo; T36, violeta; T30, verde; T3, amarillo; RB, azul) y el nuevo linaje (turquesa). En gris se marcan las secuencias de referencia. Los principales nodos con valores de aLRT están indicados.

En cuanto a la presencia de los virus CTV y CPsV, se han analizado 223 muestras de las cuales 178 resultaron positivas para CTV, mientras que solamente 8 resultaron positivas para CPsV (Figura 3)

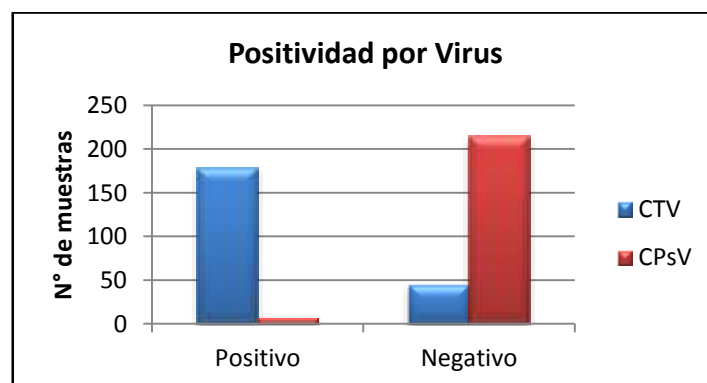


Figura 3. Positividad de CTV y CPsV en las muestras analizadas.

En cuanto a la positividad de cada virus desglosada por variedad cítrica afectada encontramos que el 60% de las muestras positivas para CTV fueron de naranja, 15% de mandarina y 5% de limón, mientras que el restante 20% fueron negativas. Respecto a CPsV, todas las muestras positivas fueron de naranja y representaron un 4% del total de las muestras analizadas (Figura 4). Ninguna de las muestras de mandarina o limón fue positiva para CPsV.

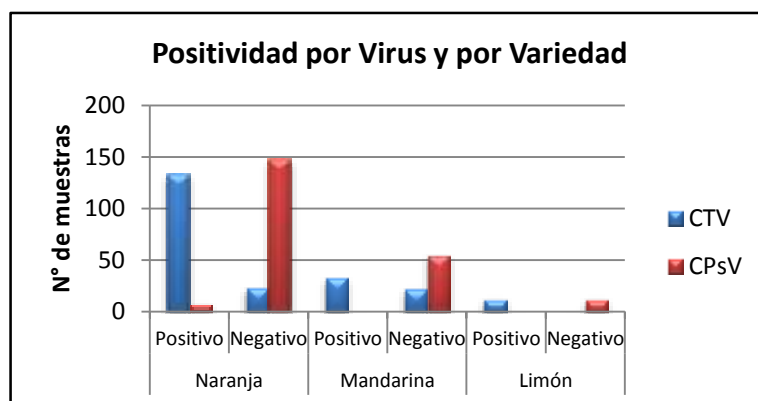


Figura 4. Positividad de CTV y CPsV en las muestras analizadas distribuido por variedad cítrica.

Por último, respecto a la caracterización de los aislados de CTV, encontramos que un 8% de los aislados corresponde al genotipo VT descrito como el prevalente en el mundo, un 1% de las muestras fueron del genotipo T3, y sorprendentemente el restante 91% de las muestras secuenciadas para el gen p25 corresponden al nuevo clado descrito previamente por nuestro grupo (Figura 5). Esta redistribución aparente en la prevalencia de los distintos genotipos en nuestro país es de suma importancia el tenerla en cuenta a la hora de buscar aislados protectivos para el futuro plan de protección cruzada.

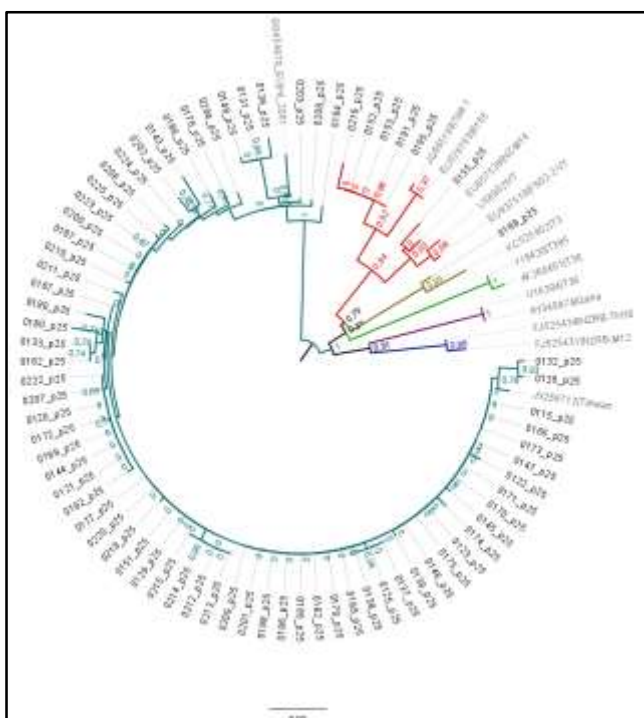


Figura 5. Árbol filogenético para el gen p25 de aislados Uruguayos de CTV. Se muestran los distintos genotipos descritos (VT, rojo; T36, violeta; T30, verde; T3, amarillo; RB, azul) y el nuevo linaje (turquesa). En gris se marcan las secuencias de referencia. Los valores de aLRT están indicados.

Conclusiones

Los resultados del presente estudio contribuyen a un mejor entendimiento de las diversas poblaciones de CTV que circulan en nuestro país, brindando información para el desarrollo de planes de protección cruzada apropiados a nuestra región geográfica. Los datos presentados aquí, muestran los distintos genotipos de CTV que circulan en Uruguay. La presencia del nuevo linaje genético refleja la continua diversificación del virus, reafirmando la importancia de estudios genómicos profundos y una vigilancia constante. La necesidad de análisis posteriores, como la caracterización biológica y la secuenciación del genoma completo de CTV del nuevo linaje, son de gran importancia para caracterizar completamente este nuevo genotipo y a su vez utilizarlo como aislado preinmunizador promisorio para la protección cruzada.

La vigilancia continua es importante para detectar la presencia de nuevos genotipos de CTV que puedan causar problemas en la industria, así como también la presencia y distribución de CPsV y CEVd para un manejo y control adecuados.

Bibliografía

- Benítez-Galeano, M.J.; Rubio, L.; Bertalmío, A.; Maeso, D.; Rivas, F.; Colina, R.** Phylogenetic studies of the three RNA silencing suppressor genes of South American CTV isolates reveal the circulation of a novel genetic lineage. *Viruses*. 2015, 7, 4152-4168; doi:10.3390/v7072814.
- Roistacher, C.N.; da Graça, J.V.; Müller, G.W.** Cross Protection Against Citrus Tristeza Virus a Review. In Proceedings of the 17th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 2010; Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W., Eds.; IOCV: Riverside, CA, USA, 2010; pp. 1–27.
- Kong, P.; Rubio, L.; Polek, M.; Falk, B.** Population structure and genetic diversity within California Citrus tristeza virus (CTV) isolates. *Virus Genes* 2000, 21, 139–145.
- Rubio, L.; Ayllon, M.A.; Kong, P.; Fernandez, A.; Polek, M.L.; Guerri, J.; Moreno, P.; Falk, B.W.** Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *J. Virol.* 2001, 75, 8054–8062.
- Folimonova, S.Y.** Developing an understanding of cross-protection by Citrus tristeza virus. *Front. Microbiol.* 2013, 4, e76.
- Moreno, P.; Ambros, S.; Albiach-Marti, M.R.; Guerri, J.; Peña, L.** Plant diseases that changed the world Citrus tristeza virus: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant Pathol.* 2008, 9, 251–268.
- Koch de Brotos, L.; Boasso, C.** Lista de las Enfermedades de los Vegetales en el Uruguay; Ministerio de Ganadería y Agricultura, Dirección de Agronomía, Laboratorio de Fisiología y Patología Vegetal: Montevideo, Uruguay, 1955; p. 65.

Cancro cítrico: Aportes sobre el uso de inductores de resistencia para el control de la bacteria.

Rubio, L.; Alves, P.; Blanco, O.; Guimaraens, A.; Amaral; J. Pérez, E..

Programa Nacional de Investigación en Producción Cítrica. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.

Contacto: lrubio@inia.org.uy, elenaperez@inia.org.uy

1. Introducción.

El cancro cítrico es la principal enfermedad bacteriana que afecta los cítricos en Uruguay. Su agente causal, *Xanthomonas citri subsp citri*, es plaga cuarentenaria para mercados lucrativos lo que exige un manejo muy riguroso de la bacteria. La principal medida de control, se basa en pulverizaciones con productos químicos dirigidas a la protección de brotes y frutos susceptibles. Los productos que han demostrado mayor efectividad son aquellos que contienen como mínimo 50% de cobre metálico en formulación como polvo mojable micronizado. Son ejemplo de ellos, el sulfato de cobre tribásico (polvo mojable PM), el oxiclورو de cobre micronizado (PM), el hidróxido de cobre (PM), el óxido cuproso (PM) y similares (Canteros, 2006). En Uruguay, las aplicaciones de oxiclورو de cobre y óxido cuproso son la opción principal para el control de la enfermedad. Se realizan entre 4 y 6 pulverizaciones por temporada, según las condiciones predisponentes y susceptibilidad de la variedad. A pesar del uso reiterado, no se han detectado cepas resistentes. Como no existen restricciones de uso (dosis) por los mercados compradores, es previsible que los productos a base de cobre se sigan utilizando como herramienta fundamental para el control de cancro cítrico. Sin embargo, su uso puede estar limitado por condiciones ambientales. En verano, si las temperaturas son altas en el momento de aplicación, generalmente se producen daños cosméticos en la fruta (manchado) y por consecuencia el descarte de la misma. En los últimos años, han aumentado las evidencias sobre el efecto beneficioso de los productos inductores de resistencia (IR) para el control de enfermedades y aunque los antecedentes sobre el uso de estos productos para el control de cancro cítrico son limitados, los IR pueden ser una alternativa para complementar las aplicaciones de cobre en el verano. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el uso de los IR disponibles en Uruguay sobre el control de cancro cítrico y daños en la cosmética de la fruta.

2. Materiales y métodos

2.1. Ensayos en invernadero.

Se realizaron 6 experimentos para evaluar el efecto de diferentes productos, dosis de aplicación y permanencia de la inducción en condiciones de invernáculo. Se utilizaron plantas de Limón criollo/*P. trifoliata* (experimentos 2 y 3) y/o de Naranja Navel cv. Fisher/*P. trifoliata* (experimento 1, 3, 4, 5 y 6) por su sensibilidad a cancro cítrico. En los experimentos 1 a 4, los inductores aplicados al suelo fueron disueltos en 200 mL de agua por maceta. Las aplicaciones foliares se realizaron hasta punto de goteo con el auxilio de un aspersor. En los experimentos 5 y 6 los inductores fueron aplicados en la línea de riego. A los 7 días de aplicados los tratamientos, las plantas de los experimentos 1,2, 4 - 6 fueron inoculadas por

infiltración utilizando una jeringa para insulina sin aguja en 3 sitios diferentes en cada lado de la hoja separado por la nervadura central (6 sitios en total por hoja). El experimento 3 fue inoculado por aspersión y en el experimento 4 se evaluaron las dos formas de inoculación para cada tratamiento.

2.1.1 Tratamientos

Los tratamientos, dosis y forma de aplicación figuran en los cuadros 1 a 5.

Cuadro 1. Ensayo 1. Tratamientos aplicados a plantas de naranja Navel vr "Fisher" de 2 años de edad en condiciones de invernáculo para el control de cancro cítrico.		
Producto	Aplicacion	Dosis por planta (p.a)
Acibenzolar-s-metilo 50% wg	foliar	2 mg
Acibenzolar-s-metilo 50% wg	suelo	10 mg
Imidacloprid 35% (p/v)	suelo	1,5 mg
Quitosan (4%)	suelo	1,25 mL
Control inoculado, sin tratamiento	suelo	250 mL
Control inoculado con tampón fosfato	suelo	250 mL

Cuadro 2. Ensayo 2. Tratamientos aplicados a plantas de limón tipo criollo de 2 años de edad en condiciones de invernáculo para el control de cancro cítrico.		
Producto	Aplicacion	Dosis por planta (p.a)
Acibenzolar-s-metilo 50% wg	suelo	2 mg
Acibenzolar-s-metilo 50% wg	suelo	20 mg
Imidacloprid 35% (p/v)	suelo	1,5 mg
Imidacloprid 35% (p/v)	suelo	3 mg
Quitosan (4%)	suelo	1,25 mL
Quitosan (4%)	suelo	12,5 mL
Fosfirend	suelo	1,5 mg
Fosfirend	suelo	3 mg
Control inoculado, sin tratamiento	suelo	500 mL
Control inoculado con tampón fosfato	suelo	500 mL

Cuadro 3. Ensayo 3. Tratamientos realizados en plantas de naranja Navel vr Fisher y plantas de limón criollo en condiciones de invernáculo para el control de cancro cítrico		
Producto	Aplicacion	Dosis por planta (p.a)
Acibenzolar-s-metilo 50% wg	foliar	40 mg
Acibenzolar-s-metilo 50% wg	foliar	20 mg
Imidacloprid 35% (p/v)	suelo	1,5 mg
Imidacloprid 35% (p/v)	suelo	3 mg
Quitosan (4%) riego + fosfirend foliar	suelo /foliar	1,25 mL + 0,3%
Quitosan (4%) riego + fosfirend foliar	suelo /foliar	2,5 mL + 0,3%
Fosfirend	suelo	1,5 mg
Fosfirend	suelo	3 mg
Fosfirend	foliar	0,3 %
Control inoculado, sin tratamiento	suelo	500 mL
Control inoculado con tampón fosfato	suelo	500 mL

Cuadro 4. Ensayo 4. Tratamientos realizados en plantas de naranja Navel vr Fisher y plantas de limón criollo en condiciones de invernáculo para el control de cancro cítrico		
Producto	Aplicacion	Dosis por planta (p.a)
Imidacloprid 35% (p/v)	suelo	1,5 mg
Imidacloprid 35% (p/v)	suelo	3,0 mg
Quitosan (4%)+ fosfirend 1,7% (p/p)	suelo/foliar	60 mg +20 mg
Quitosan (4%)+fosfirend (p/p)	suelo/foliar	120 mg + 40 mg
Fosfirend 1,7% (p/p)	foliar	6 mg
Microorganismos efectivos (EM)	foliar	0,1%
Control inoculado, sin tratamiento	suelo	500 mL
Control inoculado con tampón fosfato	suelo	500 mL

Cuadro 5. Ensayo 5 y 6. Tratamientos realizados en plantas de naranja Navel cv. Fisher para el control de cancro cítricos		
Producto	Aplicación	Dosis por planta (p.a)
Quitosano 4% (Bioroot)	suelo	60 mg
Quitosano 2,5% (Biorend-Cobre)	suelo	60 mg + 92 mg
Alginato de cobre 15% (Tixan)	suelo	225 mg
Hidróxido de cobre	foliar	0,15 % (pc)
Control inoculado, sin tratamiento	suelo	500 mL
Control inoculado con tampón fosfato	suelo	500 mL

2.1.2 Análisis estadístico

Asumiendo que la distribución de los datos provienen de una familia exponencial, consideramos que el modelo es lineal generalizado. Pero, como las variables de respuestas son recuentos y proporciones en algunas situaciones se optó por considerar el modelo lineal generalizado mixto. De acuerdo con las condiciones del experimento los procedimientos para los análisis de varianza utilizados fueron GLM o GLIMMIX del paquete estadístico SAS® V 9.1. Las medias fueron separadas por test de Tukey ($P \leq 0.05$).

2.2. Ensayos en campo.

En campo se desarrollaron ensayos para evaluar la acción de los IR sobre el control de cancro y daños en la cosmética de la fruta. Los productos fueron aplicados de dos maneras: 1) durante toda la temporada y 2) se incorporaron solo en aplicaciones de verano (enero y febrero) al esquema tradicional de aplicaciones con cúpricos. Los ensayos se desarrollaron en un monte comercial de naranja Navelina/*P. trifoliata* de 10 años, con un marco de plantación de 6m x 3m. El diseño utilizado fue de bloques completos al azar, cada tratamiento tuvo 3 repeticiones y cada parcela estuvo constituida por 18 plantas. La aplicación de los productos se realizó con una pulverizadora de picos, siendo el gasto de agua de aproximadamente 4 litros por planta. Se realizó evaluación de incidencia y severidad de cancro e incidencia de fruta manchada por fitotoxicidad. Los datos se analizaron mediante el procedimiento estadístico Genmod de SAS, el análisis de medias se hizo por Lsmeans.

Temporada 2011-2012. Al esquema tradicional de cobres en primavera, se aplicaron en verano (20 de enero y el 22 de febrero) los productos Flobordo (Hidróxido de Cobre, 4% (p/v)) y Biorend Cu (Quitosano 1,9%(p/v) y Sulfato de cobre 29,3%(p/v) de cobre, 200cc/100L).

Temporada 2012-2013. Los IR fueron aplicados durante toda la temporada para evaluar su eficiencia frente a los tratamientos con cobre. También se evaluó el efecto de coadyuvantes para el cobre. Se utilizaron los productos: Afital cobre (Anhídrido fosfórico 25%, Cobre 5%), Tixan (Alginato de cobre, 300cc/100L), Biorend Cu (Quitosano 1,9%(p/v)) y Sulfato de cobre 29,3%(p/v), 200cc/100L), Flobordo (Hidróxido de Cobre, 4% (p/v) de cobre, 150cc/100L)) y los coadyuvantes: Silwet y Nufilm.

Temporada 2013-2014. Los IR fueron aplicados: a) como único producto en primavera y verano; b) solo en verano, sobre los cobres usados en primavera, utilizando los productos: Tixan (Alginato de cobre, 300cc/100L) y Biorend Cu (Quitosano 1,9%(p/v)) y Sulfato de cobre 29,3%(p/v), 200cc/100L.

3. Resultados

3.1 Ensayos en invernáculo

En los ensayos 1 a 3 no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. A partir del ensayo 4, algunos tratamientos redujeron el número de pústulas promedio por tratamiento (cuadro 6 y 8) o el número de sitios de inoculación con infecciones positivas (cuadro 7).

Producto	Aplicación	Dosis por planta (p.a)	Número de pústulas promedio por tratamiento
Imidacloprid 35% (p/v)	suelo	1,5 mg	12,32 AB
Imidacloprid 35% (p/v)	suelo	3,0 mg	7,77 A
Quitosan (4%)+ fosfirend (1.7%)	suelo/foliar	60 mg +20mg	11,55 A
Quitosan (4%)+fosfirend (1.7%)	suelo/foliar	120 mg + 40 mg	12,01 A
Fosfirend (1,7%)	foliar	6 mg	18,31 C
Microorganismos efectivos (EM)	foliar	0,1%	13,77 B
Control inoculado, sin tratamiento			15,94 BC

Tratamiento	Sitios de inoculación
Oxicloruro de cobre 85% (p/p)	0,0186 A
Quitosano 1,9% (p/v); Sulfato de cobre pentahidratado 30,5% (p/v)	0,2592 A B
Quitosano 4% (p/v)	0,3147 A B
Alginato de cobre 15% (p/v)	0,3518 A B
Control inoculado	0,4261 B
CV (%)	92.77

Tratamiento	Pústulas promedio por tratamiento (en número)		
	Fecha de evaluación del experimento		
	Dic 2013	Set 2014	Nov 2014
Oxicloruro de cobre 85% (p/p)	9,87 A	0,02 A	8,35 A
Quitosano 1,9% (p/v); Sulfato de cobre pentahidratado 30,5% (p/v)	7,55 A	0,31 AB	10,31 A
Quitosano 4% (p/v)	16,37 B	0,48 B	22,15 B
Alginato de cobre 15% (p/v)	6,17 A	0,57 B	10,05 A
Control inoculado	19,67 B	0,65 B	25,81 B
CV (%)	74,19	206,53	74,85

3.2 Ensayos en campo

Temporadas:

- 2011-12: no hubo diferencias significativas entre tratamientos para el control de cancro debido a la baja incidencia de la bacteria por falta de condiciones ambientales predisponentes (precipitaciones). Por lo tanto, no fue posible sacar conclusiones sobre la efectividad de control de estos productos. En lo que respecta al manchado, el tratamiento con aplicación de Flobordo (Hidróxido de Cobre, 4% (p/v) en verano produjo menor porcentaje de fruta manchada, diferenciándose del resto de los tratamientos.
- 2012-13: todos los tratamientos se diferenciaron significativamente del testigo comercial en cuanto al control de cancro. Los tratamientos con cobres lograron mayor porcentaje de fruta sana (85%) que los tratamientos que incluyeron IR (50-60%) y hubo diferencias significativas entre tratamientos con IR. El uso de coadyuvantes no mejoró el control de los tratamientos con cobre. Hubo importante incidencia de fruta manchada en uno de los tratamientos con IR.
- 2013-14: todos los tratamientos se diferenciaron significativamente en control de cancro frente al testigo sin tratar. Nuevamente, los tratamientos con cúpricos fueron más eficientes, logrando más de 80% de fruta sana, frente a los tratamientos con IR. Sin embargo, el tratamiento que recibió oxiclورو de cobre durante la primavera y en verano un IR, fue el que presentó menor incidencia de la enfermedad, aunque, no se diferenció estadísticamente del tratamiento con óxido cuproso. Se observó fruta manchada en tratamientos con cobres y con IR.

4. Conclusiones

En los ensayos de invernáculo ninguno de los productos evaluados se comportó mejor o igual que las aplicaciones foliares de oxiclورو de cobre. El imidacloprid tuvo un efecto significativo en el control de la enfermedad, pero su uso fue prohibido en mercados compradores. El alginato de cobre y la mezcla de quitosano con cobre son los productos que serán considerados en futuros ensayos en campo en aplicaciones en suelo.

En las evaluaciones realizadas en campo en aplicaciones foliares los IR evaluados mostraron efecto sobre el control de cancro, pero su eficiencia fue significativamente menor a la de los cobres cuando se utilizan como único producto de control durante la temporada. Sin embargo, fueron efectivos integrados a un esquema de control que tuvo como base cúpricos. No obstante, han tenido un comportamiento errático en cuanto a incidencia de fruta manchada, por lo que no han ofrecido hasta el momento una solución para evitar el daño originado por las aplicaciones de cobre en verano.

Validación de una estrategia de manejo integrado para el control de Mancha Negra de los cítricos

Elena Pérez, Pablo Alves.

Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.

Contacto: elenaperez@inia.org.uy

1. Introducción.

Mancha Negra de los cítricos es una enfermedad que afecta a todos los cultivos de interés comercial, principalmente naranjas y limones. Una vez presente, el hongo se reproduce sobre las frutas afectadas, hojas caídas en el suelo y posiblemente sobre ramas secas. Infecta a las frutas desde cuajado hasta aprox. los 5 cm de diámetro y a las hojas durante todo su crecimiento. Tiene un período de latencia prolongado, observándose la mayor expresión de la enfermedad luego del cambio de color de la fruta. En Uruguay fueron identificados los estados reproductivos sexual y asexual del hongo, lo que permite que se cumpla el ciclo completo de la enfermedad por la presencia de los dos tipos de esporas (sexual y asexual). Las hojas caídas en el suelo en estado papiráceo constituyen la fuente de inóculo delestado reproductivo sexual del hongo y los frutos y hojas con lesiones constituyen la fuente de inóculo del estado reproductivo asexual. La literatura menciona que las ramas secas pueden ser fuente de inóculo, aunque no existen trabajos confirmatorios. El patógeno que produce la Mancha Negra de los cítricos es poco agresivo, expresándose la enfermedad mayormente en plantas poco nutridas o que estuvieron expuestas a períodos de estrés como heladas, hídrico, ataque severo de plagas, etc. El manejo integrado de la enfermedad consiste en disminuir las fuentes de inóculo y la dispersión del mismo, proteger los tejidos susceptibles de la planta, evitar el desarrollo del hongo en tejido afectado y mejorar la defensa de las plantas evitando el estrés por falta de agua y nutrientes o ataque de plagas y enfermedades. Basados en los conocimientos manifestados anteriormente, el objetivo del presente trabajo consistió en validar un conjunto de medidas que contribuyan al manejo integrado de la Mancha Negra de los cítricos interviniendo sobre el ciclo de la enfermedad.

2. Materiales y Métodos

2.1. Control de las fuentes de inóculo.

- 2.1.1. Control de ramas secas. Previo a la floración (primavera) se retiraron mediante poda todas las ramas y ramitas secas.
- 2.1.2. Control de hojas en estado papiráceo. Consistió en la siembra de un abono verde en la entrefila que fue incorporado bajo la fila mediante pastera especial y el aspirado de las hojas secas a inicio del experimento.
- 2.1.3. Control de inóculo sobre las lesiones en frutas. Las frutas fueron cosechadas previo a la floración.

2.2. Protección de la planta contra las infecciones del patógeno.

Desde botón cerrado hasta principio de verano se realizaron tratamientos basados en cobre para proteger a la fruta durante el crecimiento de varios patógenos importantes para el cultivo de naranja Valencia (Cancro Cítrico, Melanosis y Mancha Negra). Las aplicaciones se realizaron con óxido cuproso (1,0%) con aceite mineral (0,5%).

2.3. Control del desarrollo del hongo en tejidos infectados. Se realizó en verano un tratamiento con Comet (400 ml cada 2000 L) para controlar las infecciones latentes que se hubiesen establecido en frutos y hojas.

2.4. Medidas para mejorar la defensa de las plantas. Se realizaron todas las medidas de manejo habituales para la producción de naranja Valencia de calidad para exportación como el aporte de nutrientes a las plantas, el control de plagas, malezas y poda.

2.5. Fertilización. Al inicio de primavera se realizó el siguiente esquema de fertilización por planta adulta: ½ Kg de superfosfato de Ca, 1 Kg de Cloruro de K y 1 Kg de Urea.

2.6. Control de plagas. Para el control de cochinillas se realizó una aplicación de Lorban y aceite en noviembre.

Resultados.

A inicio del experimento (setiembre 2012), el cuadro presentaba un 92% de fruta afectada por la enfermedad, índice que se redujo al 9% mediante medidas de manejo integrado se redujo al en la siguiente zafra (setiembre 2013). En el cuadro testigo (manejo convencional) la incidencia en frutas fue de 80%. En los siguientes años (setiembre 2014 y julio 2015) se mantuvieron valores similares (Cuadro 1).

Incidencia de Mancha Negra en fruta de naranja Valencia proveniente de un cuadro con manejo integrado y un cuadro con manejo tradicional				
	Manejo integrado		Manejo convencional	
Año	Incidencia (%)	Nro. de lesiones promedio por fruta enferma	Incidencia (%)	Nro. de lesiones promedio por fruta enferma
2013	9	1,3	80	5,4
2014	6	1,6	83	5,1
2015	5	1,0	90	5,1

4. Conclusiones.

En las condiciones de Uruguay, en una variedad sensible como Naranja Valencia, los resultados del experimento indican que la enfermedad es de bajo riesgo epidemiológico sí:

- a) Las plantas se mantienen en condiciones saludables (adecuada fertilización, riego, control de plagas y enfermedades, etc.).
- b) Se realiza un adecuado control de las hojas caídas en el suelo (fuentes de inóculo) evitando la acumulación en estado papiráceo en los meses de mayor riesgo de liberación de inóculo (verano).
- c) Se aplican los tratamientos durante la primavera para el control de plagas y enfermedades y un tratamiento preventivo para Mancha Negra en verano a base de un producto sistémico para disminuir posibles infecciones latentes.
- d) Se eliminan ramas y ramillas secas.

Alternaria en mandarinas: Contribución de la investigación para el control integrado de la enfermedad.

Rubio, L., Pérez, E.,

Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.

Contacto: lrubio@inia.org.uy , elenaperez@inia.org.uy

1. Introducción.

La enfermedad conocida como “mancha marrón de las mandarinas” es ocasionada por el hongo *Alternaria alternata* Fr. (Keissler) pv. citri Solel y afecta principalmente a la mandarina ‘Dancy’ y sus híbridos. En Uruguay se la ha observado en los híbridos ‘Murcott’, ‘Fortune’, ‘Nova’ y Tangelo ‘Orlando’ (Bernal, 2009). Las condiciones ambientales de las regiones cítricas de Uruguay son propensas para el patógeno y en años conductivos para la enfermedad, las mandarinas muy sensibles como ‘Dancy’ y ‘Fortune’ han presentado pérdidas que hacen inviable la producción de estas variedades. En cambio, la producción de variedades con sensibilidad intermedia como ‘Murcott’ y ‘Nova’ puede ser rentable bajo una estrategia de manejo adecuado. Para el control de la enfermedad, se recomienda aplicar prácticas culturales que favorezcan el secado rápido de las hojas, evitar un excesivo crecimiento de brotes vegetativos, no utilizar variedades muy sensibles y principalmente la protección de los tejidos susceptibles con fungicidas. Por ello, en los últimos años, en el marco del proyecto “contribuciones para mejorar el estado sanitario y la inocuidad de la fruta cítrica” se han desarrollado trabajos de investigación en mandarina ‘Nova’ y ‘Murcott’ que aportan a mejorar la estrategia de control de la enfermedad. Para ello: a) se ha estudiado el periodo de susceptibilidad de los brotes y de la fruta con el propósito de mejorar los momentos de control; b) se han evaluado diferentes fungicidas en condiciones controladas para conocer la eficacia real de los mismos; c) se ha desarrollado un método indirecto para predecir el nivel de inóculo inicial con la intención de proporcionar un insumo que permita planificar el uso de diferentes fuentes de fungicidas; d) se han realizado evaluaciones de productos químicos en campo para validar diferentes principios activos en condiciones de producción y e) se ha realizado una caracterización biológica y molecular de 60 aislamientos del patógeno obtenidos de diferentes variedades y zonas productoras.

El objetivo del presente resumen, es proporcionar información de los resultados obtenidos en algunos de los estudios mencionados.

2. Materiales y Métodos.

2.1. Susceptibilidad de brotes en mandarina ‘Nova’ y de frutos en mandarinas ‘Nova’ y ‘Murcott’.

Se colectaron brotes de mandarina ‘Nova’ creciendo en invernáculo en los distintos estadios de desarrollo desde b2 a b4 (Garrán et al., 2005). En laboratorio, los brotes fueron acondicionados e inoculados por aspersión (1×10^4 ufc.mL⁻¹) utilizando un aislamiento de Uruguay (ALT2FNQ29). Luego, fueron depositados en cámara húmeda por 48 h, cuando se

procedió a la evaluación de la incidencia en hoja. Se realizaron 10 repeticiones por cada tamaño de brote. Desde el mes de diciembre a cosecha, cada 15 d, se cosecharon en campo frutas de mandarinas 'Nova' y 'Murcott' que fueron artificialmente inoculadas con tres cepas de diferente origen: Uruguay (ALT2FNQ29), España (A051) y EEUU (SH_MIL), apoyando en 4 puntos equidistantes papel de filtro embebido en una suspensión de esporas. Por 72 h la fruta permaneció en cámara húmeda y los resultados fueron evaluados a las 48 h. Se realizaron 5 repeticiones de dos frutas cada una, para cada una de las cepas. Los testigos fueron brotes y frutos sin inocular. Paralelamente, en el mes de diciembre se identificaron frutos asintomáticos en campo que fueron observados cada 15 d hasta cosecha para la detección de lesiones de mancha marrón.

2.2. Control químico en campo

2.2.1. Monitoreo de la enfermedad en brotes asintomáticos y su potencial para definir alternativas de control químico

2.2.1.1. Ajuste del tamaño de la muestra. En la zafra 2013/2014 se seleccionaron dos cuadros de mandarina 'Nova' con alta y baja intensidad de la enfermedad. En cada uno, del 25% de las plantas (distribuidas en forma homogénea en todo el cuadro), se cosecharon cuatro brotes asintomáticos en estado b2. Los mismos se mantuvieron por 48 h en cámara húmeda, cuando se procedió a la evaluación de la incidencia de la enfermedad en hojas.

2.2.1.2. Validación del tamaño de la muestra. A partir de los resultados obtenidos con el ajuste del tamaño de la muestra, en la zafra 2014/2015 fueron seleccionados 6 cuadros en total, 3 con baja y 3 con alta intensidad de la enfermedad. En los mismos se eligieron plantas al azar y se cosecharon de cada una 4 brotes asintomáticos que se mantuvieron y evaluaron como mencionado en el ítem anterior.

2.2.1.3. Procedimiento estadístico. Con los datos obtenidos en la zafra 2013/2014 se estimó el tamaño de la muestra considerando la varianza entre plantas y la varianza de brotes dentro de plantas. El tamaño de la muestra fue seleccionado considerando obtener un error igual o menor al 1% de la media, con un 95% de confianza. Se calculó el tamaño máximo de muestra para un área "grande" (en el sentido en que es un muestreo con población muy grande, casi infinita, con más de 400 árboles/ha). Se utilizó el procedimiento Varcomp del paquete estadístico SAS. El tamaño de muestra obtenido, fue validado en el siguiente año analizando si las varianzas se mantenían homogéneas mediante los test de Levene y el test de Levene modificado por Brown y Forsythe.

2.2.2. Evaluación de fungicidas

Uruguay tiene condiciones ambientales muy favorables para el desarrollo de este patógeno y un amplio período de susceptibilidad, por lo que se requieren numerosas aplicaciones para producir fruta con calidad externa para exportación. El objetivo de este trabajo ha sido buscar la estrategia de control químico más adecuada para nuestras condiciones. Durante las temporadas 2011-2014 se evaluaron distintos esquemas de control y principios activos (cobre, mancozeb, triazoles, iprodione, estrobirulinas). Para ello, se utilizaron cuadros de mandarina Nova/*P. trifoliata* de 15-20 años, con un marco de plantación de 6x3m, con historia de la enfermedad. El diseño experimental fue de bloques completos al azar, con

parcelas de 24-36 plantas, realizándose 3 repeticiones por tratamiento. La aplicación de los productos se realizó con una máquina de picos, siendo el gasto de agua de 3-4 litros por planta. En cada parcela se evaluó incidencia y severidad en brotes y fruta. Los datos se analizaron mediante el procedimiento estadístico Genmod de SAS; el análisis de medias se realizó por Lsmeans.

3. Resultados y Discusión.

3.1 Susceptibilidad de brotes en mandarina 'Nova' y de frutos en mandarinas 'Nova' y 'Murcott'

Tabla 1. Incidencia en hojas de brotes de diferente estadio de desarrollo que fueron artificialmente inoculados con *Alternaria alternata* pv *citri*

Tipo de brote	Incidencia (en porcentaje)	
	48 hs	96 hs
B2	67 A	87 A
B3	13 B	62 AB
B4	15 B	55 BC
B34	12 B	35 C

Letras iguales no difieren significativamente (DMS, $p \leq 95\%$)

Tabla 2. Severidad de mancha marrón de alternaria en frutas de los híbridos 'Nova' y 'Murcot' artificialmente inoculados con los aislamientos ALT2FNQ29 (Uruguay), A051 (España) y SH-MIL-30S (EEUU)

Híbrido	Sensibilidad*
Nova	0,72 a **
Murcott	1,45 b

*Cada dato representa el promedio de 210 observaciones (15 repeticiones por 14 fechas), utilizando la siguiente escala: 0= sin lesiones; 1= con lesiones no coalescentes, 2= lesiones coalescentes superficiales de color marrón claro; 3= lesiones coalescentes hundidas y de color marrón oscuro. **Letras diferentes representan diferencias significativas test Tukey_Kramer ($p \leq 0,05$).

Tabla 3. Agresividad de los aislamientos ALT2FNQ29 (Uruguay), A051 (España) y SH-MIL-30S (EEUU) artificialmente inoculados en frutas de los híbridos 'Nova' y 'Murcott'

Variedad	Aislamiento		
	Alt2FNQ29	A051	CH_MIL
Nova	0,76	1,71	1,89
Murcott	0,25	0,77	1,20
Promedio aislamiento	0,50 a**	1,24 b	1,54 b

*Cada dato representa el promedio de 140 observaciones (10 repeticiones por 14 fechas), utilizando la siguiente escala: 0= sin lesiones; 1= con lesiones no coalescentes, 2= lesiones coalescentes superficiales de color marrón claro; 3= lesiones coalescentes hundidas y de color marrón oscuro.

**Letras diferentes representan diferencias significativas test Tukey_Kramer ($p \leq 0,05$).

La fruta de ambos híbridos fue sensible a la enfermedad desde que se inició el experimento en diciembre (diámetro promedio 25mm) hasta principio de junio (diámetro promedio 66 mm). Hay una relación negativa entre el diámetro de la fruta y la severidad a la enfermedad (valor b_1 de la ecuación, negativo). Sin embargo, los coeficientes de determinación (R^2) demostraron que el tamaño de la fruta explica un porcentaje muy bajo de la severidad observada en 'Murcott' y alto en 'Nova' (para los aislamientos de Uruguay y España, con el 95% de confianza).

3.2. Control químico en campo

3.2.1. Monitoreo de la enfermedad en brotes asintomáticos y su potencial para definir alternativas de control químico.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se asumió que el número de plantas y brotes que se deben de muestrear para tener una estimación confiable de la incidencia de la enfermedad es dependiente de la intensidad de la enfermedad en el cuadro. Con esta hipótesis se estimó que el monitoreo de 20 plantas y 4 brotes por plantas se podía obtener un error menor o igual al 0,9% y 1,34% de la incidencia promedio en cuadros de baja y alta intensidad de la enfermedad, respectivamente, con 95% de confianza. El análisis de la homogeneidad de varianza obtenida en el monitoreo realizado en la zafra 2014/2015 validó el resultado obtenido en ambos casos. Estos resultados están siendo utilizados para validar tratamientos diferenciales en brotación y cuajado de acuerdo a la incidencia de la enfermedad a inicio de zafra.

3.2.2 Evaluación de fungicidas

En general, los esquemas planteados no han logrado más de 60-70% de fruta sana en cuadros de alta incidencia y años predisponentes para la enfermedad. La mayoría de los productos evaluados no son efectivos, se han observado brotes con síntomas de la enfermedad (mediante forzamiento) a la semana y 15 días pos-aplicación. Hay condiciones para el desarrollo del hongo buena parte del año. Se han identificado 2 momentos críticos de control: primavera (octubre-noviembre, según condiciones ambientales del año) y febrero/marzo dependiendo de las lluvias. No obstante, la fruta es susceptible hasta cosecha, por lo que las aplicaciones deben extenderse hasta el otoño, siendo las aplicaciones de febrero y marzo tan importantes como las de primavera, ya que los mayores descensos de fruta sana han ocurrido en ese periodo. Los productos más eficientes han sido: cobre, mancozeb y pyraclostrobin. Los sistémicos (estrobirulinas) aplicados en brotación mejoraron significativamente el daño por *Alternaria* en brotes y lograron mayores porcentajes de fruta sana a cosecha (Fig.1). En sitios de alto inóculo se puede recurrir a 2 aplicaciones (en bloque) tempranas (brotación) de estrobirulinas. La poda y el ajuste en los momentos de aplicación de fitosanitarios (previo a la ocurrencia de lluvias) mejoraron considerablemente los resultados obtenidos en fruta sana.

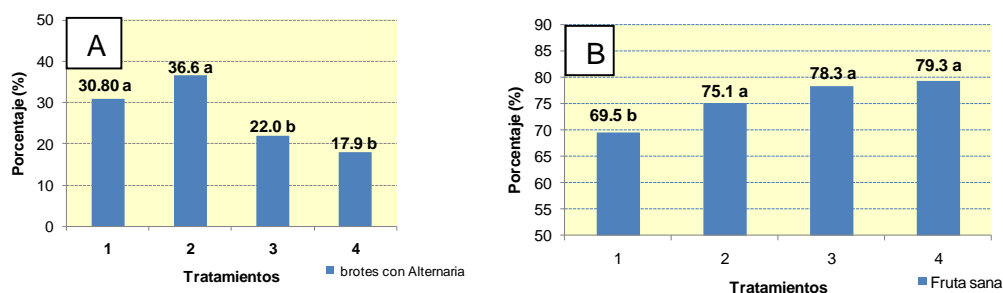


Fig.1. A) Porcentaje de brotes con *Alternaria* en los distintos tratamientos (*). B) Porcentaje de fruta sana al momento de cosecha.

* Tratamiento 1: cobre en brotación B2.

Tratamiento 2: cobre en brotación B1.

Tratamiento 3: estrobirulina en brotación B1.

Tratamiento 4: cobre+estrobirulina en brotación B1.

Conclusiones.

- 1) Los brotes deben ser protegidos durante todo el periodo de desarrollo priorizando los estadios iniciales.
- 2) Los frutos deben ser protegidos por un periodo no menor a 6 meses luego de cuajado
- 3) Es viable conocer el nivel de inóculo inicial en el cuadro mediante la evaluación de 80 brotes asintomáticos retirados en número de 4 de 20 plantas diferentes distribuidas homogéneamente en el cuadro.
- 4) Para disminuir el riesgo de generación de resistencia y realizar un uso racional de fungicidas se recomienda, aplicar los productos sistémicos a inicio de la temporada y continuar con productos cúpricos.
- 5) Las aplicaciones para este patógeno deben ser preventivas, porque el hongo siempre está en campo, el período de incubación de síntomas es de 48-72 h y ningún producto es eficiente luego de la infección.

Bibliografía

Bernal, R. 2009. Control de Sarna y Alternaria en cítricos. SAD 575.

Garrán, S. M.; Anderson, C.; Garín R. 2005 Una Metodología para la realización y registro de observaciones fenológicas en Cítricos. Documento interno. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA; Centro Regional Entre Ríos; Estación Experimental Agropecuaria Concordia. 100 p.

Estado actual de experiencias sobre control de mancha marrón (*Alternaria alternata* pv *citri*) en mandarinas en la EEA Concordia INTA.

Contacto: garran.sergio@inta.gob.ar

Sintomatología:

La mancha marrón de las mandarinas (*Alternaria alternata* pv *citri*) presenta una gran variedad de síntomas, varios de ellos muy similares a otras enfermedades o plagas, algunas cuarentenarias como mancha negra, cancrisis y sarna y hasta puede confundirse con daño por mosca (4, 5, 11). Ello complica las tareas de diagnóstico en los monitoreos a campo y en el empaque. Con el objetivo de esclarecer esta sintomatología y facilitar su diferenciación respecto de enfermedades cuarentenarias, se realizó un seguimiento mensual de la evolución de la sintomatología en un lote de mandarina Nova con infección severa de mancha marrón (4). Los distintos síntomas fueron clasificados como S_i (donde i varía de 1 a 9) según su estado de evolución (3, 4). Entre ellos se destaca el síntoma S_1 por su carácter diagnóstico ya que no fue observado en otras enfermedades (3). En la figura 1 se presenta la evolución del número de síntomas observados desde cuaje a cosecha en los seguimientos realizados y también la evolución mensual de los distintos estadios de síntomas (Figura 2). También se han descripto los distintos estadios observados y sus relaciones (3).

El triángulo de la enfermedad:

El hospedante: La aparición de síntomas en frutos tiene lugar desde el momento de cuaje hasta el de cosecha (3, 4). Incluso se observan síntomas en los pétalos al estado de botón floral. Trabajos realizados por Pérez *et al* (comunicación personal) confirman que los frutos son susceptibles a nuevas infecciones desde cuaje a cosecha. La susceptibilidad de los brotes disminuye marcadamente con el estadio fenológico de los mismos (10). Brotes iniciales (estadio B1 y B2) son más susceptibles que estadios más desarrollados y el tiempo de incubación para la aparición de los síntomas también es más prolongado (7).

El inóculo: El hecho de que se trate de un hongo necrotrófico (capaz de colonizar tejidos muertos) amplía enormemente sus fuentes de supervivencia y multiplicación (6). Desde hace dos años se vienen realizando mediciones semanales del nivel de inóculo en lotes con distinto grado de infección en base a un monitoreo indirecto, basado en la recolección semanal de brotes iniciales (B1 + B2) y frutos puestos en incubación en cámara húmeda para el posterior recuento de síntomas nuevos a las 48 hs y determinación del porcentaje de hojas, tallitos y frutos con síntomas. La bibliografía menciona que en la mayoría de las regiones donde se han realizado estudios, el inóculo está presente durante todo el período de crecimiento de brotes y frutos (6, 12). Los datos obtenidos confirman este comportamiento y aunque con variaciones, se detectó inóculo desde inicios de brotación (a principios de primavera) hasta el momento de cosecha de los frutos. Se observaron diferencias en los niveles entre lotes tratados y lotes testigo así como en lotes con alta y muy baja incidencia de *Alternaria* (Figuras 3 y 4). Estos resultados alientan la posibilidad de utilizar este monitoreo indirecto como herramienta para la toma de decisiones de manejo.

El ambiente: Estudios previos realizados en Florida. EEUU por Timmer *et al*, mencionan tres variables meteorológicas claves para la ocurrencia de las infecciones: temperaturas medias diarias entre 20 y 28 °C, horas de mojado foliar diario superior a 10 h y precipitaciones diarias que superen 2,5 mm (6). En base a las distintas combinaciones posibles entre estas tres variables establecieron un sistema de puntajes diarios que varía de 0 (sin condiciones para la infección) a 11 (máximas condiciones para la infección) (12). Este puntaje, denominado ALTER RATER, en base a un acumulado diario, es utilizado como sistema de alarma para decidir los momentos de realizar las aplicaciones (12). Esta fórmula del ALTER RATER ha sido implementada para la región citrícola del NE de Entre Ríos y SE de Corrientes en el sistema FruTIC (13). Experiencias realizadas para modificar el ambiente de las plantas han demostrado que la podas de aclareo y limpieza mejoran la efectividad obtenida con el control químico. Similares resultados se obtuvieron en otras regiones (2).

De acuerdo a lo mencionado en párrafos previos, una respuesta clave para explicar las dificultades que enfrenta el logro de un alto nivel de control reside en que, a diferencia de otras enfermedades, prácticamente se dan las condiciones necesarias para la ocurrencia de infecciones durante todo el período de crecimiento de brotes y frutos. A ello se suma que la eficacia de los fungicidas registrados no alcanza el mismo nivel de control que el conseguido con otras enfermedades (8,9).

Propuesta de control: Al cabo de siete años de realización de experiencias de control, ninguno de los tratamientos ensayados ha alcanzado los niveles de control requeridos para los mercados de exportación, aunque las diferencias con las parcelas testigos han resultado siempre significativas (8,9). Ante la necesidad de brindar alguna alternativa de manejo para esta enfermedad se plantea la siguiente propuesta en base a las experiencias de control realizadas y en la disponibilidad del sistema FruTIC (13), una plataforma informática que brinda un monitoreo actualizado en tiempo operativo acerca de la evolución de las condiciones ambientales (ALTER RATER y pronósticos a tres días), fenológicas del cultivo (brotaciones, floración, “purga” y crecimiento de frutos) y también indirectamente, del patógeno (ALTER RATER) denominada **Manejo FruTIC** (9) que contempla:

1-Medida cultural: Luego de la cosecha y antes de la brotación de primavera la poda de “aclareo” y limpieza mejora la efectividad del control químico (2,9).

2-Protección de la brotación de primavera (estrobilurinas). Con el objetivo y proteger la primera brotación. FruTIC: Curvas de brotación.

3- A partir de esa primera aplicación, seguir con la evolución de la fenología de brotes y botones florales, el sistema ALTER RATER y los pronósticos de lluvia. En caso de que se alcancen valores próximos a 100 y con pronóstico de lluvias, realizar una aplicación a base de cúpricos.

4-Protección de los frutitos al momento de al momento de caída de pétalos (F6) – cuaje (F7) (estrobilurinas). Con el objetivo de reducir la caída de frutitos por *Alternaria*. FruTIC: Curvas de floración y cuaje.

5-Continuar desde cuaje a cosecha con una protección permanente de los tejidos susceptibles (brotes B1 + B2 y frutitos). Fungicidas utilizados: cúpricos y mancozeb. Cuyos criterios para definir los momentos de aplicación serían la aparición de nuevas brotaciones (diciembre – enero – febrero – marzo, la evolución del puntaje ALTER RATER y utilización de los pronósticos de lluvia. En caso de la aparición de nuevas brotaciones, se prioriza la fenología para realizar las aplicaciones. De no ocurrir ellas, se tiene en cuenta la acumulación del puntaje del ALTER RATER, tomando 100 como valor para decidir la aplicación. Pero en el caso de esperarse una secuencia de varios días con pronósticos de lluvia, se adelanta la aplicación aunque el ALTER RATER no haya alcanzado el valor de 100. Los de fungicidas utilizados son a base de cobre o mancozeb, decidiendo optar por uno y otro en función del riesgo de “marcado” por cobre de los frutos.

En experiencias de control realizadas en la campaña 2008/09 el agregado de fosfito de potasio a las aplicaciones de estrobilurina no mejoró la eficacia del control (7-8). Sin embargo, Agostini *et al* (1) reportan que la incorporación de fosfito al 3 ‰, al cabo de varias campañas, disminuyó la incidencia de mancha marrón en frutos y que aplicaciones de potasio y calcio mejoraron los porcentajes de calidad exportable.

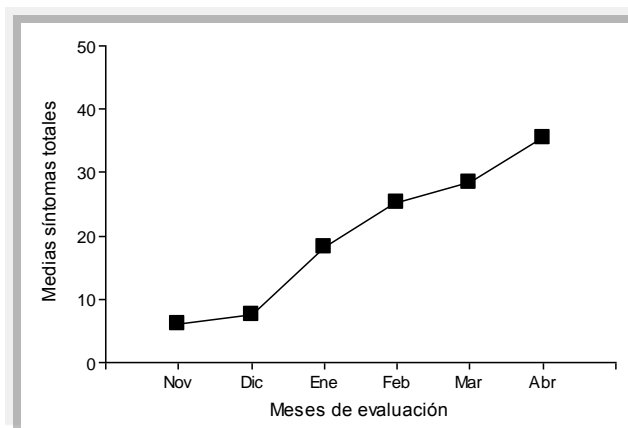


Figura 1: Evolución mensual de la severidad (número medio de síntomas por fruto) de mancha marrón en plantas de mandarina Nova sin tratamiento químico (4,7).

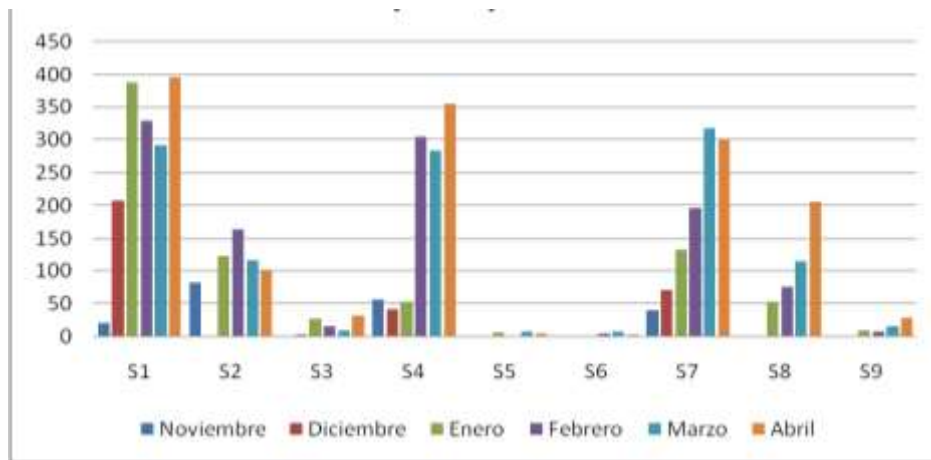


Figura 2: Evolución mensual de las frecuencias de los distintos estadios de síntomas de mancha marrón en plantas sin tratar (4,7).

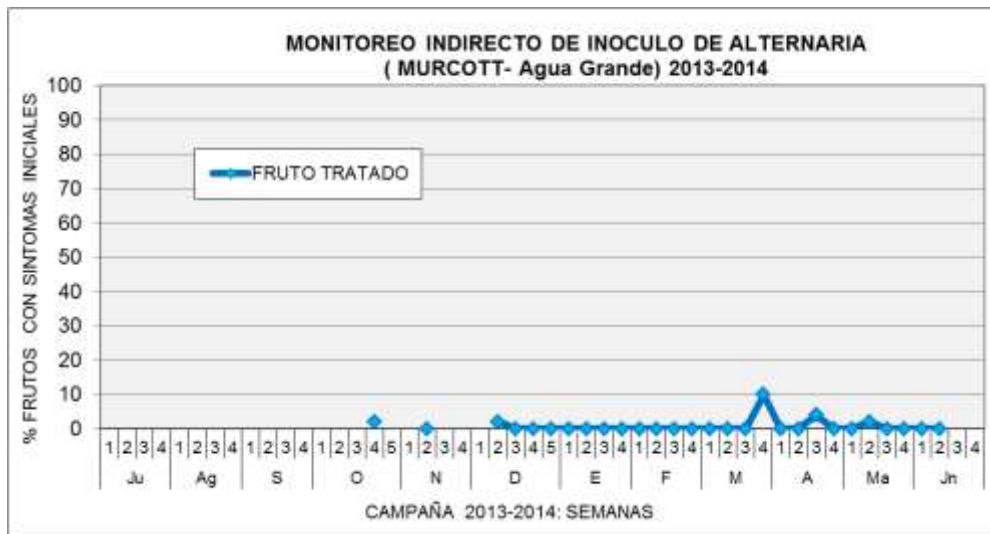


Figura 3. Evolución del porcentaje de frutos con síntomas iniciales (medida indirecta del nivel de inoculo) en sector tratado y testigo, lote de mandarina Nova con alta incidencia de mancha marrón durante la campaña 2013-2014.

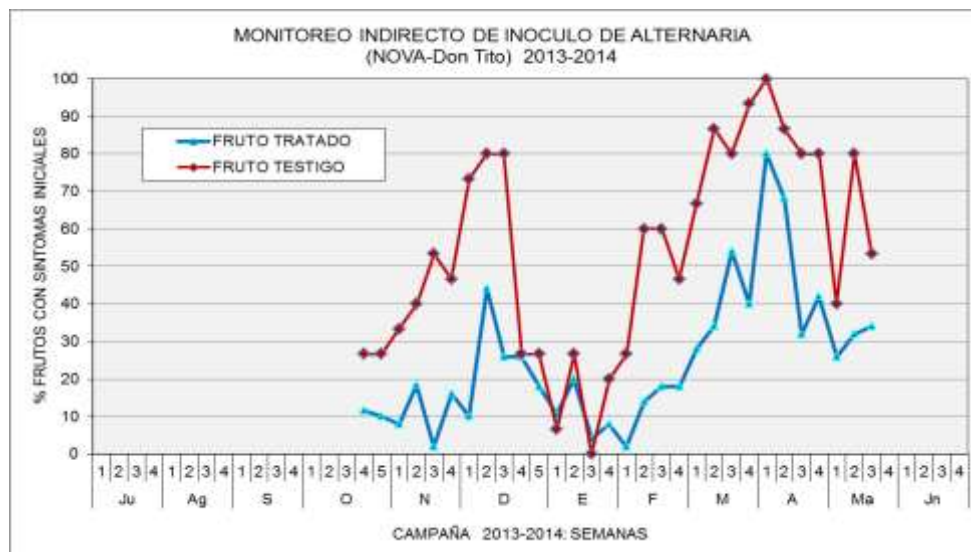


Figura 4. Evolución del porcentaje de frutos con síntomas iniciales (medida indirecta del nivel de inoculo) lote de mandarina Murcott con baja incidencia de mancha marrón durante la campaña 2013-2014.

Bibliografía:

1. Agostini, J.P., 2015. Control de mancha negra y mancha marrón en Misiones. VIII Congreso Argentino de Citricultura. Libro de Resúmenes, p. 23.
2. Bella, P., Russo, M., Tomasello, M., Catara, A., Catara, V., and R. La Rosa. 2012. Integrated approaches to minimize *Alternaria* Brown Spot of citrus in Italy. XII International Citrus Congress, Valencia, España, Book of Abstracts, S15P08, p 262.
3. Burdyn, L., Garrán, S. y M. Avanza. 2012. Evolution of symptoms caused by *Alternaria alternata* on “Nova” mandarin fruits and its schematic sequence. XII International Citrus Congress, Valencia, España, Book of Abstracts, S15P11, p 263.
4. Burdyn, K., Garrán, S. y M Avanza. 2010. Evolución de los síntomas causados por *Alternaria alternata* en frutos de mandarina Nova. p.70, 0024-PV . Libro de Resúmenes. VI Congreso Argentino de Citricultura. Tucumán, R. Argentina.
5. Canteros, B. I. 2009. Guía para la Identificación y Manejo de las Enfermedades Fúngicas y Bacterianas en Citrus. Eds. CFI-INTA. ISBN 978-987-05-6059-3. 89 p.
6. Dewdney, M.M., and L.W. Timmer. 2011. *Alternaria* Brown Spot. 2011 Florida Citrus Pest Management Guide. Publication #PP-147. (<http://edis.ifas.ufl.edu/cg021>).
7. Garrán, S. M., Burdyn, L., Pérez, E., Flores, P., y L. Aguirre. 2011. Informe de medio término del Proyecto PNFRU 052841. 22 p.
8. Garrán, S., Burdyn, L., Mousqués, J., Kukczycki, C., Sosa, A., y R. Mika. 2013. Control de la mancha marrón de las mandarinas (*Alternaria alternata*) en Concordia, Entre Ríos. VII Congreso Argentino de Citricultura. Puerto Iguazú, Misiones. Libro de resúmenes. S4-30,
9. Garrán, S., Mousqués, J., Burdyn, L., Sosa, A., Mika, R., y C. Kulczycki. Manejo de lotes afectados por mancha marrón de las mandarinas (*Alternaria alternata*) en la región citrícola del río Uruguay. Área Frutales EEA Concordia del INTA. Mayo de 2013.
10. Pérez, E., Blanco, O. y P Alves. 2014. Evaluación “in vitro” de fungicidas sistémicos para el control de mancha marrón de *Alternaria* de mandarina Nova. XXXV Jornada Citrícola Nacional. Concordia. Entre Ríos. Argentina ISSN 1851-8095. Cuarta edición .287
11. SENASA. 2001. Programa de Certificación de Fruta Fresca Cítrica de la Región NEA para exportación a la Unión Europea. Resolución 78/2001 <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1078&io=4722>
12. Timmer, L. W., Darhower, H. and Alka Bhatia. 2003. The ALTER-RATER, A New Weather-Based Model for Timing Fungicide Sprays for *Alternaria* Control. Publication # PP-175. U.S. Department of Agriculture, Cooperative Extension Service, University of Florida, IFAS, UF. (<http://edis.ifas.ufl.edu/ch183>).
13. Stablum, A., Franco, S., Ibarrola, S., Milera, S., Garrán, S., Mika, R., y S. Marnetto. 2010. FruTIC: Sistema interactivo que permite el manejo integrado del cultivo cítrico. 39JAIIO – Congreso Argentino de Informática 2010, p. 696 – 710.