



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria  
URUGUAY

# Jornada de Divulgación Manejo sanitario en tomate y morrón bajo cubierta



Resultados experimentales 2015 - 2017

Programa de Investigación en Producción Hortícola  
Serie Actividades de Difusión N° 778  
12 de octubre de 2017

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

## **Integración de la Junta Directiva**

**D.M.T.V., Ph.D. José Luis Repetto** - Presidente

**Ing. Agr., M.Sc., Ph.D. Álvaro Roel** - Vicepresidente



**Ing. Agr., M.Sc. Diego Payssé Salgado**

**Ing. Agr. Jorge Peñaricano**



**Ing. Agr. Pablo Gorriti**

**Ing. Agr. Alberto Bozzo**



## INDICE

**P. 3** Evaluación de productos de *Bacillus Subtilis* inductores de resistencia y otros aplicados a follaje para control del cancro bacteriano del tomate. Temporada 2015 – 2016.

Diego Maeso, Alfredo Fernández, Wilma Walasek

**P. 15** Eficiencia de productos aplicados en riego en el control de cancro bacteriano de tomate (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*).

Diego Maeso, Wilma Walasek, Alfredo Fernández.

**P. 23** Evaluación de productos inductores de resistencia en el manejo de médula hueca del tomate (*Pseudomonas* spp.). Temporada 2015-2016.

Diego Maeso, Alfredo Fernández, Wilma Walasek

**P. 33** Control de la mancha bacteriana del tomate (*Xanthomonas* spp.) en cultivo a campo para industria mediante aplicaciones foliares. 2015-2016.

Diego Maeso, Alfredo Fernández, Wilma Walasek

**P. 43** Empleo del receptor EFR en tomate para el control de bacterias patógenas del tomate: actualización de resultados.

Elsa Perdomo-Ferrando, Sara Murchio, Wilma Walasek, Claudia Schwartzman, Diego Maeso, Marco Dalla Rizza

**P. 53** Tecnologías alternativas para el manejo de la mosca blanca en tomate bajo invernáculo.

M.L. Umpierrez, M.E. Amorós, C. Rossini y J. Paullier.

**P. 55** Evaluación de la aplicación de aceites esenciales para el control de mosca blanca en tomate.

M.L. Umpierrez, M.E. Amorós, C. Rossini y J. Paullier.

**P. 71.** Estudio de compatibilidad in vitro de los aceites esenciales con LECAFOL® Amorós, M.E.; Umpierrez, M.L.; Paullier, J.; Rossini, C.

**P. 75** Alternativas para el control de oidio en cultivos de morrón protegidos que implementan el control biológico de plagas.

Leticia Rubio, José Buenahora.



# EVALUACIÓN DE PRODUCTOS A BASE DE *BACILLUS SUBTILIS*, INDUCTORES DE RESISTENCIA Y OTROS APLICADOS A FOLLAJE PARA EL CONTROL DEL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE

## TEMPORADA 2015-2016

Diego Maeso, Alfredo Fernández, Wilma Walasek  
Programa Producción Hortícola. Sección Protección Vegetal. INIA Las Brujas

### Introducción

El cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) es una enfermedad muy importante del cultivo en Uruguay tanto en invernáculo como al aire libre. Hasta el momento no se ha encontrado un método de control eficiente y el mismo se basa en el manejo integrado de numerosas medidas culturales y la aplicación foliar de productos, principalmente a base de cobre.

Desde hace algunos años el Programa Nacional de Producción Hortícola de INIA ha realizado trabajos experimentales tendientes a estudiar aspectos de esta enfermedad y medidas que contribuyan a su manejo. Entre ellos se incluye la evaluación de productos alternativos a los cúpricos como lo son los inductores de resistencia, biológicos y otros con diferente modo de acción.

Se han reportado los efectos beneficiosos derivados de la aplicación de productos a base de *Bacillus subtilis* en el control de enfermedades. Los mismos se explican a través de dos vías: 1) la inducción de resistencia sistémica (ISR, "induced systemic resistance", Ryu et al. 2004, Ongena et al. 2007) y 2) la producción de antibióticos y agentes antimicrobianos (Hammami et al. 2009). Algunos productos de este tipo son comercializados internacionalmente (Serenade, Kodiak, etc.) principalmente para el control de enfermedades a hongos (Lanna et al. 2010, Cawoy et al. 2011) si bien también se han estudiado los efectos de este agente en la prevención y disminución de daños por cancro bacteriano en tomate (Flores 2004, Rojas 2014, Jung et al. 2014).

En experimentos realizados en 2014-2015 se observó que la aplicación foliar de Biorend Cobre, Bion, Nacillus, Baktillis y productos a base de cobre disminuyeron la severidad de la enfermedad frente a un testigo sin tratar. A continuación se presentan los resultados de estos experimentos correspondientes a la temporada 2015-2016.

### Objetivos

Evaluar tratamientos foliares de productos alternativos a cúpricos para el control del cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*).

## Materiales y Métodos

Ubicación: Campo experimental de INIA Las Brujas. Rincón del Colorado. Departamento de Canelones. Sector con historia de reiterados ataques de la enfermedad (figura 1).



Figura 1. Vista panorámica del ensayo.

Forma de aplicación: Foliar mediante pulverizadora de mochila con CO<sub>2</sub> (R&D sprayers, EEUU). Gasto por hectárea varió de 600 a 1500 l/há durante la temporada.

Cultivo: Tomate de mesa, variedad Cetia. Distancia de plantación 0,6 x 0,50 m en cabana doble fila. Fecha de siembra 8/10/2015, trasplante 5/11/2015.

Diseño experimental: Bloques al azar con cuatro repeticiones. Cada parcela constaba de una cabana de dos filas de ocho plantas cada una.

Análisis estadístico: Se realizó un análisis de variancia y posterior separación de medias mediante la prueba Duncan. Para ello se utilizó el paquete estadístico Infostat de uso libre ([www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)).

### Tratamientos:

En el cuadro 1 se muestran los detalles de los tratamientos evaluados, dosis, comienzo e intervalo entre aplicaciones.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el ensayo.

Tratamiento	Principio activo	Dosis/100 l	Intervalo
1. Nacillus	<i>Bacillus subtilis</i> y otros	Preventiva 300 g	Cada 7-10 días
2. Nacillus	<i>Bacillus subtilis</i> y otros	Pos inoculación 500 g	Cada 7-10 días luego de síntomas
3. Baktillis	<i>Bacillus subtilis</i>	Preventiva 300 g	Cada 7-10 días
4. Baktillis	<i>Bacillus subtilis</i>	Pos inoculación 500 g	Cada 7-10 días luego de síntomas
5. HidroCup 77%	Hidróxido de cobre	300 g	Cada 7 días
6. Biorend cobre	Quitosano y Sulfato de Cobre Penta hidratado + base quelatante orgánica	150 cc	Cada 7-10 días
7. Bion	Acibenzolar S methyl	5 g	Cada 7-10 días
8. Bio D Zn Mn	Quelato a base de hidrácidos de ácido cítrico.	Preventiva 500 cc/100 l	Cada 7-10 días
9. Testigo sin tratar			

Las aplicaciones preventivas comenzaron el 1/12/2015, mientras que las aplicaciones pos-inoculación comenzaron el 12/1/2015. Los tratamientos preventivos (1, 3, 5, 6 y 7) recibieron 9 aplicaciones mientras que los pos-inoculación (2 y 4), 5. La última aplicación de todos los tratamientos fue realizada el día 9/2/15.

### Inoculación:

A pesar que el ensayo fue plantado en un sector de campo con suelo infectado con el patógeno para asegurarse la ocurrencia de la enfermedad se inocularon cuatro plantas en el comienzo de cada parcela el 21/12/2015 (dos por fila). Se utilizó una suspensión de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml y se realizó una herida cortando una hoja completamente desarrollada con una tijera embebida en la solución bacteriana (figura 3).



Figura 2. Inoculación. Izquierda corte con tijeras embebidas en solución bacteriana. Derecha plantas inoculadas identificadas en el comienzo de cada parcela.

Parámetros evaluados:

### **Evolución de la enfermedad**

A partir de la aparición de la enfermedad (comienzos de enero 2016) se evaluó semanalmente el porcentaje de plantas enfermas por parcela (incidencia). La severidad fue evaluada asignándole a cada planta un grado de una escala 0-5, donde 0 = plantas sin síntomas, 1= marchitamiento incipiente de las hojas inferiores, 2= marchitamiento evidente en hojas inferiores, algunos síntomas en hojas medias, 3= toda la planta con marchitamiento moderado, 4= toda la planta con marchitamiento severo y 5= planta muerta por la enfermedad. Los grados asignados se promediaron por parcela y se calculó el porcentaje frente al grado máximo. Adicionalmente con todas las evaluaciones tanto de incidencia como de severidad se calculó el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE). Las plantas evaluadas fueron aquellas no inoculadas.

A fin de ciclo se cortaron longitudinalmente los tallos de seis plantas por parcela para examinar la presencia de desórdenes (coloración anormal de vasos y/o médula, médula esponjosa, etc.), calculándose el porcentaje de plantas afectadas.

Todos los valores en porcentaje fueron transformados por la fórmula  $\arcsen \sqrt{\%}$  previo a su análisis estadístico.

## Resultados

### Incidencia

En el cuadro 2 se presentan los resultados de incidencia y de área debajo de la curva de progreso de la enfermedad al 26/2/2016 (mostraron diferencias estadísticamente significativas) y en la figura 4 la evolución de la incidencia de la enfermedad (porcentaje de plantas que presentaban algún síntoma de la enfermedad frente al total de plantas evaluadas).

Cuadro 2. Incidencia al 25/1/2016 y área debajo de la curva de progreso de cancro bacteriano 2016 (ADCPE).

Tratamiento	25/01 35 dpi <sup>1</sup>	ADCPE hasta 26/2 67 dpi
1. Nacillus 300 g/100 l	100 c <sup>2</sup>	2957 bc
2. Nacillus 500 g/100 l	92 bc	2898 bc
3. Baktillis 300 g/100 l	94 bc	2849 abc
4. Baktillis 500 g/100l	98 bc	3064 c
5. HidroCup 77% 300 g/100 l	61 a	2336 a
6. Biorend cobre 150 cc/100 l	83 ab	2664 abc
7. Bion 5 g/100 l	86 bc	2509 ab
8. Bio D Zn Mn 500 cc/100 l	86 bc	2802 abc
9. Testigo sin tratar	100 c	2975 bc

<sup>1</sup> dpi: días pos inoculación

<sup>2</sup> Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples

Los primeros síntomas comenzaron a observarse el 5/1 (15 días pos inoculación). La menor incidencia de la enfermedad se observó durante toda la temporada en el tratamiento a base de HidroCup encontrándose diferencias estadísticamente significativas con el resto de los tratamientos (cuadro 2). Considerando la evolución de la enfermedad hasta 67 días después de la inoculación los tratamientos que mostraron menores valores fueron HidroCup, Bion, Biorend Cobre, Baktillis preventivo y Bio D. Los tratamientos con menor incidencia de la enfermedad considerando el ADCPE calculada para toda la temporada fueron HidroCup seguido por Bion, Biorend cobre, Bio D y Baktillis (300 g/100 l).

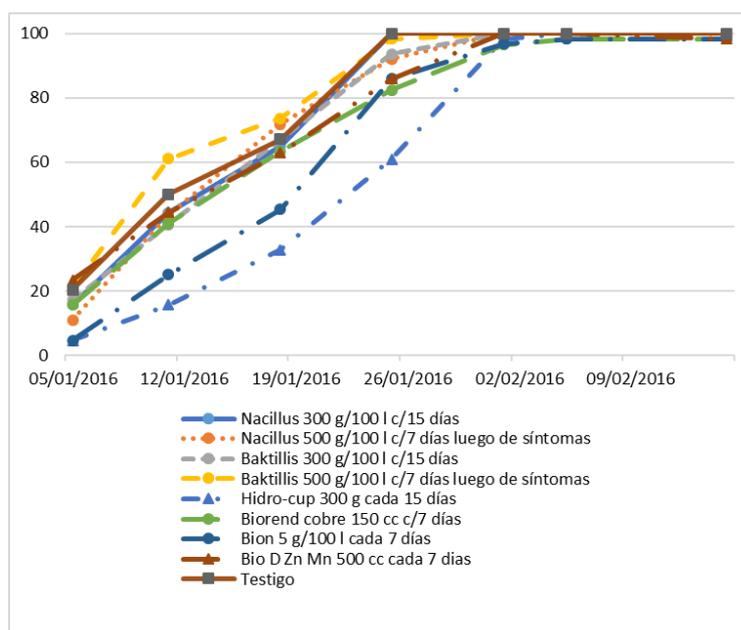


Figura 4. Evolución de la incidencia (porcentaje de plantas enfermas) de cancro bacteriano en los distintos tratamientos.

Severidad

En el cuadro 3 y la figura 5 se muestran los resultados de las evaluaciones de severidad realizadas (intensidad de la enfermedad según una escala 0-5).

Cuadro 3. Resultados de las evaluaciones de severidad de cancro bacteriano (según escala 0-5).

Tratamiento	25/01	01/02	15/02	ADCPE total
1. Nacillus 300 g/100 l	1,9 bc <sup>1</sup>	2,7 bc	3,7 abc	1590 bc
2. Nacillus 500 g/100 l	1,9 bc	2,8 bc	4,0 bc	1591 bc
3. Baktillis 300 g/100 l	1,8 bc	2,6 bc	3,9 bc	1560 bc
4. Baktillis 500 g/100	2,2 c	3,1 c	4,1 bc	1746 c
5. HidroCup 77% 300 g/100 l	0,7 a	1,9 a	3,2 a	1128 a
6. Biorend cobre 150 cc/100 l	1,5 bc	2,4 ab	3,8 abc	1463 bc
7. Bion 5 g/100 l	1,2 ab	2,4 ab	3,6 ab	1308 ab
8. Bio D 500 cc/100 l	1,7 bc	2,8 bc	3,9 bc	1584 bc
9. Testigo sin tratar	1,9 bc	2,6 b	4,0 bc	1544 bc

<sup>1</sup> Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples.

Los menores valores de severidad de la enfermedad fueron presentados por los tratamientos a base de Hidro Cup y Bion.

Figura 5. Evolución de la severidad (0-5) de cancro bacteriano.

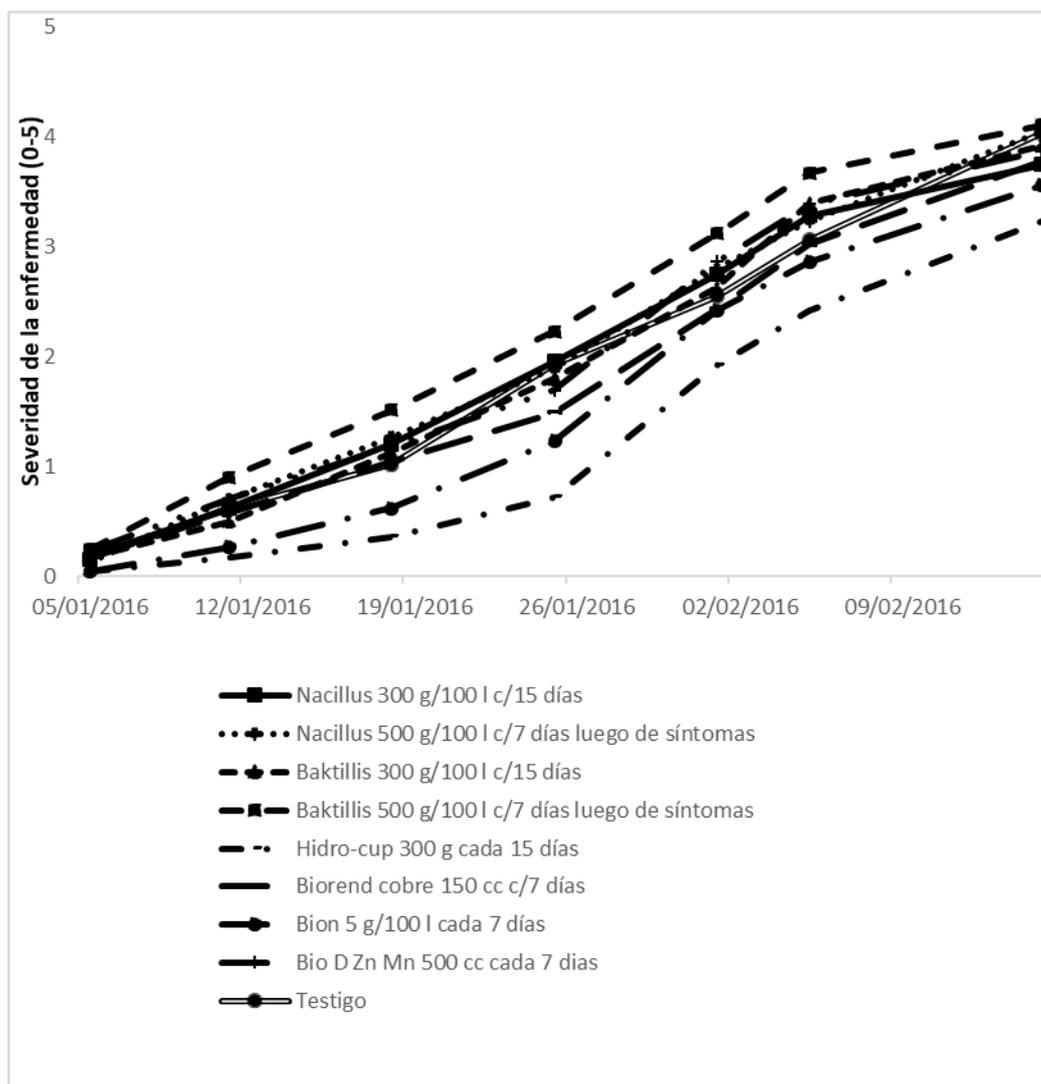




Figura 6. Síntomas en algunas parcelas al 1/2/2016. Arriba de izquierda a derecha: Testigo sin tratar, Hidro Cup, Bion. Debajo de izquierda a derecha: Bio D, Baktillis 300 g/100 l y 500 g/100 l.

### Estado del sistema vascular

En el cuadro 4 se muestran los resultados del análisis de los vasos de las cuatro plantas centrales de cada parcela. En general estos resultados son consistentes con aquellos de incidencia y severidad de la enfermedad.

Cuadro 4. Porcentaje de plantas que presentaban algún síntoma en el sistema vascular internamente.

Tratamiento	Porcentaje de plantas con síntomas internos
1. Nacillus 300 g/100 l	42 NS
2. Nacillus 500 g/100 l	38
3. Baktillis 300 g/100 l	34
4. Baktillis 500 g/100	45
5. HidroCup 77% 300 g/100 l	45
6. Biorend cobre 150 cc/100 l	48
7. Bion 5 g/100 l	25
8. Bio D 500 cc/100 l	34
9. Testigo sin tratar	42

<sup>NS</sup> no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

## Discusión

En este experimento en cultivo al aire libre se observaron diferencias en el control de ésta enfermedad entre los tratamientos evaluados. Los mejores resultados en incidencia, severidad y desórdenes en sistema vascular y médula fueron exhibidos por los tratamientos a base de HidroCup y Bion. Esto también fue encontrado en experimentos previos. Hasta el momento, los productos a base de cobre constituyen la principal herramienta de control utilizada por los productores, destacándose por sus propiedades aquellos formulados con hidróxido de cobre. Sin embargo, el uso reiterado de cúpricos puede generar fitotoxicidad derivada de su acumulación en suelo y la selección de cepas con resistencia a este producto. Por el momento esto no ha sido comprobado en nuestro país, pero como medida preventiva es conveniente encontrar herramientas alternativas.

En ese sentido los productos inductores de resistencia como el acibenzolar S methyl (Bion), quitosano (Biorend), o aquellos formulados a base de cepas de *Bacillus subtilis*, que presentaron buen desempeño en éste y en experimentos anteriores, aparecen como medidas sustitutivas o complementarias que permitirán al menos disminuir la cantidad de cobre aplicado por temporada.

## Conclusiones

- 1) La evolución del ataque de cancro bacteriano en este experimento fue rápida llegándose a afectar a casi el 100% de las plantas al mes de la inoculación en la mayoría de los tratamientos y superando el nivel 3 (marchitamiento moderado) a los 42 días de inoculación.
- 2) El mejor control de la enfermedad evaluado como incidencia y severidad se observó en los tratamientos a base de HidroCup y Bion.

## Bibliografía

CAWOY, H., BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. 2011. Bacillus-Based Biological Control of Plant Diseases. In: Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management . Ed. Margarita Stoytcheva. Rijeka, Croacia. p 273-302.

FLORES, F. 2004. Evaluación in vitro del control de Bacillus sp. sobre Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. Memoria de Título. Universidad de Talca, 36p.

HAMMAMI, I.; RHOUMA, A.; JAOUADI, B.; REBAI, A.; NESME, X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated Bacillus subtilis strain 14B for biocontrol of Agrobacterium spp. strains. Letters in Applied Microbiology, v.48, p.253-260, 2009.

JUNG, W. J.; MABOOD, F.; SOULEIMANOV, A.; WHYTE, L.G.; NIEDERBERGER, T.D.; SMITH, D.L. Antibacterial activity of antagonistic bacterium Bacillus subtilis DJM-51 against phytopathogenic Clavibacter michiganense subsp. michiganense ATCC 7429 in vitro. Microbial Pathogenesis 77 (2014) 13-16.

LANNA, R.; MONTEIRO, H.; SILVA, R. Controle biológico mediado por Bacillus subtilis Revista Tropica - Ciências Agrarias e Biológicas V. 4, N. 2, p. 12-20, 2010.

MAESO, D., FERNÁNDEZ, A., WALASEK, W. 2015. Evaluación de productos a base de Bacillus subtilis, inductores de resistencia y otros aplicados a follaje para el control del cancro bacteriano del tomate. Temporada 2014-2015. Resultados experimentales en sanidad de tomate y morrón. INIA Serie de actividades de difusión 756, p 44-61.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.-L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of Bacillus subtilis as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environmental Microbiology, v.9, p.1084-1090, 2007.

ROJAS, L. 2014. Control biológico del cáncer bacteriano Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis con dos cepas de Bacillus subtilis en tomate Solanum lycopersicum Mill.

Variedad cherry y saladette in situ. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México. Tesis. 74 p.

RYU, C.M.; FARAG, M.A.; HU, C.-H.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W.; PARE, P.W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v.134, p.1017-1026, 2004.



## **EFICIENCIA DE PRODUCTOS APLICADOS EN RIEGO EN EL CONTROL DE CANCRO BACTERIANO DE TOMATE (*CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*)**

Maeso, D.C.<sup>1</sup>; Walasek, W. <sup>1</sup>; Fernández, A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Las Brujas. Ruta 48 km 10. Rincón del Colorado. Canelones. dmaeso@inia.org.uy

### **Resumen**

El cancro bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) produce importantes pérdidas en Uruguay. Hasta el momento no existen métodos efectivos de control. El objetivo de este trabajo fue conocer la efectividad de compuestos aplicados en riego en el control de Cmm en cultivo bajo cubierta plástica (macrotúneles). Se compararon: testigos sin inocular e inoculado, y riego con Nacillus (*Bacillus subtilis*), Baktillis (*B. subtilis*), EM (microorganismos efectivos), Biorend (quitosano), sulfato de cobre y Bio D (hidrácido de ácido cítrico). Las plantas fueron inoculadas al trasplante mediante corte de raíces e inmersión en 5 ml de una solución de Cmm 10-8 UFC/ml de agua estéril. Se llevaron a cabo dos experimentos (diciembre 2016-febrero 2016 y febrero-abril 2016). Se realizaron 3 aplicaciones semanales pre inoculación y 3 pos inoculación (experimento 1) y dos aplicaciones pre-inoculación y 3 pos inoculación (experimento 2). Se usó un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones, con diez plantas por parcela (en macetas de 20 l). Se evaluó el porcentaje de plantas enfermas y la severidad de la enfermedad a partir de 10 días pos inoculación (dpi). A los 32 y 39 dpi se registró el estado de vasos y médula en corte longitudinal de tallos. En el experimento 1 a los 20 dpi Nacillus y Biorend presentaron los menores porcentajes de plantas enfermas. En el experimento 2, Bio D mostró el menor porcentaje de plantas enfermas, menor intensidad de síntomas y el inicio de éstos fue retardado, y presentó el menor porcentaje de síntomas internos en secciones de tallos y menor intensidad de los mismos. DAS-ELISA confirmó la infección en todas las plantas salvo en las no inoculadas. Los resultados de estos experimentos confirman los observados en cámara e invernáculo por lo que se puede afirmar que la aplicación en riego de algunos de los productos evaluados contribuirá al manejo integrado de esta enfermedad.

### **Introducción**

El cancro bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) produce importantes pérdidas en Uruguay. Luego de su introducción a un cultivo a partir de semilla infectada esta enfermedad se disemina rápidamente mediante herramientas a través de labores (desbrote, deshoje, etc.) y agua de riego provocando en poco tiempo pérdidas totales. Sumado a ello se ha demostrado su capacidad de permanencia, además de en la semilla, en suelo, restos vegetales y materiales utilizados en el cultivo (rafía, tutores, etc.). Se han realizado múltiples trabajos de investigación en INIA Las Brujas sobre aspectos prácticos de esta enfermedad vinculados a su manejo integrado, pero ninguno de ellos

individualmente ha sido efectivos para su control. Por esa razón el manejo deberá estar basado en el uso de múltiples medidas de prevención desde la desinfección de semilla, equipos, herramientas, agua de riego y la aplicación de productos ya sea foliar o mediante riego. En trabajos de investigación previos se ha encontrado una relativa eficacia en el manejo de esta enfermedad de productos a base de cobre y sustancias inductoras de resistencia. En este trabajo se buscó conocer la eficiencia en el manejo de cancro bacteriano en cultivos bajo cubierta plástica de productos formulados a base de *Bacillus subtilis* y otros productos inductores de resistencia aplicados en riego que han mostrado buen desempeño en trabajos previos realizados condiciones controladas.

## **Materiales y métodos**

Material vegetal: Tomate cultivar Ceta

Siembra en almácigas: 18/12/2015 y 1/2/2016.

Trasplante a bolsas de 20 l capacidad: 22/1/2016 y 25/2/2016.

Inoculación: Cepa LB17 de Cmm de la colección de INIA LB. Corte de raíces a trasplante e inmersión por 30" en 5 ml de suspensión de Cmm 1x10<sup>8</sup>UFC/ml agua estéril. Las plantas fueron cubiertas con bolsas plásticas individualmente por las 24 horas posteriores a la inoculación.

Aplicaciones: mediante riego en almácigas en 10 cc de solución/planta y 50 cc de solución/planta luego del trasplante. Experimento 1: 5/1, 12/1 y 19/1 (pre-inoculación), 27/1 y 3/2 (posinoculación). Experimento 2: 19/2 y 24/2 (pre-inoculación), 2/3, 9/3 y 16/3 (posinoculación).

Tratamientos:

Testigo sin inocular

Testigo inoculado sin tratar

Nacillus (*Bacillus subtilis*) 10 g/l

Baktillis (*B. subtilis*) 10 cc/l

EM (microorganismos efectivos) 0,8 cc/planta: 80 ml/l

Biorend (quitosano), 2% 20 ml/l

Sulfato de cobre 0,1 g/l

Bio D (hidrácido de ácido cítrico, Zn, Mn) 0,2 cc/planta: 20 ml/l

Bion (Acibenzolar S methyl) 0,5 mg/l. Solo en el experimento 2.

Diseño experimental: En ambos experimentos se usó un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones cada una de ellas correspondió a un macrotúnel de 12 m x 6 m. Las parcelas estaban compuestas de diez plantas cada una. Los datos en porcentaje fueron transformados por arcsenv% previo a su análisis.

Evaluaciones:

Evolución del número de plantas enfermas. Se registró el porcentaje de plantas con síntomas de la enfermedad (ambos experimentos).

Evolución de la severidad de síntomas según una escala 0-3 (0= sin síntomas, 1=síntomas incipientes, 2= síntomas moderados y 3=síntomas severos).

Estado de vasos y médula en corte longitudinal de tallos a los 67 y 63 dpi. Se registró el porcentaje de plantas con secciones que presentaban amarronamiento de médula y/o tejido vascular y la intensidad del mismo (0-3, siendo 0 sin síntomas y 3 máxima intensidad).

Todas las plantas que sobrevivieron al fin de los experimentos fueron analizadas por la prueba DAS ELISA al fin de verificar la infección con Cmm (reactivos AGDIA Inc. Elkhart, IN, EEUU).



Figura 1. Arriba izquierda: aplicación de los tratamientos en almácigo, derecha: inoculación al trasplante mediante corte de raíces e inmersión en solución bacteriana. Abajo izquierda: vista general de experimento en macrotúneles, derecha: vista de parcelas.

## Resultados

Experimento 1: diciembre 2015-febrero 2016.

En este experimento se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de plantas afectadas siendo las parcelas tratadas con Nacillus y Biorend las que presentaron los menores valores de incidencia en los primeros 20 días desde la inoculación (figura 2 y

cuadro 1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los parámetros evaluados.

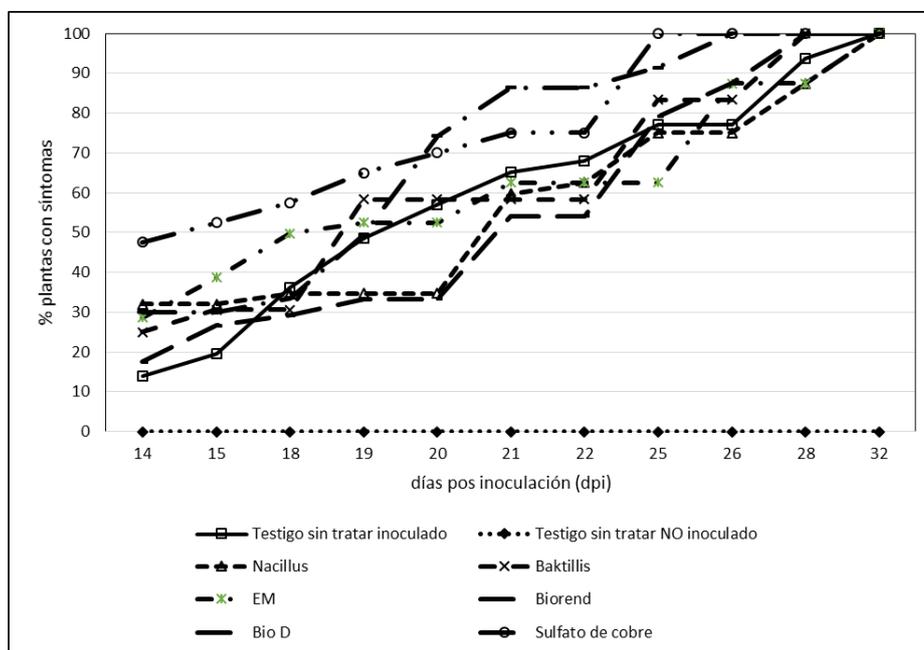


Figura 2. Evolución del porcentaje de plantas enfermas. Experimento 1.

Cuadro 1. Porcentaje de plantas enfermas (experimento 1).

Tratamientos	13 dpi <sup>1</sup>	20 dpi	25 dpi
Testigo inoculado	13,9 NS <sup>2</sup>	57 b <sup>3</sup>	77 b
Sin inocular	0,0	0 a	0 a
Nacillus	32	35 ab	75 b
Baktillis	25	58 b	83 b
EM	29	53 b	88 b
Biorend	18	33 ab	88 b
Bio D	30	74 b	100 b
Sulfato de cobre	48	70 b	100 b

<sup>1</sup> dpi. Días pos inoculación.

<sup>2</sup>NS. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos

<sup>3</sup>Los datos seguidos por igual letra no difieren significativamente al 1% según prueba de rangos múltiples de Duncan



Figura 3. Columna izquierda: plantas con síntomas de cancro bacteriano en experimento 1. Columna derecha: fila superior parcela tratada con Nacillus, centro parcela tratada con Biorend e inferior parcela tratada con sulfato de cobre.

Experimento 2: Febrero-abril 2016.

En la figura 4 y el cuadro 2 se muestran la evolución de la incidencia de la enfermedad desde el comienzo de síntomas 14 días pos inoculación, dpi, y en el cuadro 3 el estado de las secciones longitudinales de los tallos a fin del experimento.

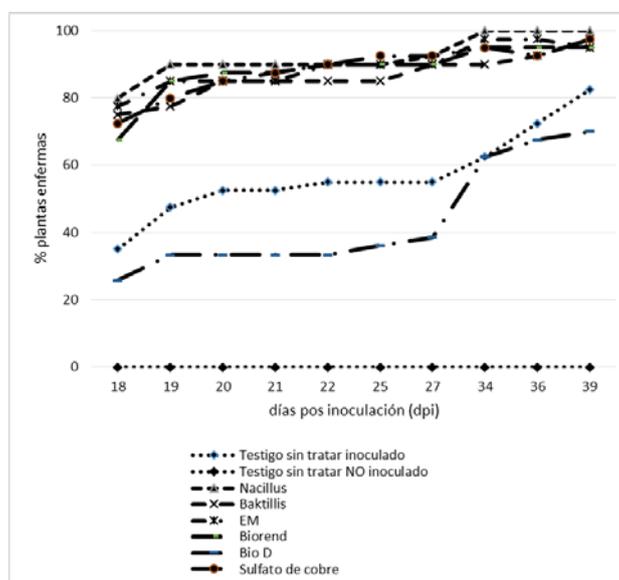


Figura 4. Evolución del porcentaje de plantas enfermas. Experimento 2.

Cuadro 2. Porcentaje de plantas enfermas e intensidad de síntomas externos, experimento 2.

Tratamientos	Días a síntoma	% plantas con síntomas (incidencia)		ADCPE <sup>2</sup> (incidencia) 39 dpi	Intensidad de síntomas (escala 0-3) <sup>3</sup>	
		18 dpi	39 dpi		34 dpi	39 dpi
Test.inoculado	24 bc <sup>1</sup>	37 b	84 bc	1398 bc	1,2 b	1,6 b
Test.sin inocular	---	0 a	0 a	0 a	0,0 a	0,0 a
Nacillus	19 a	80 c	100 c	2061 d	2,5 d	2,4 cde
Baktillis	20 a	75 c	98 c	1930 d	2,4 d	2,5 de
EM	19 a	78 c	95 c	2006 d	2,5 d	2,6 de
Biorend	19 a	68 c	95 c	1979 d	2,1 cd	2,0 bc
Bio D	27 c	27 b	70 b	1026 b	1,4 b	1,5 b
Sulfato de cobre	20 a	74 c	98 c	1997 d	2,4 d	2,5 de
Bion	23 ab	21 ab	93 c	1561 c	1,7 bc	1,9 b

<sup>1</sup> Los datos seguidos por igual letra no difieren significativamente al 1% según prueba de rangos múltiples de Duncan

<sup>2</sup> ADCPE= Área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (incidencia).

<sup>3</sup> Intensidad de síntomas: 0 = sin síntomas, 1= leves, 2= moderados y 3= fuertes.



Figura 5. Arriba: izquierda vista de parcela testigo sin tratar, 34 dpi, centro parcela tratada con Biorend, derecha parcela tratada con Bio D. Abajo: vista general de una repetición del experimento.

Cuadro 3. Porcentaje e intensidad de síntomas internos a 39 días pos inoculación (degradación de médula y vasos).

Tratamientos	% plantas con síntomas internos	Intensidad de síntomas (0-3) <sup>2</sup>
Testigo inoculado	54 b <sup>1</sup>	1,2 b
Testigo sin inocular	0 a	0 a
Nacillus	93 c	2,0 d
Baktillis	88 c	2,2 d
EM	85 c	2,0 d
Biorend	85 c	1,8 cd
Bio D	48 b	1,0 b
Sulfato de cobre	88 c	1,8 cd
Bion	68 bc	1,3 bc

<sup>1</sup> Los datos seguidos por igual letra no difieren significativamente al 1% según prueba de rangos múltiples de Duncan.

<sup>2</sup> Según escala 0-3 donde 0 = sin síntomas, 1= distorsión de médula y vasos leve, 2= moderada y 3= severa.

### Conclusiones

- Los resultados de estos trabajos concuerdan los previamente obtenidos en cámara e invernadero en condiciones más controladas.
- Este tipo de productos no impiden la diseminación de la enfermedad, atenúan los síntomas y enlentecen su evolución.
- Tomando en consideración ambos experimentos y todas las evaluaciones efectuadas, los tratamientos con Bio D, Nacillus, Baktillis y Biorend en aplicaciones en riego a la base de la planta mostraron buen desempeño.

## EVALUACIÓN DE PRODUCTOS INDUCTORES DE RESISTENCIA EN EL MANEJO DE MÉDULA HUECA DEL TOMATE (*PSEUDOMONAS SPP.*). TEMPORADA 2015-2016

Diego Maeso, Alfredo Fernández, Wilma Walasek  
Programa Producción Hortícola. Sección Protección Vegetal. INIA Las Brujas

### Resumen

La médula hueca causada por *Pseudomonas* spp. (*P. corrugata*, *P. mediterránea*, entre otras) es frecuente en cultivos de tomate en invernaderos sin control de temperatura en épocas con alta amplitud térmica. Provoca muerte de plantas en periodos de alto valor de la producción. El control se basa en aplicaciones foliares de cúpricos con las consecuentes desventajas (fitotoxicidad, acumulación en suelo, resistencia, control ineficiente). Actualmente se han desarrollado productos comerciales que promueven mecanismos de defensa de las plantas (resistencia sistémica adquirida, SAR, o resistencia sistémica inducida, ISR). El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de algunos de estos productos en el manejo de la médula hueca. En tres experimentos bajo cubierta plástica se compararon: Nacillus (*Bacillus* spp.) y Baktillis (*Bacillus subtilis*) 300 g/100 l (pre-inoculación) y 500 g/100 l (pos-inoculación), Hidro Cup (hidróxido de cobre) 300 g/100 l, Biorend Cobre (quitosano + sulfato de cobre pentahidratado) 300 g/100 l, Bion (acibenzolar S metil) 5 g/100 l, Bio D (quelatos de hidrácido de ácido cítrico de Mn y Zn) 500 ml/100 l frente a un testigo sin tratar. Los productos fueron aplicados al follaje en 8 (2015, 4 pre y 4 posinoculación), 12 (abril-agosto 2016, 6 + 6), y 6 (agosto-diciembre 2016, 3+3) oportunidades. La inoculación se realizó mediante inyección de 50 ml de suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) en la axila de una hoja 80-90 días después de la siembra. Se usó un diseño de bloques al azar, con parcelas de 10 plantas. Se evaluó: porcentaje de plantas con síntomas externos, largo de las lesiones, y largo de médula afectada. Nacillus y Baktillis (pre y pos-inoculación), Bio D y Bion presentaron menor porcentaje de plantas afectadas e intensidad de síntomas. Los resultados muestran el potencial de este tipo de productos en el manejo de enfermedades bacterianas en tomate.

### Introducción

La médula hueca causada por *Pseudomonas* spp. (*P. corrugata*, *P. mediterránea*, entre otras) es frecuente en cultivos de tomate en invernaderos sin control de temperatura en épocas con alta amplitud térmica. Provoca muerte de plantas en periodos de alto valor de la producción. El control se basa en aplicaciones foliares de cúpricos. Actualmente se han desarrollado productos comerciales que promueven mecanismos de defensa de las plantas (resistencia sistémica adquirida, SAR, o resistencia sistémica inducida, ISR). El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de algunos de estos productos en el manejo de la médula hueca.

## **Materiales y Métodos**

Material vegetal: Tomate cv. Ceta en cultivos bajo cubierta (macrotúneles) realizados en campo experimental de INIA LB.

Diseño experimental: Bloques al azar con cuatro repeticiones (repeticiones formadas por cada macrotúnel). Las parcelas constaban de diez plantas cultivadas en macetas de 20 l con sustrato estéril.

Tratamientos: Los tratamientos fueron aplicados al follaje cada 7-10 días con máquina aplicadora CO<sub>2</sub> a mochila (R&D sprayers, EEUU) con un gasto promedio de agua de 1000 l/ha. En el cuadro 1 se presentan detalles de los tratamientos y en el cuadro 2 de los cultivos de cada experimento.

Inoculación: Las plantas fueron inoculadas mediante la inyección en la axila de una hoja madura de 50 ul de una suspensión bacteriana de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml de un aislado local de *Pseudomonas* sp. causante de médula hueca.

Análisis estadístico: Se realizó un análisis de variancia y posterior separación de medias mediante la prueba Duncan. Para ello se utilizó el paquete estadístico Infostat de uso libre ([www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el ensayo.

Tratamiento	Principio activo	Dosis/100 l	Número de aplicaciones y momento en cada temporada	
			Preventivas	Posinoculación
1. Nacillus preventivo	<i>Bacillus subtilis</i> y otros	300 g	4 10 6	4 2 --
2. Nacillus posinoculación	<i>Bacillus subtilis</i> y otros	500 g	-- -- --	4 6 3
3. Baktillis preventivo	<i>Bacillus subtilis</i>	300 g	4 10 6	4 2 --
4. Baktillis posinoculación	<i>Bacillus subtilis</i>	500 g	-- -- --	4 6 3
5. HidroCup 77%	Hidróxido de cobre	300 g	4 10 6	4 2 --
6. Biorend cobre	Quitosano y Sulfato de Cobre Penta hidratado	150 cc	4 10 6	4 2 --
7. Bion	Acibenzolar S methyl	5 g	4 10 6	4 2 --
8. Bio D Zn Mn	Quelato de hidrácidos de ácido cítrico.	500 cc	4 10 6	4 2 --
9. Testigo sin tratar				

## Experimentos:

Se realizaron tres experimentos durante: 1) agosto-diciembre 2015, 2) marzo-agosto 2016 y 3) agosto-diciembre 2016. En el cuadro 2 se muestran las fechas de siembra, trasplante, la temperatura media y la amplitud térmica en cada ciclo.

Cuadro 2. Información correspondiente a los experimentos.

Experimento	1	2	3
	Agosto-diciembre 2015	Marzo-agosto 2016	Agosto-diciembre 2016
Siembra	26/8	28/3	19/8
Transplante	16/10	17/5	47/10
Inoculación	14/11	1/7	14/11
Temperatura media en el ciclo	16,2°C	15,9°C	21,2°C
Amplitud térmica	24,2 °C	16,7°C	16,1°C
Inicio aplicaciones preventivas	12/10	26/4	22/9
Inicio aplicaciones posinoculación	12/11	5/7	14/11



Figura 2. Inoculación. Izquierda infiltración con solución bacteriana en axila de hoja, centro colocación de palillo en herida y derecha asperjado periódico de la zona.

Evaluaciones:

A partir de la aparición de la enfermedad se evaluó semanalmente el porcentaje de plantas que presentaban síntomas externos en la zona inoculada o lejos de ella (incidencia). La severidad fue evaluada por la longitud de la lesión en milímetros. También se registró el porcentaje de plantas que presentaban raíces adventicias.

A fin de ciclo se cortaron longitudinalmente los tallos de todas las plantas para examinar la presencia de desórdenes (coloración anormal de vasos y/o médula, médula esponjosa, etc.), calculándose el porcentaje de plantas afectadas y el porcentaje promedio de médula amarronada (dividiendo por la altura de planta a fin de ciclo).

Todos los valores en porcentaje fueron transformados por la fórmula  $\arcsen \sqrt{\%}$  previo a su análisis estadístico.

Se evaluó la altura de las plantas semanalmente. Ante la aparición de síntomas de desórdenes nutricionales en uno de los tratamientos en el experimento 2 se realizó un análisis foliar de contenido de Fe-Zn-Mn.

## Resultados

### Evolución de la enfermedad

En los cuadros 3, 4 y 5 se presentan los resultados de las evaluaciones de incidencia y severidad de síntomas en los tres experimentos que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

En el experimento 1 (cuadro 3) los valores menores de porcentaje de plantas con síntomas externos a 27 días después de la inoculación fueron presentados por los tratamientos con Nacillus y Baktillis iniciados previo a la inoculación, con Baktillis pos inoculación, e HidroCup.

Cuadro 3. Porcentaje de plantas con síntomas externos de tallo hueco. Experimento 1.

Tratamiento	4/12 20 dpi <sup>1</sup>	11/12 27 dpi
1. Nacillus preventivo	43 ab <sup>2</sup>	45 ab
2. Nacillus posinoculación	35 a	30 a
3. Baktillis preventivo	40 ab	33 a
4. Baktillis posinoculación	30 a	28 a
5. HidroCup 77%	43 ab	30 a
6. Biorend cobre	65 c	58 bc
7. Bion	43 ab	38 ab
8. Bio D Zn Mn	23 a	43 ab
9. Testigo sin tratar	60 bc	68 c

<sup>1</sup> dpi: días pos inoculación

<sup>2</sup> Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples

En el experimento 2 los tratamientos que recibieron aplicaciones con Bion, Baktillis y Nacillus preventivamente presentaron el menor porcentaje de plantas con síntomas externos a los 26 días después de la inoculación. Respecto a la severidad de estas lesiones los tratamientos que presentaron menor longitud de lesiones externas a los 40 días después de la inoculación

fueron los que recibieron aplicaciones de Nacillus y Baktillis preventivamente y de Bio D. Estos tratamientos a su vez también fueron los que presentaron menor porcentaje de plantas con médula amarronada a fin del experimento.

Cuadro 4. Porcentaje de plantas con síntomas externos e internos de tallo hueco y longitud de lesiones externas. Experimento 2.

Tratamiento	% plantas con síntomas externos		Largo lesiones (mm)	promedio	
	14 dpi <sup>1</sup>	26 dpi		externas	% promedio de médula amarronada
	14 dpi <sup>1</sup>	26 dpi	33 dpi	40 dpi	53 dpi
1. Nacillus preventivo	48 ab <sup>2</sup>	50 ab	2 a	4 a	6 a
2. Nacillus posinoculación	58 abc	63 abcd	5 ab	8 ab	8 ab
3. Baktillis preventivo	35 a	40 ab	4 ab	6 a	6 a
4. Baktillis posinoculación	60 abc	65 bcd	4 ab	9 ab	8 ab
5. HidroCup 77%	70 bc	78 cd	8 b	16 b	7 ab
6. Biorend cobre	58 abc	60 abcd	5 ab	7 ab	7 ab
7. Bion	35 a	35 a	4 a	11 b	11 b
8. Bio D Zn Mn	40 ab	50 abc	6 a	4 a	4 a
9. Testigo sin tratar	83 c	83 d	11 ab	8 ab	8 ab

<sup>1</sup> dpi: días pos inoculación

<sup>2</sup> Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples

En el experimento 3 los tratamientos que recibieron aplicaciones con Bio D, Nacillus y Baktillis preventivamente, Biorend Cobre y Bion presentaron menor porcentaje de plantas con síntomas externos a los 17 días pos inoculación. Todos los tratamientos presentaron menores valores de largo de lesiones externas y porcentaje de plantas con lesiones internas frente al testigo sin tratar. También en el experimento 3 se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en la presencia de raíces adventicias siendo los tratamientos a base de Bio D, Bion los que presentaron menor porcentaje de plantas con este desorden.

Cuadro 5. Porcentaje de plantas con síntomas externos e internos de tallo hueco y longitud de lesiones externas. Experimento 3.

Tratamiento	% plantas con síntomas externos	Largo promedio lesiones externas (mm)	% promedio de plantas con médula amarronada	% plantas con raíces adventicias	
				17 dpi	37 dpi
1. Nacillus preventivo	31 ab <sup>2</sup>	29 a	20 a	31 bcd	59 bc
2. Nacillus posinoculación	61 bc	58 ab	8 a	51 d	83 c
3. Baktillis preventivo	38 ab	33 a	30 a	8 a	55 abc
4. Baktillis posinoculación	55 abc	31 a	31 a	39 cd	74 c
5. HidroCup 77%	50 abc	39 a	8 a	18 ab	51 abc
6. Biorend cobre	40 ab	39 a	18 a	28 bc	73 c
7. Bion	43 ab	38 a	6 a	3 a	23 ab
8. Bio D Zn Mn	24 a	22 a	3 a	5 a	16 a
9. Testigo sin tratar	78 c	99 b	80 b	44 cd	82 c

<sup>1</sup> dpi: días pos inoculación

<sup>2</sup> Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples

En el cuadro 6 se presentan resultados de la evaluación de altura de plantas correspondientes al experimento 2 en el que se observaron diferencias estadísticamente significativas a los 113 días luego de la siembra. Los tratamientos cuyas plantas presentaron menor altura promedio fueron los que recibieron aplicaciones a base de Baktillis (posinoculación), Bion y Bio D. Las diferencias desaparecieron a los 141 días luego de la siembra.

Cuadro 6. Altura promedio de plantas en el experimento 2.

Tratamiento	Altura promedio de planta (cm)	
	19/7 (113 dds <sup>1</sup> )	16/8 (141 dds)
1. Nacillus preventivo	105 bc <sup>2</sup>	127
2. Nacillus posinoculación	106 bc	125
3. Baktillis preventivo	101 abc	130
4. Baktillis posinoculación	95 a	120
5. HidroCup 77%	105 bc	130
6. Biorend cobre	108 c	133
7. Bion	99 ab	126
8. Bio D Zn Mn	99 ab	127
9. Testigo sin tratar	103 abc	127

<sup>1</sup> dds: días después de la siembra

<sup>2</sup> Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples

También en el experimento 2 se observaron a los 113 días pos siembra síntomas de deficiencia de hierro en el tratamiento que recibió aplicaciones de Bio D Zn Mn. En el cuadro 7 se presentan los resultados del análisis foliar de plantas de los diferentes tratamientos. Como se observa ese tratamiento presentó menores valores de hierro y valores más altos de Zn y Mn lo cual pudo haber provocado los síntomas observados.

Cuadro 7. Resultados del análisis foliar efectuado en plantas del experimento 2 (113 días pos siembra).

Tratamiento	Hierro	Zinc	Manganeso
1. Nacillus preventivo	144	74	194
2. Nacillus posinoculación	110	64	179
3. Baktillis preventivo	117	62	192
4. Baktillis posinoculación	108	64	177
5. HidroCup 77%	134	71	223
6. Biorend cobre	119	68	215
7. Bion	120	70	229
8. Bio D Zn Mn	105	157	256
9. Testigo sin tratar	116	59	169

### Conclusiones

- Los tratamientos presentaron diferencias en el porcentaje de plantas afectadas (incidencia) y la intensidad de síntomas externa e interna.
- Las parcelas tratadas con Nacillus, Baktillis, Bio-D y Bion mostraron en general menor incidencia y severidad de la enfermedad.
- Se deberá estudiar la evolución de la inducción y su persistencia para formular una recomendación de uso a nivel comercial.
- Un aspecto a destacar es que la resistencia inducida por estos productos es efectiva también para otras enfermedades del cultivo.

### Bibliografía

Jacobsen, B. J., Zidack, N. K., & Larson, B.J. 2004. The role of Bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. *Phytopathology* 94:1272-1275.

Garbelottl de Jall, N., Lulz, C., da Rocha Neto, A.C. & Di Plero, R.M. 2014. High-density chitosan reduces the severity of bacterial spot and activates the defense mechanisms of tomato plants. *Tropical Plant Pathology*, vol. 39(6):434-441, 2014.

Li, B., Shan, C., Ge, M., Wang, L., Fang, Y, Wang, Y. Xie, G. & Sun, G. 2013. Antibacterial Mechanism of Chitosan and its Applications in Protection of Plant from Bacterial Diseases. *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 25, No. 18 (2013), 10033-10036.

Scortichini, M. 2014. Field efficacy of chitosan to control *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of kiwifruit bacterial canker. Eur. J. Plant Pathol. (2014) 140:887-892.

Scortichini, M. 2016. Field efficacy of a Zinc-copper-hydracid of citric acid biocomplex compound to reduce oozing from winter cankers caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Journal of Plant Pathology (2016), 98 (3), 651-655.

Ustun, N.; Demir, G.; Saygili, H., 2005. Possibilities for control of tomato pith necrosis by using copper compounds and plant activators. Acta Horticulturae 2005 No. 695 pp. 321-326

Walters, D., Walsh, D., Newton, A., & Lyon, G. 2005. Induced resistance for plant disease control: Maximizing the efficacy of resistance elicitors. Phytopathology 95: 1368-1373.

Walters, D., Ratsep, J. & Havis, N. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. Journal of Experimental Botany, Vol. 64, No. 5, pp. 1263-1280, 2013

## **CONTROL DE LA MANCHA BACTERIANA DEL TOMATE (*XANTHOMONAS SPP.*) EN CULTIVO A CAMPO PARA INDUSTRIA MEDIANTE APLICACIONES FOLIARES. 2015-2016**

Diego Maeso, Alfredo Fernández, Wilma Walasek  
INIA Las Brujas, Programa Nacional de Producción Hortícola, Sección Protección Vegetal.

### **Introducción**

La mancha bacteriana del tomate (*Xanthomonas spp.*) es una de las enfermedades foliares más importantes del cultivo al aire libre. Hasta el momento el control se basa en la reiterada aplicación foliar preventiva de productos, principalmente a base de cobre muchas veces mezclado con mancozeb.

Desde hace algunos años INIA ha venido realizando trabajos experimentales tendientes a evaluar la eficiencia de productos alternativos aplicados a follaje para el control de esta enfermedad.

Se han reportado los efectos beneficiosos derivados de la aplicación de productos a base de *Bacillus subtilis* en el control de enfermedades. La acción de este agente es explicada a través de dos vías: 1) la inducción de resistencia sistémica (ISR, induced systemic resistance, Ryu et al. 2004, Ongena et al. 2007) y 2) la producción de antibióticos y agentes antimicrobianos (Hammami et al. 2009). Algunos de estos productos ya son comercializados internacionalmente (Serenade, Kodiak, etc.) principalmente para el control de enfermedades a hongos (Lanna et al. 2010, Cawoy et al. 2011).

En temporadas anteriores estos productos han sido evaluados en nuestras condiciones en temporadas anteriores (Maeso, Fernández y Walasek 2015) para la prevención y disminución de daños por mancha bacteriana del tomate (Roberts et. al. 2008, Edgecomb & Manker 2006, Abbasi & Weselowski 2015 ).

### **Objetivos**

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar tratamientos foliares con productos a base de *B. subtilis* y otros compuestos alternativos para el control de la mancha bacteriana (*Xanthomonas spp.*) en tomate para industria.

## Materiales y Métodos

Ubicación: Campo experimental de INIA Las Brujas. Rincón del Colorado. Departamento de Canelones.

Forma de aplicación: Foliar mediante pulverizadora de mochila con CO<sub>2</sub> (R&D sprayers, EEUU). Gasto por hectárea varió de 700 a 1500 l durante la temporada.

Cultivo: Tomate de industria, variedades Repique y Loica. Distancia de plantación 1,6 x 0,30 m. Fecha de siembra 13/11/2015, trasplante 14/12/2015.

Tratamientos: En el cuadro 1 se muestran los detalles de los tratamientos evaluados, dosis, comienzo e intervalo entre aplicaciones.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el ensayo.

Tratamiento	Principio activo	Dosis/100 l	Intervalo
1. Nacillus	<i>Bacillus subtilis</i>	Preventiva 300 g	Semanal
2. Baktillis	<i>Bacillus subtilis</i>	Preventiva 300 g	Semanal
3. HidroCup 77%	Hidróxido de cobre	300 g	Semanal
4. Sporan	Mezcla de aceites esenciales	1000 cc	Semanal
5. Biorend cobre	Quitosano y Sulfato de Cobre Penta hidratado	150 cc	Semanal
Sporekill	Didecyl di methyl ammonium chloride	100 cc	Luego de lluvia.
6. Bion	Acibenzolar S methyl	5 g	Semanal
7. Testigo sin tratar			

Los tratamientos fueron repetidos en las dos variedades utilizadas.

Las aplicaciones preventivas comenzaron el 29/12/2015. Los tratamientos semanales recibieron doce aplicaciones, y el tratamiento 5 adicionalmente una de Sporekill luego de lluvia. La última aplicación de todos los tratamientos fue realizada el día 15/03/16.

Diseño experimental:

Factorial en bloques al azar con cuatro repeticiones. Los factores fueron la variedad y los tratamientos. Cada parcela constó de tres filas de tres metros de largo (10 plantas). Las evaluaciones se realizaron en la fila central siendo las dos externas dejadas como bordes (figuras 1 y 2).



Figura 1. Vista panorámica del ensayo (1/2/2016).



Figura 2. Detalle de una parcela (1/2/2016).

### Análisis estadístico:

Se realizó el análisis de variancia con posterior separación de medias mediante la prueba Duncan. Para ello se utilizó el paquete estadístico Infostat de uso libre ([www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)).

### Parámetros evaluados:

#### Evolución de la enfermedad.

A partir de comienzo de síntomas (1/2/2016) se evaluó semanalmente el porcentaje de área foliar afectada por la enfermedad (severidad) de cada una de diez plantas de la fila central de cada parcela. Los porcentajes asignados se promediaron y los valores fueron transformados por la fórmula  $\arcsen \sqrt{\%}$  previo a su análisis estadístico.

Adicionalmente, con todas las evaluaciones se calculó el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE).

#### Rendimientos:

Se registró el número y peso total de frutos en cuatro cosechas (29/2, 14/3, 30/3 y 15/4).

## Resultados

### Severidad

En el cuadro 2 y la figura 3 se muestran los resultados de las evaluaciones de severidad realizadas (intensidad de la enfermedad en porcentaje de área foliar afectada) y del área debajo de la curva de progreso de la enfermedad.

Cuadro 2. Resultados de las evaluaciones de severidad de mancha bacteriana (en porcentaje de área foliar afectada). Tratamientos promedio de ambas variedades.

Tratamiento	15/02	14/03	04/04	ADCPE
Nacillus 300 g/100 l	10,7 b <sup>1</sup>	23,5 bc	42,0 ab	1476 bc
Baktillis 300 g/100 l	4,0 a	28,8 bcd	47,5 ab	1534 bc
Hidrocup 300 g/100l	2,1 a	7,8 a	46,4 ab	981 a
Sporan 1000 cc/100 l	4,8 ab	39,0 cd	52,5 bc	1684 bc
Biorend Cu 150 cc/100 l complementado con Sporekill luego de lluvias	6,1 ab	28,1 bc	41,4 ab	1443 b
Bion 5 g/100 l	4,5 ab	19,0 ab	38,9 a	1338 b
Testigo sin tratar	4,8 ab	44,6 d	59,0 c	1821 c

<sup>1</sup> Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las evaluaciones realizadas y en el ADCPE. Los menores valores de severidad diferenciados estadísticamente del testigo sin tratar se encontraron en las parcelas tratadas con HidroCup, Biorend Cobre complementado con Sporekill y Bion.

En el cuadro 3 se muestran los resultados incluyendo a las variedades en el análisis. Loica en la primera etapa fue la variedad que presentó menor porcentaje de área foliar afectada, lo cual se tradujo en un menor valor de ADCPE confirmando la mayor tolerancia a esta enfermedad comparada con Repique.

Cuadro 3. Resultados de las evaluaciones de severidad de mancha bacteriana (en porcentaje de área foliar afectada). Interacción variedades-tratamientos.

Variedad	Tratamiento	15/02	29/02	04/04	ADCPE
Loica	Nacillus 300 g/100 l	5,5 abc <sup>1</sup>	4,3 ab	49,4 bcd	910 abc
	Baktillis 300 g/100 l	1,3 ab	7,1 abc	50,1 cd	1018 abcd
	HidroCup 300 g/100l	0,8 a	1,7 a	43,8 abc	528 a
	Sporan 1000 cc/100 l	2,5 abc	7,9 abc	62,9 d	1433 bcde
	Biorend Cu 150 cc/100 l + Sporekill pos lluvias	1,0 a	5,7 ab	42,7 abc	920 abc
	Bion 5 g/100 l	3,2 abc	8,9 abc	47,7 bcd	947 abcd
	Testigo sin tratar	1,7 abc	10,2 abc	54,1 cd	1421 bcde
	<b>Promedio Loica</b>	<b>2,0 a</b>	<b>7 a</b>	<b>50 b</b>	<b>1277 a</b>
Repique	Nacillus 300 g/100 l	16,0 e	20,7 c	34,6 ab	1475 de
	Baktillis 300 g/100 l	6,7 bcde	22,8 c	45,0 abc	1608 de
	HidroCup 300 g/100l	3,3 abcd	3,2 a	48,9 bcd	725 ab
	Sporan 1000 cc/100 l	7,2 bcde	20,7 c	42,1 abc	1613 de
	Biorend Cu 150 cc/100 l + Sporekill luego de lluvias	11,2 de	13,6 abc	40,1 abc	1503 cde
	Bion 5 g/100 l	5,8 bcde	9,1 abc	30 a	991 bcd
	Testigo sin tratar	7,8 cde	19,2 bc	63,9 d	2034 e
	<b>Promedio Repique</b>	<b>8,0 b</b>	<b>16 b</b>	<b>43 b</b>	<b>1658 b</b>

<sup>1</sup> Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples.

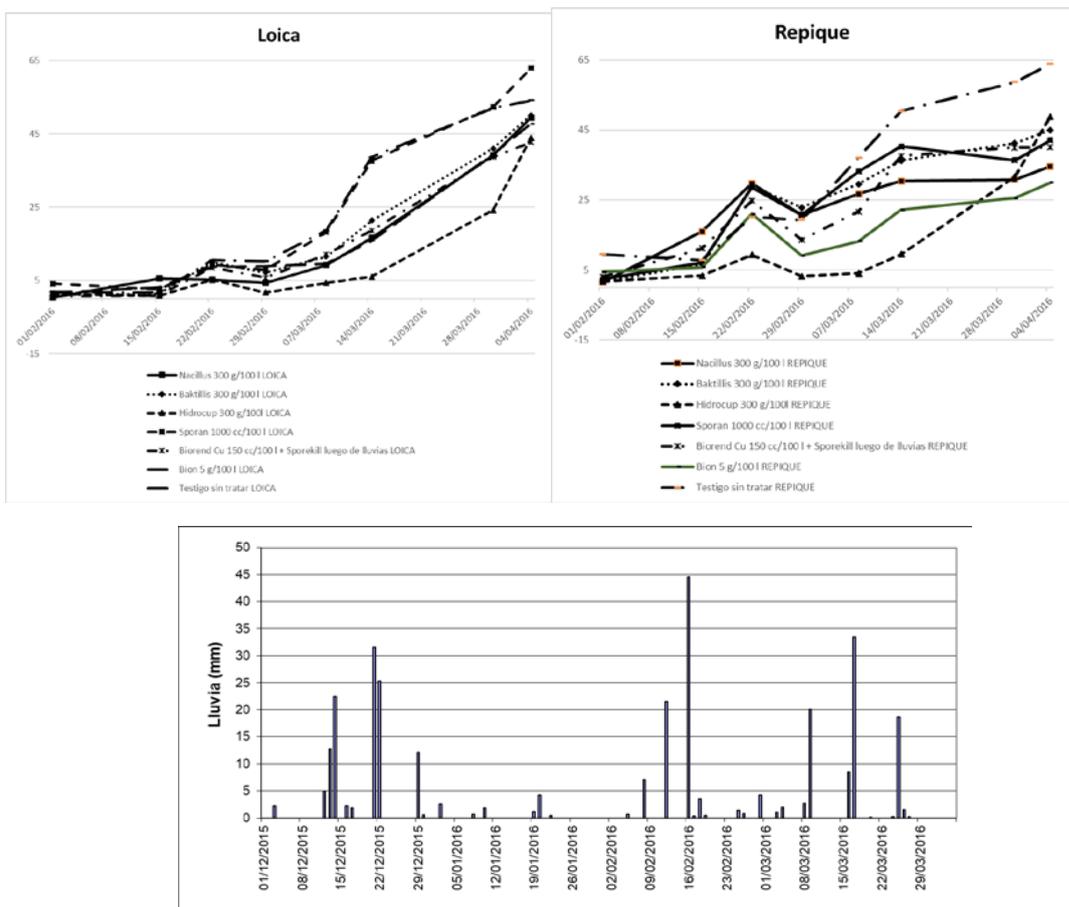


Figura 3. Evolución de la severidad (en porcentaje) de área foliar afectada con mancha bacteriana. Interacción variedad-tratamiento. Precipitaciones durante temporada 2015-2016.



Figura 4. Síntomas en algunas parcelas al 14/3/2016. Arriba de izquierda a derecha: Testigo sin tratar Loica, Repique, Hidrocup Loica. Centro de izquierda a derecha: Hidrocup Repique, Biorend Cobre + Sporekill Loica y Repique. Debajo de izquierda a derecha: Bion Loica y Repique y Sporan Repique.

## Rendimientos

Cuadro 4. Rendimientos totales (toneladas por hectárea) y porcentaje de frutos con mancha bacteriana. Interacción variedad-tratamiento.

Variedad	Tratamiento	Rendimientos totales ton/há	% frutos con mancha bacteriana
Loica	Nacillus 300 g/100 l	33 d <sup>1</sup>	9 ab
	Baktillis 300 g/100 l	32 cd	16 abc
	Hidrocup 300 g/100l	28 abcd	8 a
	Sporan 1000 cc/100 l	29 abcd	12 abc
	Biorend Cu 150 cc/100 l + Sporekill pos lluvias	28 abcd	13 abc
	Bion 5 g/100 l	30 bcd	13 abc
	Testigo sin tratar	31 cd	15 abc
	<b>Promedio Loica</b>		<b>30 b</b>
Repique	Nacillus 300 g/100 l	25 abcd	18 abc
	Baktillis 300 g/100 l	26 abcd	20 cd
	Hidrocup 300 g/100l	22 ab	20 cd
	Sporan 1000 cc/100 l	25 abcd	12 abc
	Biorend Cu 150 cc/100 l + Sporekill pos lluvias	22 a	21 cd
	Bion 5 g/100 l	22 a	19 bc
	Testigo sin tratar	25 abcd	29 d
	<b>Promedio Repique</b>		<b>24 a</b>

<sup>1</sup> Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples.

**Cuadro 5. Porcentaje de frutos con mancha bacteriana. Discriminados por tratamiento.**

Tratamiento	% frutos con mancha bacteriana
Nacillus 300 g/100 l	14 a <sup>1</sup>
Baktillis 300 g/100 l	18 ab
Hidrocup 300 g/100l	14 a
Sporan 1000 cc/100 l	12 a
Biorend Cu 150 cc/100 l + Sporekill pos lluvias	17 ab
Bion 5 g/100 l	16 ab
Testigo sin tratar	22 b

<sup>1</sup> Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples.

Los tratamientos a base de Hidrocup, Biorend Cu + Sporan y Bion para la variedad Repique mostraron rendimientos totales en toneladas por hectárea menores al testigo sin tratar (cuadro 4). La variedad Loica fue la que presentó menor porcentaje de frutos con síntomas de mancha bacteriana y mayor rendimiento acumulado (cuadro 5) . Los tratamientos a base de Nacillus, Hidrocup y Sporan presentaron menores porcentajes de frutos con mancha bacteriana.

### Discusión

Los tratamientos con hidróxido de cobre, Biorend Cobre y Bion presentaron un control aceptable de la enfermedad en follaje en ambos cultivares. El cultivar Loica mostró los menores porcentajes de área foliar afectada y frutos con mancha bacteriana. Algunos tratamientos dentro de la variedad Repique mostraron rendimientos totales inferiores al testigo sin tratar este resultado no puede ser explicado por el control de la enfermedad en follaje. Al no haberse realizado inoculación artificial el ataque de la enfermedad no fue tan grave como la temporada anterior.

### Conclusiones

Bajo condiciones de infección natural los tratamientos a base de hidróxido de cobre, Biorend Cobre complementado con Sporekill y Bion lograron un buen control de la enfermedad en

follaje durante toda la temporada. Existieron diferencias entre las variedades respecto a la susceptibilidad a la enfermedad.

### **Bibliografía**

ABBASI, P.A., WESELOWSKI, B. 2015. Efficacy of *Bacillus subtilis* QST 713 formulations, copper hydroxide, and their tank mixes on bacterial spot of tomato. *Crop Protection* 74 (2015):70-76.

CAWOY, H., BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. 2011. Bacillus-Based Biological Control of Plant Diseases. In: *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*. Ed. Margarita Stoytcheva. Rijeka, Croacia. p 273-302.

EDGEComb, D.W., MANKER, D. 2006. *Bacillus subtilis* strain QST 713, bacterial disease control in fruit, vegetable and ornamental production. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft*. 408, 2006:167-169.

HAMMAMI, I.; RHOUMA, A.; JAOUADI, B.; REBAI, A.; NESME, X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Letters in Applied Microbiology*, v.48, p.253-260, 2009.

LANNA, R.; MONTEIRO, H.; SILVA, R. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis* *Revista Tropica - Ciências Agrárias e Biológicas* V. 4, N. 2, p. 12-20, 2010.

MAESO, D., FERNÁNDEZ, A. & WALASEK, W. 2015. Control de la mancha bacteriana del tomate (*Xanthomonas* spp.) en cultivo a campo para industria mediante aplicaciones foliares. 2014-2015. INIA Serie Actividades de Difusión 756. p 112-118.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.-L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, v.9, p.1084-1090, 2007.

ROBERTS, P.D., MOMOL, M.T., RITCHIE, L., OLSON, S.M., JONES, J.B., BALOGH, B. 2008. Evaluation of spray programs containing cymoxanil, acibenzolar-S-methyl, and *Bacillus subtilis* compared to copper sprays for management of bacterial spot on tomato. *Crop Protection* 27 (2008):1519-1526.

RYU, C.M.; FARAG, M.A.; HU, C.-H.; REDDY, M.S.; KLOEPPER, J.W.; PARE, P.W. 2004. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* 134 (3):1017-1026.

## EMPLEO DEL RECEPTOR EFR EN TOMATE PARA EL CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS DEL TOMATE: ACTUALIZACIÓN DE RESULTADOS

Elsa Perdomo-Ferrando<sup>1</sup>, Sara Murchio<sup>2</sup>, Wilma Walasek<sup>3</sup>, Claudia Schwartzman<sup>2</sup>, Diego Maeso<sup>3</sup>, Marco Dalla Rizza<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Protección Vegetal, Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Garzón 780- Montevideo. CP 12900.

eperdomo@fagro.edu.uy

<sup>2</sup>Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas

<sup>3</sup>Sección Protección Vegetal, INIA Las Brujas

Palabras clave: Tomate, *Xanthomonas vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, EFR.

### Introducción

La defensa de las plantas ante los patógenos puede darse siguiendo dos caminos de percepción básicos: la inmunidad inducida por PAMPS (patrones asociados a patógenos) conocida como PTI (PAMP Triggered Immunity) y la inmunidad inducida por efectores producida por patógenos ETI (Effector Triggered Immunity). En el primer caso, la planta percibe los PAMPS mediante proteínas de reconocimiento localizadas en la membrana plasmática de las células y desencadena mecanismos primarios de defensa vegetal: la pared se refuerza con calosa, se producen especies reactivas del oxígeno y se inducen genes de defensa. Por otra parte, la respuesta ETI actúa a través de la percepción de factores de virulencia de los patógenos (o sus efectos) por parte de proteínas de resistencia especializadas de la planta. La defensa que se desencadena es intensa y puede incluir reacción de hipersensibilidad (muerte celular programada para impedir la dispersión del patógeno). La enfermedad solamente se produce cuando el microorganismo logra superar exitosamente estos mecanismos de defensa (Boller and Felix, 2009).

El receptor EFR, componente de la PTI reconoce el factor de elongación Tu (EF-Tu), ampliamente conservado en bacterias fitopatógenas. Este receptor se encuentra en muchas especies de brasicáceas y mediante ingeniería genética ha sido transferido a especies de interés agronómico como tomate y papa, confiriendo resistencia a bacterias patogénicas (Boschi et al., 2017; Lacombe et al., 2010).

El cultivo de tomate es afectado por numerosas enfermedades. Entre ellas, la mancha bacteriana y el cancro, causadas por *Xanthomonas* spp y *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* respectivamente, provocan cuantiosas pérdidas. La mancha bacteriana afecta fundamentalmente hojas, causando manchas primero cloróticas que se van necrosando. Estas manchas pueden coalescer y puede darse la defoliación de las plantas. También provoca manchas en los tallos y lesiones superficiales en los frutos. Éstos ven

afectada su calidad cosmética, pero la mayor pérdida se da al disminuir la capacidad fotosintética de la planta (frutos de menor tamaño) y por quemado (Jones 1991, Blancard 1992).

El cancro afecta fundamentalmente el xilema de la planta y sus síntomas van desde el marchitamiento parcial de las hojas hasta la muerte. Es altamente contagioso por el agua de riego y las labores del cultivo (desbrote, poda, etc). Las infecciones latentes son muy habituales, por lo que, por más que se tomen precauciones, la manipulación de las plantas es una forma usual de diseminar la enfermedad. De hecho, si se dan las condiciones, principalmente en invernáculo, es capaz de matar todas las plantas del cultivo en poco tiempo (Gitaitis 1991).

Para ninguna de estas enfermedades existen alternativas de control. No se han desarrollado variedades con resistencias adecuadas y el control químico es poco efectivo. Es por ello que INIA, en colaboración con The Sainsbury Lab (Reino Unido), ha generado líneas del cultivar INIA Milongón transformadas con el gen EFR. Los eventos de transformación han sido sometidos a autofecundación para fijar el carácter y su desempeño frente a enfermedades bacterianas de tomate está siendo evaluado (Dalla Rizza 2015).

En este trabajo se resumen los resultados de los ensayos de las generaciones T4 y T5 (posteriores a la transformación) frente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) y a *Xanthomonas vesicatoria* (Xv).

## Metodología

Todos los experimentos se realizaron en invernáculo de vidrio calefaccionado en INIA Las Brujas con normativa de bioseguridad según la Comisión para la Gestión de Riesgo.

Se designa como T0 a la planta transformada, T1 la primera generación de plantas de semilla obtenida por autofecundación y así sucesivamente.

La presencia del inserto en las plantas transformadas incluidas en los experimentos fue verificada mediante PCR, utilizando primers específicos del gen EFR y un gen constitutivo control (lat52).

Las plantas fueron sembradas en almácigos y cuando tuvieron el tamaño adecuado trasplantadas a bolsas-macetas (20 l) en T4 o macetas plásticas (1000 cc) en los experimentos con T5. Siempre se utilizó sustrato estéril.

El método de inoculación se describe en cada experimento, las plantas se mantuvieron en cámara húmeda 24 horas antes y después de la inoculación.

## Evaluaciones:

En todos los ensayos se utilizaron como testigos (inoculado y sin inocular) plantas de Milongón sin transformar (denominadas como WT+ y WT-, respectivamente).

Se registró la evolución del número de plantas con síntomas, tipo de síntomas y severidad utilizando escalas diferentes dependiendo de la enfermedad. También se contabilizó el número de días a aparición de síntomas y muerte de cada planta.

En algunos experimentos se calculó el área debajo la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE) utilizando los días entre evaluación y los valores observados para calcular la suma de los trapecios generados debajo de la curva.

#### **Desafíos con *Clavibacter michiganensis* subesp. *michiganensis* (Cmm).**

Se realizaron ensayos en T4, donde se inocularon 10 plantas por línea (4, 6, 16, 20 y 29) más 7 controles sin inocular y 5 controles positivos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de plantas inoculadas con Cmm en la generación T4 (abril-diciembre 2016)

Línea	Número de plantas	
	Con inserto	Sin inserto
WT-	N/A	7
WT+	N/A	5
4	10	0
6	2	8
16	10	0
20	10	0
29	7	2

La inoculación se realizó mediante corte de raíces e inmersión en 5 ml de suspensión bacteriana Cmm de  $10^8$  UFC/ml previo al trasplante.

Por otra parte, en T5 Se inocularon 60 plantas de las líneas 4, 16, 20 y 29 todas presentando el inserto. Las plantas fueron separadas en seis bloques (mesas) de diez plantas cada una. También se incluyeron 60 testigos negativos y 60 positivos.

En todos los experimentos se registró la evolución del número de plantas con síntomas, días entre inoculación-aparición de síntomas y días entre inoculación y muerte de la planta. La severidad de los síntomas fue evaluada usando una escala numérica de 0 a 5 (0= sin síntomas, 1= síntomas incipientes en hojas basales, 2= síntomas moderados en hojas basales, 3= síntomas moderados en toda la planta, 4= síntomas fuertes generalizados con muerte de hojas y 5= muerte de planta (Figura 1). También se registró la evolución de los tipos de síntomas: amarillamiento y marchitez de hojas basales, necrosis de borde foliar, marchitamiento unilateral, marchitamiento de ápice, canchros en tallo, muerte de planta y degradación interna de tallo desde 14 a 147 dpi.



Figura 1: Escala visual de severidad de cancro bacteriano en plantas de tomate Milongón.

### **Desafío con *Xanthomonas vesicatoria* (Xv)**

Los ensayos con Xv se realizaron con 60 plantas de la generación T5 de las líneas 4, 16, 20 y 29, todas con inserto. Se utilizaron 60 testigos positivos y 60 negativos sin inocular.

La inoculación se llevó a cabo mediante aspersion hasta el punto de goteo de una solución que contenía  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Los testigos negativos se inocularon con agua estéril.

Para la evaluación se utilizó la escala visual diagramática de Mello et al (1997) modificada, que se basa en el porcentaje de hoja afectada. Se evaluaron la quinta, sexta y séptima hojas verdaderas completamente desplegadas a los 11, 15, 18, 22 y 25 días post inoculación (dpi) (Figura 2). Hacia el fin de la evaluación a cada planta se le otorgó un puntaje de severidad global de 1 a 5 (1 sin síntomas y 5 planta totalmente afectada).

La infección con Xv fue verificada en lesiones típicas de mancha bacteriana mediante aislamiento en el 10% de las plantas.

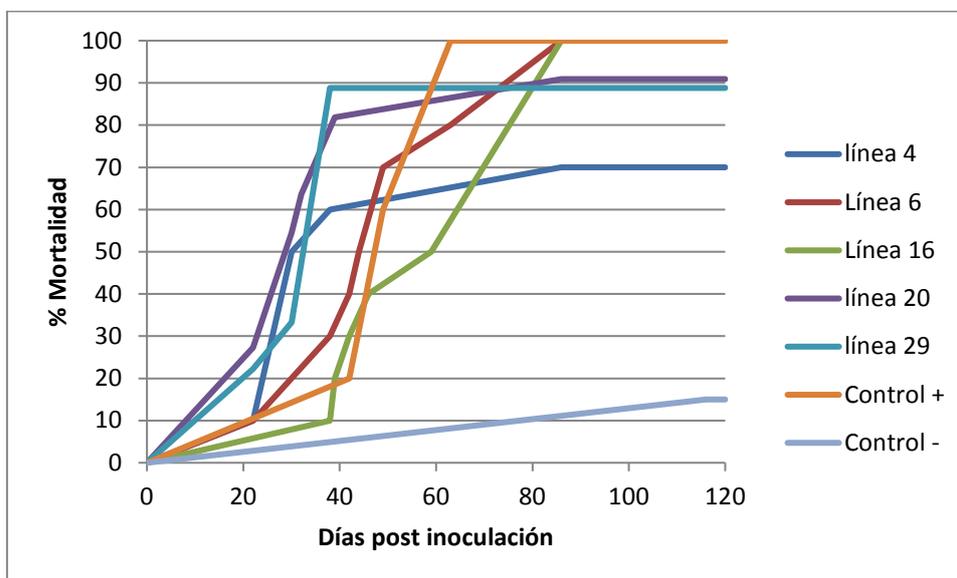


**Figura 2:** Hoja mostrando síntomas típicos de mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* spp.

## Resultados y discusión

### *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm).

En la generación T4, en tres de las cinco líneas se obtuvieron plantas que sobrevivieron más allá de los 120 después de la inoculación (dpi.) (Figura 3)



**Figura 3.** Mortalidad de plantas en función a días pos inoculación (generación T4).

Si bien existió un 100% de incidencia, la severidad de las infecciones fue menor en plantas que presentaron el inserto (Figura 4).

Se observó que las plantas sin transformar inoculadas (controles positivos) se enfermaron más tarde pero enfermaron de forma más severa, es decir, el progreso de la enfermedad una vez desencadenada es mucho más acentuado (sobre 120 días de evaluación, la enfermedad se desarrolla entre los días 44 y 64). Por otra parte, las plantas transformadas si bien muestran síntomas tempranamente sobreviven más en comparación con las no transformadas.

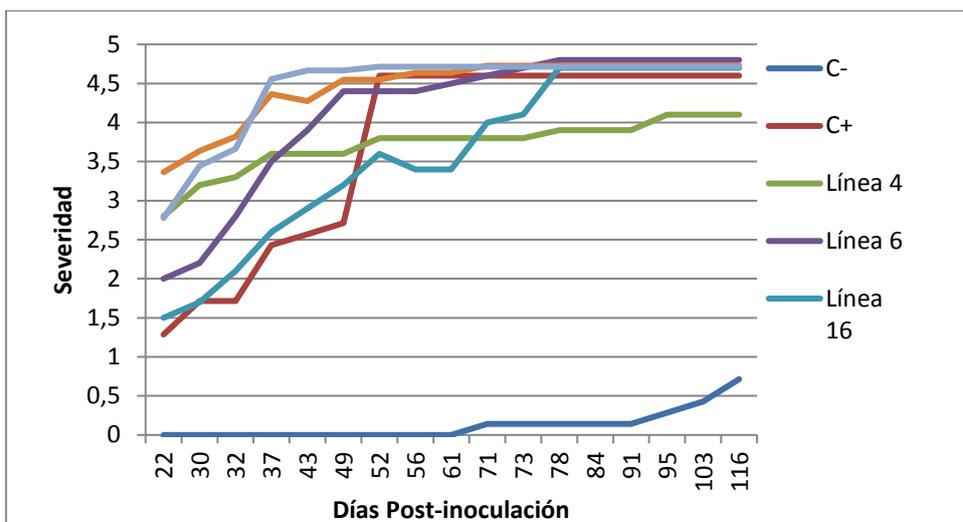


Figura 4: Severidad de respuesta a inoculación con Cmm de cada línea (generación T4) en función de los días post inoculación.

En la generación T5 si bien todas las plantas inoculadas desarrollaron síntomas, las líneas 16 y 20 presentaron una menor mortalidad que el testigo a los 120 dpi (Figura 5). A su vez, esas mismas líneas presentaron valores menores de severidad que el testigo en etapas más avanzadas del ensayo (Figura 6).

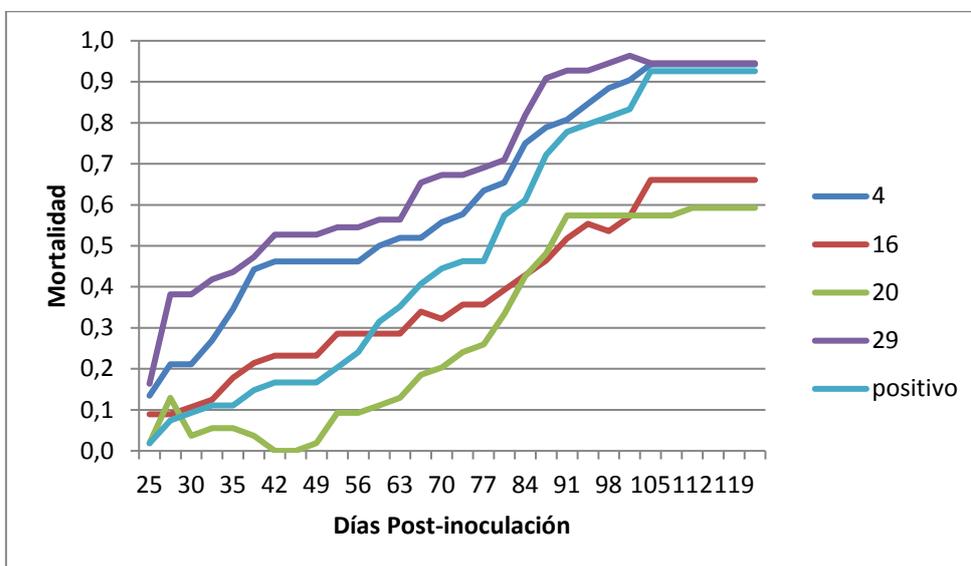


Figura 5: Mortalidad de plantas en función a días pos inoculación (generación T5).

Si bien no hay un efecto visiblemente mayor que diferencie el comportamiento de las líneas evaluadas parece haber nuevamente una tendencia en líneas 16 y 20 de menor desarrollo de la enfermedad pos inoculación.

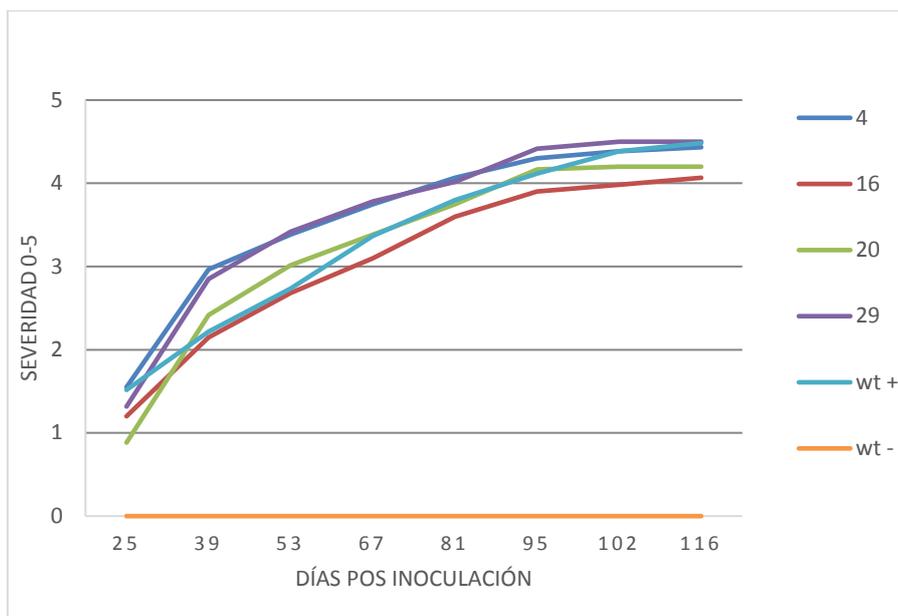


Figura 6 severidad en función de días pos inoculación (generación T5).

***Xanthomonas vesicatoria (Xv)***

Se observaron diferencias entre el área foliar afectada en las tres hojas evaluadas de los eventos transformados respecto a los no transformados (Figura 7). En este caso, si bien la respuesta de las líneas transformadas es diferente en todos los casos se observa una respuesta positiva consistente. A su vez, la severidad en toda la planta fue menor en los individuos transformados de hecho, la infección no avanzó hacia las hojas que se fueron desplegando a lo largo del experimento (Figura 8). Nuevamente la línea 16 parece dar una respuesta destacada en el conjunto de las líneas evaluadas.

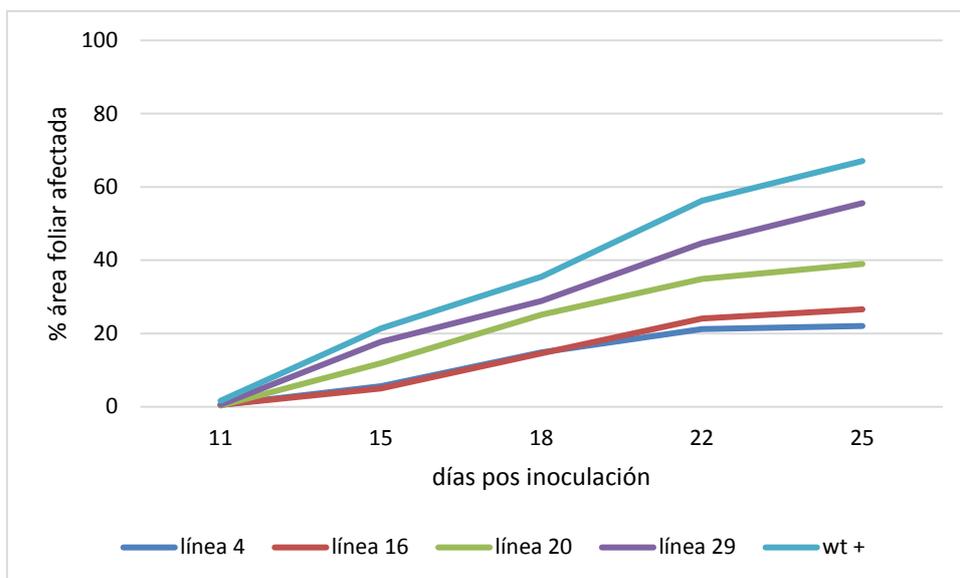


Figura 7: Porcentaje de área foliar afectada (promedio tres hojas inoculadas) según días post inoculación con Xv.

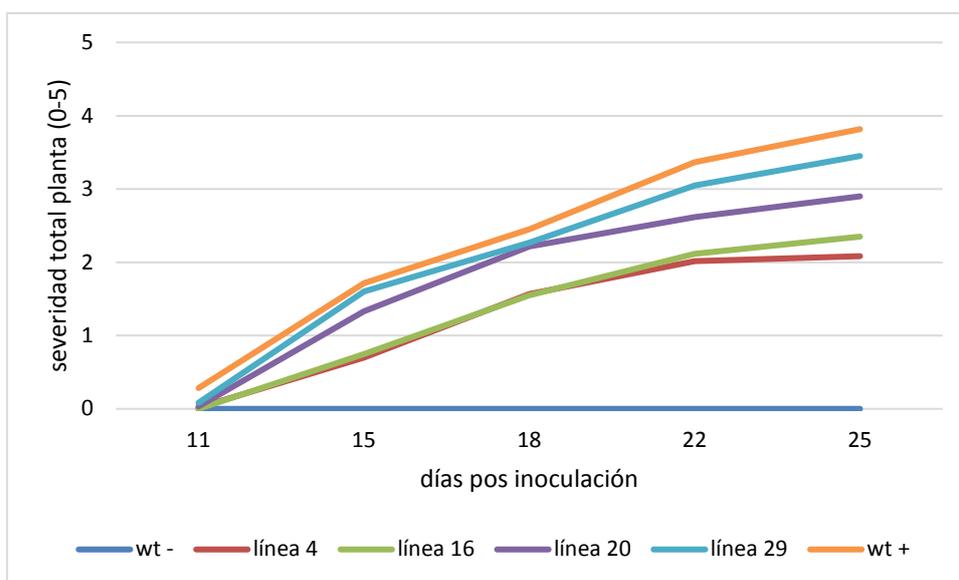


Figura 8: Severidad considerando toda la planta en función de días pos inoculación.

## Conclusiones y perspectivas a futuro

En los ensayos realizados con Cmm se observa que a medida que se avanza en las generaciones de autopolinización, la respuesta de las plantas transformadas frente a este patógeno bacteriano se va haciendo más estable. Si bien no se ha logrado una resistencia completa a Cmm, resulta interesante el aumento en la sobrevivencia. En cuanto a los ensayos realizados con Xv, también se observa un efecto de la transformación con el gen efr respecto a los controles, observándose un menor porcentaje de hoja afectada.

Estos resultados son interesantes a la hora de pensar en el mejoramiento genético orientado a minimizar el impacto de estas enfermedades. Existen otras experiencias del uso del receptor EFR como herramienta contra infecciones provocadas por bacterias del género *Xanthomonas* que han llegado a resultados similares a los que aquí se presentan (Lacombe et al., 2010). Sin embargo, es la primera vez que se somete a este tipo de plantas modificadas a ensayos de desafío contra Cmm. Se continuará evaluando esta herramienta con generaciones subsiguientes de manera de tener un caudal mayor de información que permita concluir la utilidad de estas variedades para el control o al menos la minimización del impacto del cancro bacteriano a nivel de campo.

## Referencias

- Blancard, D. (1992). Enfermedades del tomate. Observar, identificar, luchar. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 212 p.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.
- Boschi, F., Schwartzman, C., Murchio, S., Ferreira, V., Siri, M. I., Galván, G. A., et al. (2017). Enhanced Bacterial Wilt Resistance in Potato Through Expression of Arabidopsis EFR and Introgression of Quantitative Resistance from *Solanum commersonii*. *Front. Plant Sci.* 8, 1642. doi:10.3389/fpls.2017.01642.
- Dalla Rizza, M. Murchio, S., Walasek, W., Boschi, F., Maidana, M.; Schwartzman, C., Giménez, G., Maeso, D. (2015). Buscando nuevas herramientas para controlar un viejo enemigo: empleo del receptor EFR en tomate para el control de *Clavibacter Michiganensis* subsp *Michiganensis*. En: Resultados Experimentales en sanidad de tomate y morrón, Jornada de divulgación. INIA, 2015. p. 17-23 (Serie Actividades de Difusión ; 756).
- Gitaitis, R. (1991). Bacterial canker. in: Compendium of Tomato Diseases. 2nd Ed. J. B. Jones, J. P. Jones, R. E. Stall, and T. A. Zitter, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.

Jones JB. (1991). Bacterial spot. En: Jones JB, Jones JP, Stall RE. (Eds.). Compendium of tomato diseases. St. Paul, Minnesota: APS Press.

Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H. P., et al. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol.* 28, 365–369. doi:10.1038/nbt.1613.

Mello SCM, Takatsu A, Lopes CA. (1997). Escala diagramática para avaliação da manchabacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 22: 447-448.

## TECNOLOGÍAS ALTERNATIVAS PARA EL MANEJO DE MOSCA BLANCA EN TOMATE BAJO INVERNADERO

**Evaluación de la aplicación de aceites esenciales para el control de mosca blanca en tomate.**

**Estudio de compatibilidad *in vitro* de los aceites esenciales con LECAFOL®.**

Uno de los principales problemas de la producción hortícola es la incidencia de insectos plaga. En particular la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* es una plaga de gran importancia económica para el cultivo del tomate en nuestro país, afectando la calidad de los frutos y la productividad, determinando en general el empleo de insecticidas químicos como método de control.

Sin embargo, el uso de ese tipo de productos no es sostenible en el largo plazo, debido al desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las plagas y a los efectos adversos ocasionados en el ecosistema, como ser: contaminación del suelo y aguas subterráneas; interrupción del control biológico natural y polinización; y la posibilidad de toxicidad aguda y/o crónica en el ser humano, tanto en los aplicadores de los plaguicidas como en los consumidores finales de los productos agrícolas.

Por esto existe actualmente una tendencia, incluso en producción convencional, al uso de alternativas a los plaguicidas sintéticos, como parte de esquemas de Manejo Integrado de Plagas. En este sentido, la sección de Protección Vegetal de INIA-LB en colaboración con el Laboratorio de Ecología Química (LEQ) de la Facultad de Química se encuentra trabajando en el desarrollo de tecnologías alternativas al control químico para el control de la mosca blanca en sistemas de producción de tomate bajo invernadero.

Los aceites esenciales (AE) han sido fuente de potenciales plaguicidas botánicos en el pasado. Son considerados menos tóxicos dado su origen natural y su baja persistencia en el ambiente. En este trabajo se ha estudiado la posibilidad de utilizar los AE de chirca (*Eupatorium buniifolium*) y de ajeno (*Artemisia absinthium*) como bio-controladores de la mosca blanca.

Se resumen aquí las principales actividades desarrolladas y resultados obtenidos en uno de los componentes del proyecto institucional llevado a cabo por INIA-LB y el LEQ:

- Proyecto “Tecnologías alternativas para el manejo de plagas y enfermedades en cultivos hortícolas bajo invernadero y frutales”
- Componente “Manejo de insectos plaga en producción bajo invernadero a través de métodos alternativos”.



## EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE MOSCA BLANCA EN TOMATE

Umpiérrez, M.L.<sup>1</sup>; Amorós, M.E.<sup>1</sup>; Fernández, A.<sup>2</sup>; Walasek, W.<sup>2</sup>; Paullier, J.<sup>2</sup>; Rossini, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo-Uruguay.

<sup>2</sup> INIA Las Brujas, Canelones-Uruguay.

Mail de correspondencia: [mlumpierr@fq.edu.uy](mailto:mlumpierr@fq.edu.uy)

**Palabras clave:** plaguicida botánico, repente, actividad insecticida, fitotoxicidad

### Introducción

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de compuestos volátiles extraídos de las plantas; se utilizan desde la antigüedad y en las últimas décadas han sido objeto de muchos estudios ya que se consideran una alternativa posible al uso de los agroquímicos convencionales. Por su origen natural poseen una baja persistencia en el ambiente que los hace menos tóxicos para los organismos benéficos y enemigos naturales (Isman *et al.*, 2006).

Existen reportes de actividad anti-insecto<sup>1</sup> y anti-fúngica de AE provenientes de diversas familias botánicas, entre ellas la familia Asteraceae resulta interesante. De esta familia se eligieron dos especies para comenzar con esta línea de investigación: *Artemisia absinthium* y *Eupatorium buniifolium*.

*A. absinthium* (Figura 1a), cuyo nombre común es ajenjo, es una especie cosmopolita introducida en nuestro país que ha sido ampliamente estudiada. Se ha reportado su actividad anti-insecto: actividad anti-alimentaria (frente a lepidópteros y hemípteros) y actividad insecticida (frente a plagas de silos) (Martin *et al.*, 2011; Derwich *et al.*, 2009); y también hay reportes sobre la actividad anti-fúngica de AE pertenecientes a este género frente a diferentes hongos (Kordali *et al.*, 2005a; 2005b). *E. buniifolium* (Figura 1b), comúnmente conocida como chirca, es una planta nativa que se considera maleza y a diferencia del ajenjo no tiene valor comercial. Se han descrito algunas actividades anti-insecto para esta especie como inhibición de asentamiento de áfidos, repelencia de mosquitos y actividad acaricida (Umpiérrez *et al.*, 2013; Sosa *et al.*, 2012; Gleiser *et al.*, 2010).



Figura 1: (a) *A. absinthium*, ajenjo. (b) *E. buniifolium*, chirca

La composición química del AE de ajenjo ha sido muy estudiada, constatándose la existencia de varios quimiotipos (variación de los metabolitos secundarios dentro de la misma especie botánica independientemente de las condiciones de crecimiento) distintos de ajenjo con

---

<sup>1</sup> El término anti-insecto incluye actividades de repelencia, deterrenia de ingesta y mortalidad de los insectos.

diferente actividad biológica. Estos quimiotipos incluyen los tipos puros ricos en (Z)-epoxi-ocimeno, acetato de sabinilo y  $\beta$ -tujona; y los mixtos que contienen mezclas de estos terpenos y también (Z)-epoxi-ocimeno y acetato de crisantemilo (Figura 2) (Chialva *et al.*, 1983). Para el caso del AE con el que se trabajó los monoterpenos oxigenados fueron los mayoritarios siendo el componente principal la  $\beta$ -tujona ( $56 \pm 2\%$ ) (Umpiérrez *et al.*, 2012) por lo que pertenecería al quimiotipo tujona.

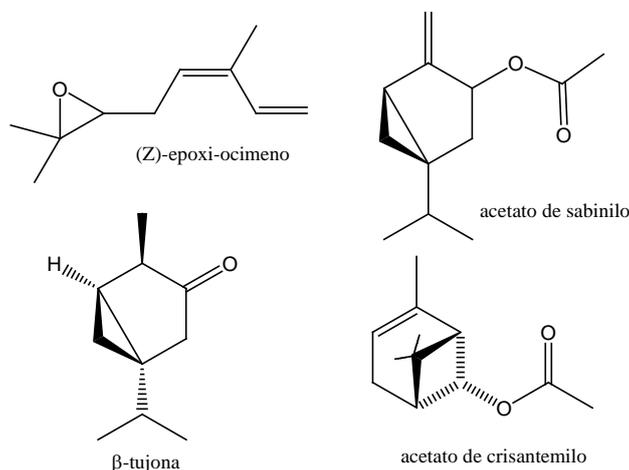


Figura 2: Estructuras de los compuestos químicos que caracterizan los quimiotipos de ajeno

La composición del AE de chirca también ha sido estudiada y reportada por el LEQ (Umpiérrez *et al.*, 2013) coincidiendo con la reportada previamente por Lorenzo *et al.* (2005) para plantas de Uruguay. Los compuestos mayoritarios fueron los hidrocarburos terpénicos con el  $\alpha$ -pineno como componente principal (Figura 3). Sin embargo, esta composición resultó diferente de la reportada en Argentina (Ruffinengo *et al.*, 2005), lo que sugeriría que para esta especie también podrían existir quimiotipos. Basado en esto el LEQ está realizando un análisis exhaustivo sobre muestras de chirca colectadas en diferentes localidades del país y épocas del año.

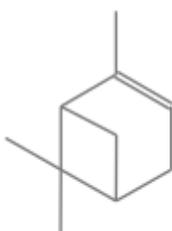


Figura 3: Estructura del  $\alpha$ -pineno, compuesto mayoritario del AE de chirca colectado para este estudio.

Además de la composición química de estos AE, se ha demostrado la actividad de los mismos frente a la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* en bioensayos de laboratorio, estudiando también su inocuidad frente a semillas de tomate y organismos benéficos como lo son las abejas (Umpiérrez *et al.* 2012; 2017). En esos ensayos se demostró que a las dosis necesarias para controlar a la mosca blanca no se afectaría la germinación de las semillas ni ocurriría mortalidad de abejas en las condiciones testadas.

Dado lo anterior es que en este trabajo se planteó como **objetivo general** el continuar con los ensayos de los AE de chirca y ajeno frente a mosca blanca en una mayor escala y estudiar su inocuidad sobre plantas de tomate en crecimiento.

### Objetivos específicos

1. Estudiar la capacidad de deterrencia de ingesta de los AE frente a adultos de mosca blanca
2. Evaluar la acción de los AE sobre estadios inmaduros y adultos de mosca blanca en plantines
3. Evaluar la actividad de los AE frente a poblaciones de mosca blanca sobre plantas de tomate en macrotúneles experimentales
4. Evaluar la inocuidad de los AE en plantas de tomate

### Metodología

#### Obtención de los AE

Las dos especies vegetales fueron colectadas a campo. En el caso de la chirca se realizaron diferentes colectas en las cercanías de la Estación Experimental Las Brujas. Para el ajeno se instaló un cuadro de plantas en la Estación (Figura 4) de manera de asegurarse de trabajar siempre con un mismo quimiotipo. Las plantas se obtuvieron por propagación vegetativa en el Laboratorio de Biotecnología de INIA (Figura 4)<sup>2</sup>, partiendo de un material vegetal perteneciente al LEQ con actividad insecticida y anti-fúngica probada.



Figura 4: Pasos de la propagación vegetativa del ajeno

La extracción de los AE se realizó a partir de material vegetal entero y oreado mediante destilación por arrastre con vapor de agua utilizando destilador de tipo alambique en las instalaciones de la Estación Experimental (Figura 5)<sup>3</sup>. Los AE obtenidos fueron secados con sulfato de magnesio anhidro y almacenados en heladera (aprox. 4°C) en frascos de vidrio color ámbar. Los AE obtenidos en las diferentes destilaciones fueron unificados en un solo lote para los estudios de actividad.

<sup>2</sup> La multiplicación estuvo a cargo de la Ing. Agr. Alicia Castillo.

<sup>3</sup> La extracción estuvo a cargo del Ing. Agr. Juan José Villamil



Figura 5: Destilador tipo alambique utilizado para obtener los AE

### Cría de mosca blanca

Se estableció una cría de mosca blanca en un invernáculo de vidrio pequeño perteneciente a la Estación. La misma fue iniciada a partir de hojas de tomate infestadas con los estadios inmaduros del insecto, que fueron colectadas en cultivos de tomate protegidos localizados en las cercanías de la Estación. Las hojas fueron colocadas sobre plantas de tomate sanas y se fueron agregando más plantas a medida que era necesario<sup>4</sup>.

### Ensayo anti-alimentario

Se comenzó el estudio de la adaptación de la metodología propuesta por Boina *et al.* (2009) para la evaluación de la capacidad anti-alimentaria de los AE de chirca y ajeno frente a mosca blanca en hojas de tomate. Este trabajo se reportó para el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*, perteneciente al mismo orden que *T. vaporariorum* (Hemiptera). Estos autores proponen una técnica de evaluación indirecta, donde se contabilizan los desechos generados por la alimentación.

Se pulverizaron hojas de tomate (con pulverizador manual, 2 disparos por hoja) con 250  $\mu$ L del producto a testar. Las hojas se cortaron en discos que se colocaron con su cara adaxial en contacto con agar al 2%, sobre la base de placas de Petri. En la tapa de cada placa se colocó un disco de papel de filtro cubriendo la totalidad del área (Figura 6a).

Se evaluaron los AE de ajeno y chirca en agua-tween en una curva de dosis: 0.1, 1 y 5 y 30 mg/mL. Se liberaron 10 adultos de mosca por placa, los que se recolectaron de la cría en un pequeño tubo de vidrio que se enfrió por 1 minuto en freezer a  $-4^{\circ}\text{C}$  inmediatamente antes de la liberación. Las placas se mantuvieron invertidas (Figura 6b) por 24 h a  $24^{\circ}\text{C}$  y un fotoperíodo de 16:8 (L:O). Las gotas de miecilla excretadas luego del periodo de duración del ensayo se contabilizaron previa tinción con ninhidrina (Sigma-Aldrich) por inmersión de los papeles de filtro en una solución al 1% (m/v en acetona) (Figura 6c).

---

<sup>4</sup> El mantenimiento de la cría estuvo a cargo de Alfredo Fernández.



Figura 6. Ensayo de actividad anti-alimentaria de los AE frente a adultos de mosca blanca. (a) Discos de hojas de tomate colocados con su cara adaxial sobre la base de una placa de Petri con agar y discos de papel de filtro en la tapa de la placa. (b) Placas con adultos de mosca blanca que se incuban invertidas. (c) Papeles de filtro con los desechos de la alimentación que se ven como gotas teñidas con ninhidrina

#### Ensayo de acción de los AE sobre estadios inmaduros de mosca blanca en plantines de tomate

Para estos ensayos se adaptó la metodología propuesta por Von Elling *et al.* (2002). Se seleccionaron plantines de tomate en macetas de entre 3 y 5 semanas de edad, infestados con ninfas del último estadio de mosca blanca (ninfas 4 de aquí en más, denominadas pupas en algunos trabajos) (al menos 500 ninfas 4 por tratamiento). Se pulverizaron los plantines con los tratamientos: agua-tween (2%) (testigo), AE de ajeno (3% emulsionado en agua-tween) y AE de chirca (3% emulsionado en agua-tween). Las pulverizaciones se realizaron con asperjadores manuales (PULMIC RAPTOR 1, 1L), girando la planta 4 veces y realizando 3 disparos en cada una de las 4 posiciones, para producir finas gotas que cubrieran el follaje (10 mL por planta). Los plantines se mantuvieron en laboratorio a  $22 \pm 5^\circ\text{C}$ . Se evaluaron 6 hojas de cada plantín contabilizando ninfas 4 emergidas y no emergidas cada 48 h, hasta llegar a un porcentaje de emergencia mayor al 80% en el testigo.

Se realizaron 9 repeticiones por tratamiento en 3 fechas de ensayos (cada plantín se consideró una repetición y cada fecha un bloque). Se analizó el porcentaje de emergencia de ninfas 4 al finalizar el ensayo. Para esto se sumaron la totalidad de ninfas 4 emergidas y no emergidas en las 6 hojas de cada plantín. La proporción de ninfas 4 emergidas se analizó mediante un Modelo Lineal Generalizado (GLM) (distribución binomial, función de enlace logit) y las medias se separaron por un test de Tukey Kramer  $p < 0.05$ . Se utilizó el paquete estadístico R.

#### Ensayo de actividad insecticida de los AE sobre adultos de mosca blanca en plantines de tomate

Se seleccionaron plantines de tomate (en macetas) de entre 3 y 5 semanas de edad, sin infestación. Se pulverizaron los plantines con los mismos tratamientos que se aplicaron a los estadios inmaduros. Una vez seco el vehículo se colocaron las plantas dentro de recipientes plásticos transparentes (20 x 20 x 25 cm) cubiertos con voile (un plantín por recipiente). Se liberaron en cada recipiente 30 adultos de mosca blanca provenientes de la cría. Los recipientes se mantuvieron en laboratorio a  $22 \pm 5^\circ\text{C}$ . A las 48 h de la aplicación se contó el total de adultos vivos y muertos sobre cada plantín.

Se realizaron 9 repeticiones por tratamiento en 3 fechas de ensayo (cada recipiente se consideró una repetición y cada fecha un bloque). La proporción de adultos muertos se analizó

mediante un GLM (distribución binomial, función de enlace logit) y las medias se separaron por un test de Tukey Kramer  $p < 0.05$  utilizando el paquete estadístico R.

#### Ensayo de actividad insecticida en invernáculo

Para este ensayo se utilizó un invernáculo de nylon que fue dividido en 4 secciones. En cada sección se colocaron 18 plantas de tomate en macetas, separadas en 3 filas (Figura 7). Se realizaron liberaciones semanales de moscas blancas provenientes de la cría hasta lograr infestar las plantas.



Figura 7: Aplicación de los tratamientos en el invernáculo dividido por nylon en diferentes secciones

A cada sección se le adjudicó un tratamiento y se realizaron 4 aplicaciones durante el período de ensayo. La primera aplicación se realizó con mochila manual y las otras 3 con turbo, teniendo un gasto promedio de 815 mL/sección en cada aplicación. Los tratamientos fueron en las 3 primeras aplicaciones: agua-tween (2%) (testigo), AE de ajeno (3% en agua-tween), AE de chirca (3% en agua-tween) y el control químico (acetamiprid, Acelan®, 0.075% en agua). En la última aplicación los AE se prepararon al 4%. Se registró diariamente la temperatura y humedad en cada sección.

Se evaluó la población de estadios inmaduros y adultos a las 48 h de aplicados los tratamientos y luego semanalmente examinando una hoja de cada nivel de inspección (zona superior, medio e inferior) para todas las plantas. El grado de infestación de las plantas con mosca blanca fue evaluado a través de tres variables (Paullier & Folch, 2012):

- Nº adultos: número de adultos de mosca blanca sobre las hojas
- % Incidencia: porcentaje de folíolos con presencia de ninfas de mosca blanca
- Severidad: grado de cobertura del envés del folíolo con ninfas de mosca blanca. La severidad se midió utilizando una escala de 1 a 4, indicando 1 ausencia de ninfas en la superficie, 2 menos de la cuarta parte del folíolo cubierto, 3 entre  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{3}{4}$  de la superficie del folíolo cubierto y 4 más de tres cuartas partes del folíolo con ninfas.

#### Evaluación de la efectividad de los AE frente a mosca blanca en macrotúneles experimentales

La evaluación de la actividad insecticida de los AE contra la mosca blanca en macrotúneles experimentales comprendió las siguientes etapas:

a) En la Estación se armaron macrotúneles experimentales de 35 m<sup>2</sup>, con dos canteros de 20 plantas de tomate variedad Ceta de 20 cm de altura cada uno (Figura 8).



Figura 8: Macrotúneles experimentales donde se aplicaron los tratamientos

b) Infestación controlada con mosca blanca de las plantas de tomate de los macrotúneles. La infestación se realizó colocando 2 plantas con moscas provenientes de la cría por macrotúnel. Una vez que la población de moscas se estableció en el cultivo (se observaron ninfas de la siguiente generación) se evaluó la incidencia inicial antes de aplicar los tratamientos.

c) Tratamientos:

- Testigo: agua-Tween (2%)
- AE de chirca en agua-Tween
- AE de ajeno en agua-Tween
- Control positivo: insecticida (Acetamiprid aplicado según etiqueta)

La aplicación de los tratamientos se realizó con máquina mochila a motor asperjando a punto de goteo. Cada tratamiento se aplicó a un macrotúnel. El ensayo se realizó en 3 temporadas de otoño: 2014, 2015 y 2016. En 2014, los AE se aplicaron a una concentración de 1.5% en la primera aplicación incrementando a 3% en las dos aplicaciones siguientes. En 2015 se realizó una única aplicación de los tratamientos: un macrotúnel fue tratado con el testigo y uno con el control químico, a dos macrotúneles se les aplicaron los AE al 3% y a los otros dos se les aplicaron los AE al 4.5%. En 2016 también se realizó una única aplicación a cada macrotúnel. Los AE se aplicaron al 3% y al 4%.

d) Evaluaciones del ensayo: se realizaron inspecciones visuales de las plantas (N=10 para cada macrotúnel) a las 48 h de aplicados los tratamientos y luego una vez por semana. Las observaciones se realizaron a 3 niveles: zona superior, medio e inferior. La efectividad de los AE en el control de mosca blanca se evaluó a través de las tres variables descriptas previamente: N° adultos, % Incidencia y Severidad.

Los datos fueron analizados a través de Modelo Lineal General utilizando el paquete estadístico Minitab 17.0.

#### Evaluación de la inocuidad de los AE sobre plantas de tomate

Conjuntamente con la evaluación de la efectividad de los AE para el control de mosca blanca, tanto en plantines como en invernáculo y macrotúneles se evaluó la posible existencia de toxicidad de los AE sobre las plantas de tomate. La fitotoxicidad de cada uno de los AE emulsionados en agua-Tween 20 se comparó contra el testigo, a través del registro del grado de necrosis de las hojas (al aplicar los tratamientos y durante todo el ensayo) y el rendimiento

de la cosecha que fue evaluado para el ensayo en macrotúneles. Los resultados fueron analizados por  $\chi^2$  utilizando el paquete estadístico Minitab 17.0.

## Resultados

### Ensayo anti-alimentario

No se observaron diferencias entre gotas/adulto vivo a las 24 h para ningún tratamiento. Este resultado no permite asegurar que los tratamientos no afectan la alimentación de los adultos ya que no se logró obtener un control positivo satisfactorio, por lo que la técnica propuesta podría no ser la más adecuada para este sistema.

### Ensayo de la acción de los AE sobre estadios inmaduros de mosca blanca

Los resultados mostraron porcentajes de emergencia altos para todos los tratamientos, superiores al 80% (Gráfico 1). Sin embargo, se observa que la emergencia de adultos en los plantines tratados con el AE de chirca fue significativamente menor ( $p < 0.05$ , Gráfico 1).

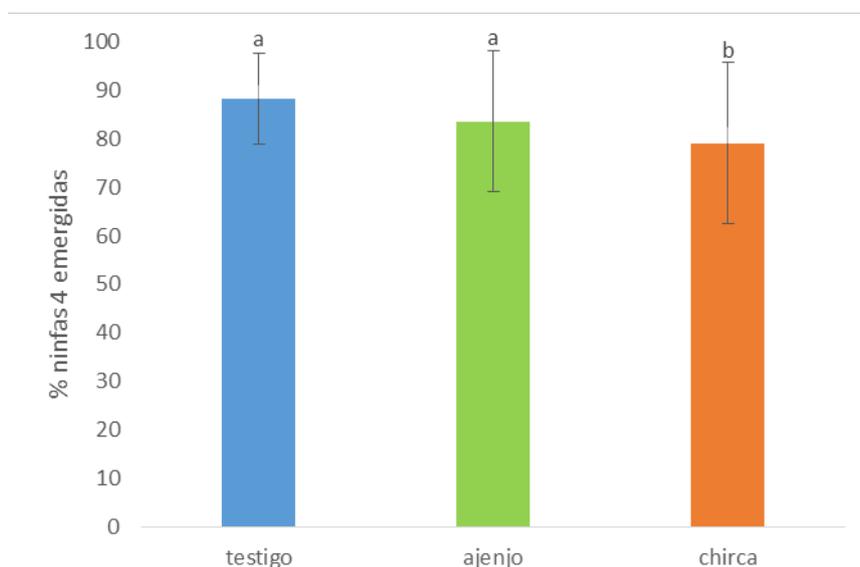


Gráfico 1: Acción de los AE sobre la emergencia de las ninfas 4 de mosca blanca en plantines. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de ninfas 4 emergidas al finalizar el experimento  $\pm$  desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas (GLM, Tukey  $p < 0.05$ ).

Estos resultados indicarían que, si bien los AE no tendrían un efecto drástico sobre las ninfas 4 de mosca blanca, el AE de chirca al 3% podría llegar a contribuir con la disminución de poblaciones al reducir la emergencia de adultos.

### Ensayo de actividad insecticida de los AE sobre adultos de mosca blanca en plantines

Los resultados mostraron un porcentaje significativamente mayor de adultos muertos en los plantines tratados que en el testigo (Gráfico 2) y no se observaron diferencias significativas entre los dos AE (GLM, Tukey  $p < 0.05$ ). Los promedios de los porcentajes de mortalidad no superaron el 50 % para ninguno de los dos aceites.

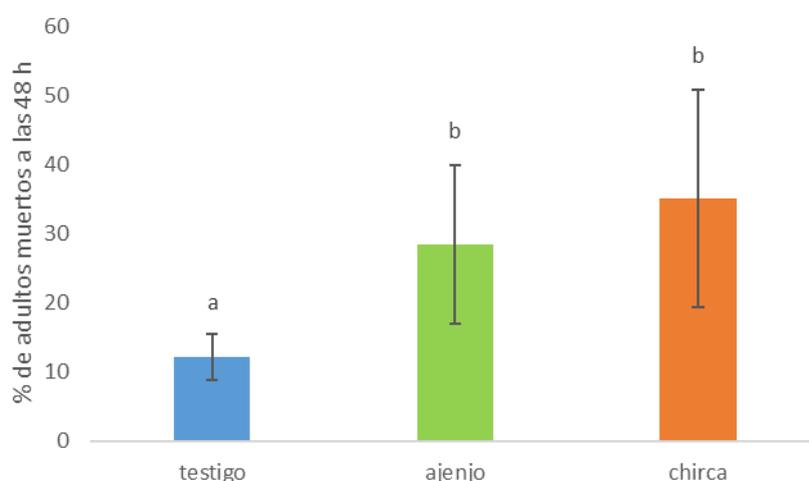


Grafico 2. Actividad insecticida de los AE sobre adultos de mosca blanca en plantines. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de adultos muertos a las 48 h post-aplicación  $\pm$  desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas (GLM, Tukey  $p < 0.05$ ).

#### Evaluación de la inocuidad de los AE sobre plantas de tomate

Los efectos fitotóxicos de los AE se evaluaron a través del registro de la necrosis de las hojas y el rendimiento de la cosecha que se registró únicamente para la temporada 1 en macrotúneles.

Tanto en los ensayos sobre plantines como en la primera aplicación de los AE en invernáculo se observó quemado y posterior necrosis de las hojas de tomate (Figura 9). Esto podría deberse a dos factores: uno es que las plantas presentaban mayoritariamente brotes y hojas jóvenes que serían más susceptibles a los tratamientos. El otro factor que podría explicar lo observado es que estos tratamientos fueron aplicados con asperjadores o mochilas manuales donde el tamaño de gota es grande y provocaría la acumulación de los productos en las hojas causando los efectos fitotóxicos.



Figura 9: Quemado de tejido joven por acumulación de AE y tamaño de gota grande

Durante las siguientes aplicaciones en invernáculo, así como en las temporadas 1, 2 y 3 en macrotúneles, cuando los AE se aplicaron al 3% sobre tejido maduro y con mochila turbo no se observó necrosis en ningún caso. Tampoco cuando la dosis fue aumentada al 4%. Sin embargo,

en los casos de aplicación al 4.5% sí se observó necrosis de hojas maduras sobre las zonas de acumulación del producto.

Para la temporada 1 de macrotúneles, experimento que fue continuado hasta la cosecha de tomate, se registró el peso y número de frutos cosechados (Tabla 1) como parámetros representativos del rendimiento de la cosecha.

Tabla 1: Rendimiento de la cosecha de las plantas de tomate al final del ensayo para cada tratamiento. Se expresa como el peso total de los frutos en Kg y el número de frutos cosechados.

Tratamiento	Temporada 1 macrotúneles	
	Peso (Kg)	Nº frutos
Chirca	11.6	81
Ajenjo	8.9	56
Testigo	11.6	79
Control químico	13.5	84

El análisis de contingencia para los tratamientos aplicados no mostró diferencias significativas ni en el peso ( $\chi^2 = 0.56$ ,  $P = 0.91$ ) ni en el número de frutos ( $\chi^2 = 3.6$ ,  $P = 0.31$ ). Como no se observó necrosis ni efectos en el rendimiento, se podría concluir que los AE aplicados en estas condiciones no poseen efectos fitotóxicos. Además, se observó, sin realizar un registro cuantitativo, que aquellas plantas que fueron tratadas con los AE presentaron una menor incidencia de enfermedades fúngicas que las plantas testigo.

#### Efectividad de los AE frente a mosca blanca en invernáculo y macrotúneles experimentales

- Incidencia de ninfas

Esta variable se comportó de forma similar para los dos tipos de ensayos y todas las temporadas. En el Gráfico 3 se representa el porcentaje de incidencia durante la temporada 1 de macrotúneles experimentales y se observa que no hubo diferencias significativas para ninguno de los tratamientos (ANOVA, GLM,  $P = 0.106$ ) (Gráfico 3). O sea que para esta variable los AE se comportaron de igual manera que el insecticida utilizado comúnmente para controlar a la mosca blanca.

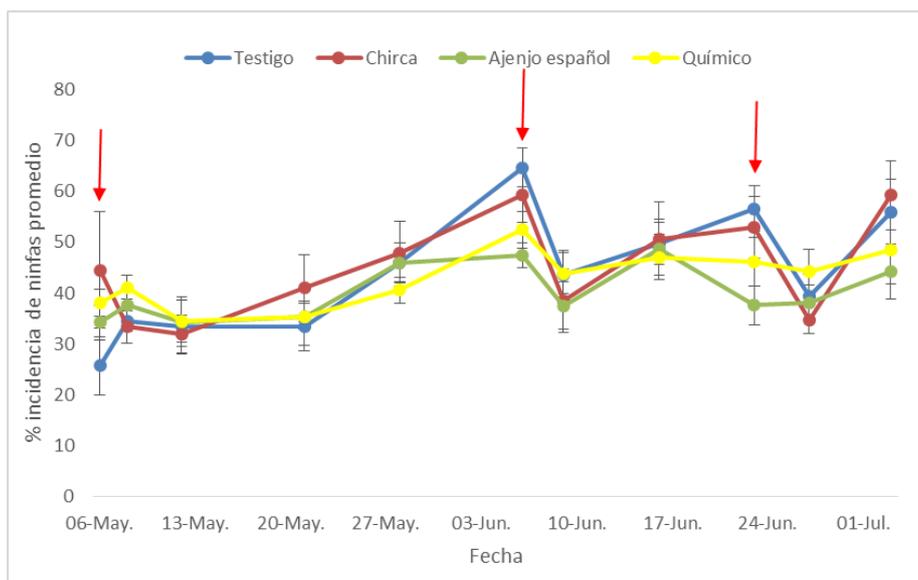


Gráfico 3: Promedio del porcentaje de Incidencia de ninfas durante todo el ensayo para cada tratamiento en la temporada 1. Las flechas rojas indican los momentos de las aplicaciones de los tratamientos.

- Severidad

En cuanto a la severidad (grado de cobertura del folíolo con ninfas) tampoco se observaron diferencias entre los tratamientos para ningún ensayo. En el Gráfico 4 se observa la representación de este parámetro para la temporada 1 (ANOVA, GLM, P=0.446).

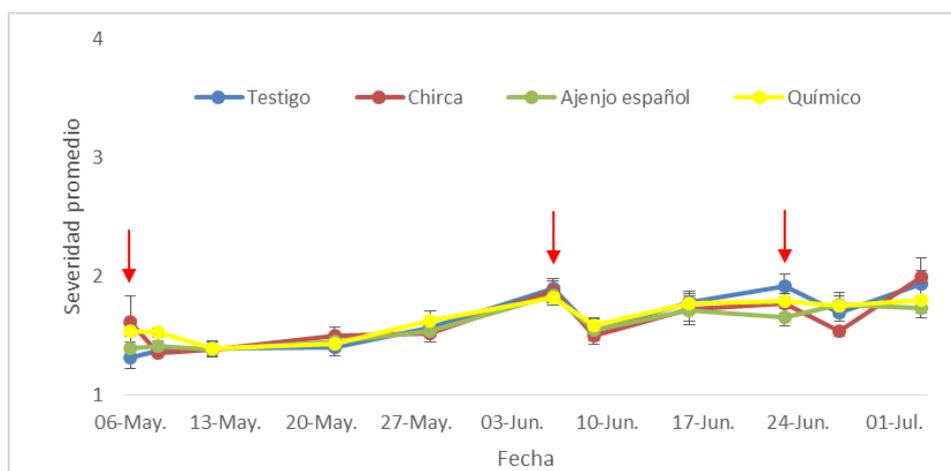


Gráfico 4: Severidad promedio para todos los tratamientos durante la duración del ensayo. Las flechas rojas indican los momentos de aplicación de los tratamientos.

- Número de adultos

Para la temporada 1 en macrotúneles se observan diferencias significativas globales entre los tratamientos para el número total (vivos + muertos) de adultos de mosca blanca (Gráfico 5, ANOVA, GLM, P=0.003). Las poblaciones de todos los macrotúneles variaron con el tiempo (P < 0.005), observándose una tendencia a la disminución de la población durante todo el ensayo para los tratamientos comparados con el control. Esta disminución fue significativa para los

tratamientos con el AE de chirca y para el control químico, siendo el efecto de estos tratamientos igual entre sí.

Como se observa en el Gráfico 5, luego de los momentos de aplicación (marcados con una flecha) hay un descenso en la población para todos los tratamientos, o sea que la aplicación de por sí provoca una disminución en el número de moscas independientemente del producto que se aplique.

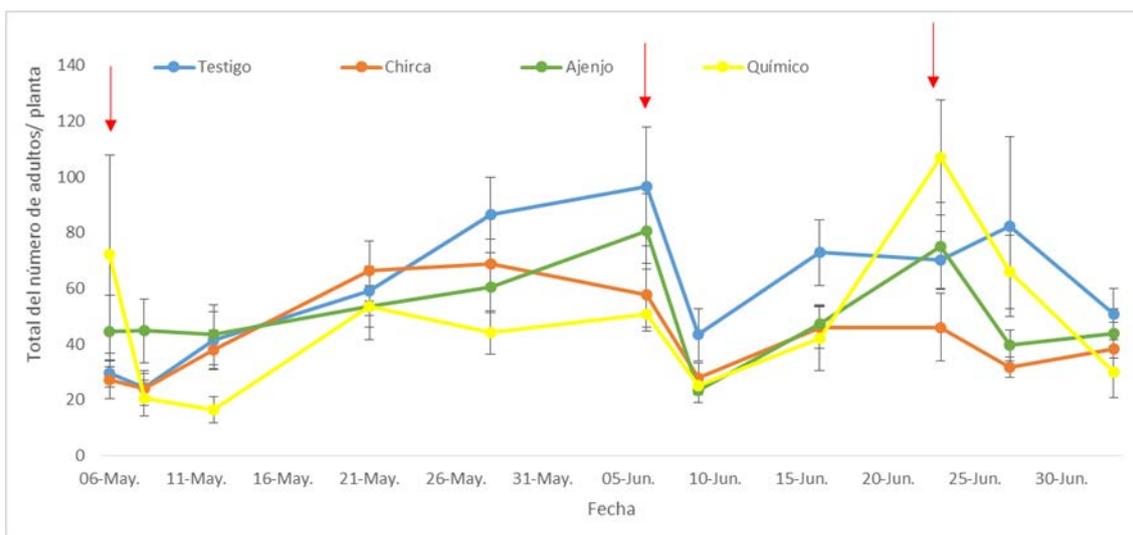


Gráfico 5: Promedio del total del número de adultos (vivos + muertos) por tratamiento durante toda la temporada 1. Las flechas indican los momentos de aplicación de los tratamientos.

Sin embargo, si se tienen en cuenta las moscas blancas que se habían asentado, se puede observar un efecto agudo después de la segunda aplicación de ambos AE ya que la proporción de moscas blancas muertas fue mayor en estas plantas que en las plantas testigo y el control químico (Gráfico 6, ANOVA, GLM,  $P < 0,005$  para el tratamiento, tiempo e interacción tratamiento x tiempo, Comparaciones por parejas de Tukey).

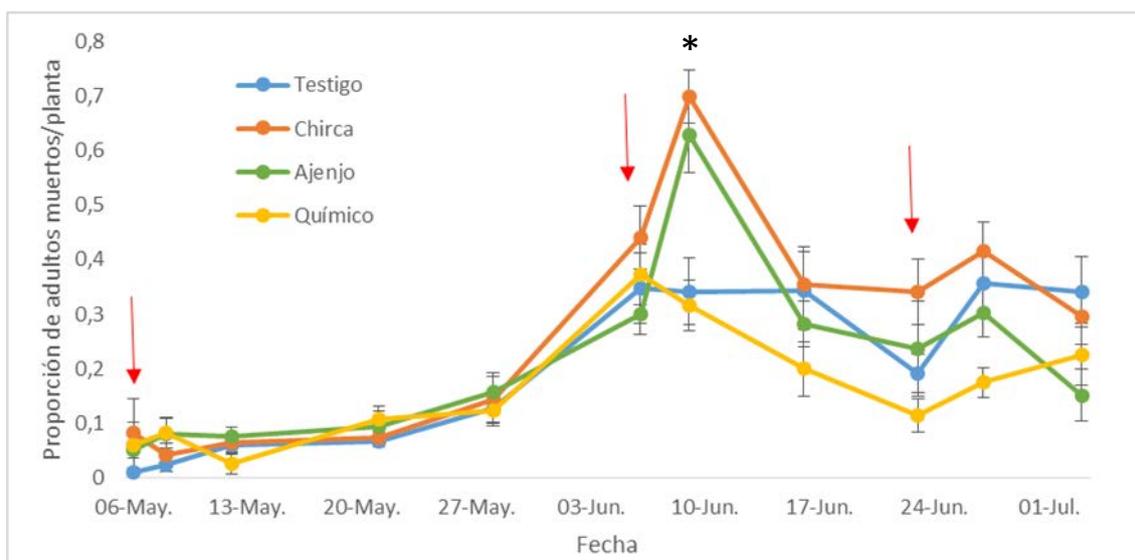


Gráfico 6: Proporción de moscas muertas promedio para cada tratamiento durante toda la temporada 1. Las flechas indican los momentos de aplicación. \* indica diferencias significativas.

Para la temporada 2, cuando observamos la proporción de adultos muertos, nuevamente encontramos diferencias significativas entre los tratamientos luego de la aplicación de los mismos y vemos que el efecto es mayor en aquellos macrotúneles donde los AE fueron aplicados al 4.5% (Gráfico 7, ANOVA, GLM,  $P= 0,001$  para los tratamientos,  $P < 0,0005$  para el tiempo,  $P= 0,081$  para la interacción tratamiento x tiempo). Globalmente, el AE de chirca aplicado al 3% tuvo el mismo efecto que el control químico.

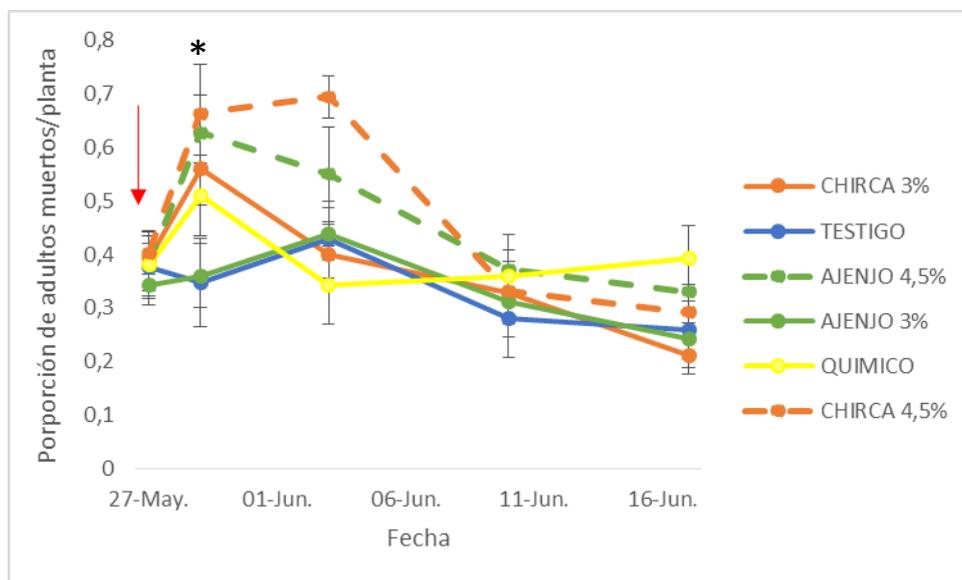


Gráfico 7: Proporción de moscas muertas promedio para cada tratamiento durante toda la temporada 2. La flecha indica el momento de aplicación de los tratamientos. \* indica diferencias significativas.

Si bien la actividad de los AE mejoró al aumentar la concentración de los mismos al 4.5%, dado que se observaron efectos fitotóxicos no sería recomendable utilizarlos a esa concentración. Por lo tanto, en la temporada 3 en macrotúneles y en el ensayo a escala más pequeña en invernáculo se volvieron a aplicar los AE al 3% y se agregaron los tratamientos con los AE al 4%.

En invernáculo los tratamientos con los AE al 3% no se diferenciaron del testigo como sí lo hizo el control químico, salvo cuando el AE de ajenjo se aplicó al 4% que se observó una proporción de adultos muertos mayor a la de los demás tratamientos (Gráfico 8, ANOVA, GLM,  $P < 0,0005$  para tratamiento, tiempo e interacción tratamiento x tiempo).

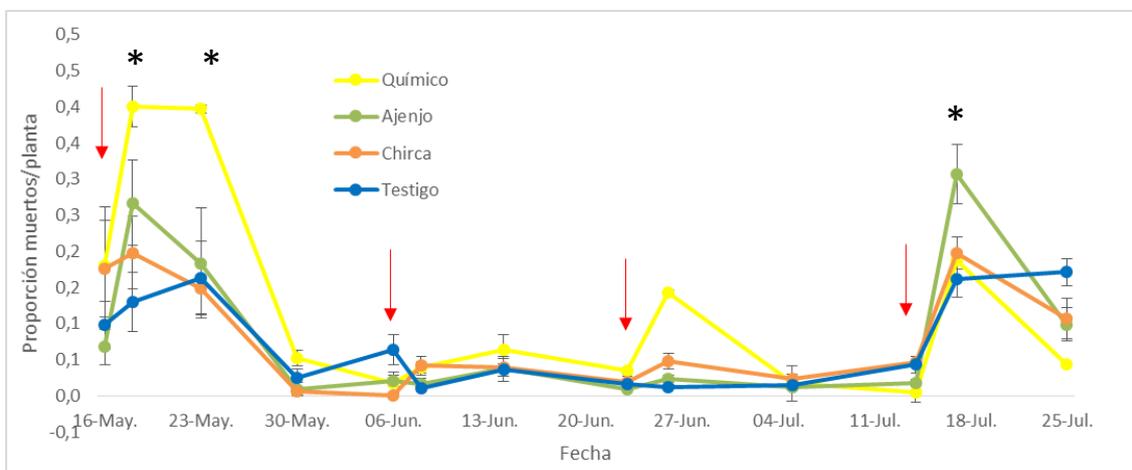


Gráfico 7: Proporción de moscas muertas promedio para cada tratamiento durante toda la temporada del ensayo realizado en invernáculo. Las flechas indican los momentos de aplicación de los tratamientos. \* indica diferencias significativas.

En la temporada 3, si se comparan las proporciones de muertos antes de la aplicación de los tratamientos (Gráfico 8, fecha 26 de abril) y después de la aplicación de los mismos (fecha 28 de abril) se observa que hay diferencias significativas entre los tratamientos y los mismos se agrupan según se muestra en el Gráfico 8 (ANOVA, GLM,  $P=0,024$ , Comparaciones por parejas de Tukey).

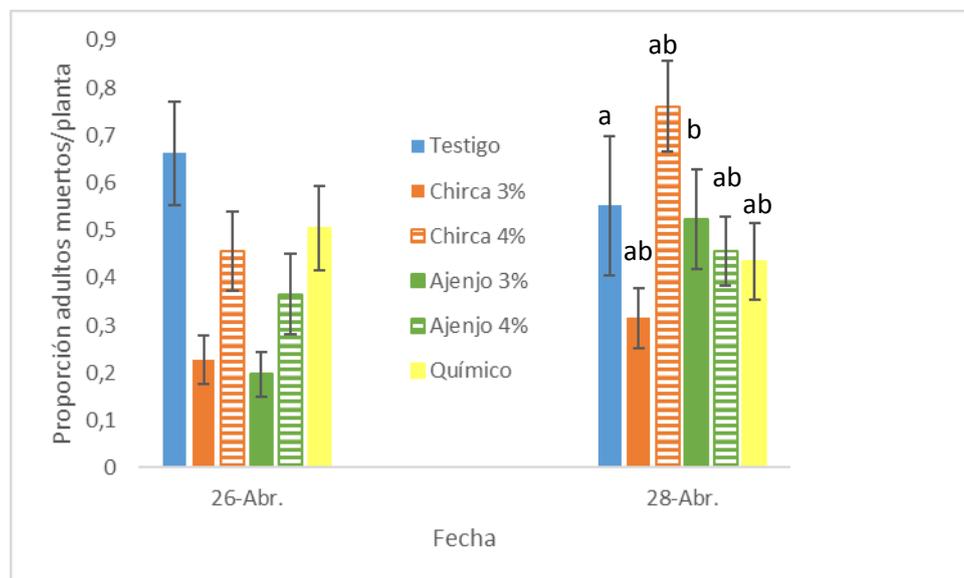


Gráfico 8: Proporción de moscas muertas promedio para cada tratamiento antes y después de la aplicación de los mismos. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

## Conclusiones

- No se logró estandarizar un ensayo para evaluar el efecto anti-alimentario de los AE frente a mosca blanca. Se propone como trabajo a futuro la evaluación de aceites minerales como posibles controles positivos y en caso de observar actividad con los mismos, ajustar las dosis de AE a testar.
- En el ensayo con plantines de tomate los AE de chirca y ajeno aplicados al 3% parecerían no afectar la emergencia de las ninfas 4. Sin embargo, en estas mismas condiciones se observa una mortalidad de adultos para ambos AE significativamente mayor que la del testigo.
- Cuando los AE son aplicados por asperjado, el tamaño de la gota resulta crítico para evitar la necrosis de las hojas de las plantas de tomate. Los brotes jóvenes resultan más susceptibles a este efecto.
- Los AE podrían aplicarse con mochila turbo en una concentración de hasta el 4% sin observar necrosidad en las plantas. Con los AE aplicados al 3% tampoco se altera el rendimiento de la cosecha.
- En cuanto a la incidencia y severidad de las ninfas de mosca blanca, todos los tratamientos, incluido el control químico que habitualmente se utiliza para controlar este insecto, se comportaron de la misma manera que el testigo, sin mostrar un efecto significativo en la reducción de estos parámetros.
- La aplicación de los AE al 3% aumentaría la proporción de adultos muertos encontrados en los macrotúneles. El efecto no parece mejorar cuando se aplican al 4% pero sí mejoraría al aplicarlos al 4.5%. Sin embargo, dado que a esa dosis se observaron signos de fitotoxicidad no sería recomendable utilizar los AE en esa dosis.
- La efectividad de control de los AE aplicados al 3% podría mejorarse si se combina con alguna otra medida de control.

## Referencias bibliográficas

- Boina DR, Onagbola EO, Salyani M, y Stelinski LL. 2009. Antifeedant and sublethal effects of imidacloprid on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Management Science*, 65: 870-877.
- Chialva, F., P. Liddle, and G. Doglia, Chemotaxonomy of wormwood (*Artemisia absinthium* L.). I. Composition of the essential oil of several chemotypes. *Eur Food Res Technol*, 1983. 176(5): p. 363-366.
- Derwich, E., Z. Benziane, and A. Bourkir, Chemical composition and insecticidal activity of essential oils of three plant *Artemisia* sp: *Artemisia herba-alba*, *Artemisia absinthium* and *Artemisia pontica* (Morocco). *Electron J Environ Agric Food Chem*, 2009. 8(11): p. 1202-1211.
- Gleiser, R.M., M.A. Bonino, and J.A. Zygodlo, Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) *Parasitol Res*, 2010. 108(1): p. 69-78.
- Isman, M.B., et al., Chapter 2 Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization, in *Advances in Phytomedicine*. 2006, Elsevier. p. 29-44.
- Kordali, S., et al., Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three turkish *Artemisia* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005a. 53: p. 1408-1416.

- Kordali, S., et al., Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005b. 53: p. 9452-9458.
- Lorenzo, D., et al., Application of Multidimensional Gas Chromatography to the Enantioselective Characterisation of the Essential Oil of *Eupatorium buniifolium* Hooker et Arnott. *Phytochemical Analysis*, 2005. 16: p. 39-44.
- Martin, L., et al., Comparative chemistry and insect antifeedant action of traditional (Clevenger and Soxhlet) and supercritical extracts (CO<sub>2</sub>) of two cultivated wormwood (*Artemisia absinthium* L.) populations. *Ind Crops Prod*, 2011. 34(3): p. 1615-1621.
- Paullier, J. and C. Folch, Primer insecticida biológico formulado en Uruguay. Nueva herramienta de control de la mosca blanca, in *Revista INIA*. 2012.
- Ruffinengo, S., et al., LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor* *J Econ Entomol*, 2005. 98(3): p. 651-655.
- Sosa, M.E., et al., Insecticidal and nematicidal essential oils from Argentinean *Eupatorium* and *Baccharis* spp. *Biochem Syst Ecol*, 2012. 43: p. 132-138.
- Umpiérrez, M.L., et al., Potential botanical pesticides from Asteraceae essential oils for tomato production: Activity against whiteflies, plants and bees. *Industrial Crops and Products*, 2017. 109: p. 686-692.
- Umpiérrez, M.L., et al., Essential oil from *Eupatorium buniifolium* leaves as potential varroacide. *Parasitol Res*, 2013.
- Umpiérrez, M.L., et al., Essential oils from Asteraceae as potential biocontrol tools for tomato pests and diseases. *Phytochemistry reviews*, 2012. 11(4): p. 339-350.
- Von Elling K, Borgemeister C, Sétamou M, y Poehling H. 2002. The effect of NeemAzal-T/S®, a commercial neem product, on different developmental stages of the common greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hom., Aleyrodidae). *Journal of Applied Entomology*, 126: 40-45.

## ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS ACEITES ESENCIALES CON LECAFOL®

Amorós, M.E.<sup>1</sup>; Umpiérrez, M.L.<sup>1</sup>; Paullier, J.2; Rossini, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo-Uruguay.

<sup>2</sup> INIA Las Brujas, Canelones-Uruguay.

Mail de correspondencia: [mlumpierr@fq.edu.uy](mailto:mlumpierr@fq.edu.uy)

**Palabras clave:** *Lecanicillium lecanii*, control biológico, insecticidas botánicos

### Introducción

La problemática sanitaria es una importante limitante tecnológica en la producción hortícola comercial. Como ya se mencionó, la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* es una plaga de gran importancia económica para el cultivo del tomate en nuestro país. Los plaguicidas de origen botánico como los aceites esenciales (AE) y el control biológico mediante hongos entomopatógenos resultan ser alternativas interesantes para el control de este insecto.

Los AE de *Artemisia absinthium* (ajenjo) y *Eupatorium buniifolium* (chirca) han demostrado ser potenciales controladores de dicho insecto (Sección "Evaluación de la aplicación de aceites esenciales para el control de mosca blanca en tomate).

Los hongos entomopatógenos son enemigos naturales que causan enfermedades a los insectos plaga. Estos microorganismos invaden el cuerpo del insecto ocasionándole la muerte. El uso de estos agentes microbianos para reducir las poblaciones y los efectos perjudiciales de la plaga, constituye un método de control biológico de gran valor por su alta inocuidad para la salud humana y el medio ambiente. LECAFOL® es el nombre comercial del insecticida biológico fabricado por LAGE y Cía, una formulación en polvo de aplicación foliar y de uso en cultivos bajo invernáculo. Una cepa de *Lecanicillium lecanii* es el ingrediente activo de este formulado. Este producto se ha probado como efectivo controlador de *T. vaporariorum* (Figura 1a y 1b) (Paullier & Folch, 2012).

Un Manejo Integrado de Plagas debe considerar la integración de diferentes medidas de control, por este motivo es relevante conocer la viabilidad de utilización conjunta de las diferentes estrategias. El **objetivo** de este trabajo fue la evaluación de la compatibilidad *in vitro* del desarrollo de *L. lecanii* frente a los vapores de los AE de chirca y ajeno.

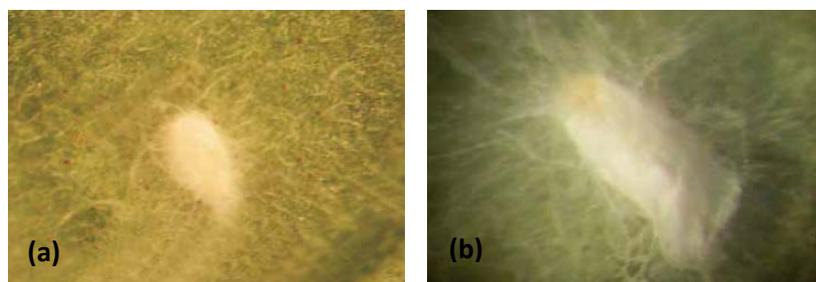


Figura 1: Ninfas (a) y adultos (b) de mosca blanca infectados por *L. lecanii*.

## Metodología

### Evaluación de inhibición de crecimiento de micelio por exposición a los vapores del AE

Se realizaron ensayos *in vitro* donde se evaluó el crecimiento de micelio del hongo expuesto a distintas concentraciones de volátiles de los AE. Los mismos fueron ejecutados en las instalaciones del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones de la Facultad de Química (UdelaR). El diseño del ensayo se basó en el trabajo de Alvarez-Castellanos *et al.* (2001).

Se utilizaron placas de Petri de plástico (9 cm de diámetro) con medio PDA (10 mL) que fueron inoculadas con el hongo por picadura en 8 puntos. Sobre las tapas de las placas se colocaron discos de papel de filtro estériles de 1 cm de diámetro (1 a 5 dependiendo de las dosis a ser aplicadas) impregnados con distintas cantidades del AE puro (tratamiento) o con agua destilada estéril (control). En un primer ensayo, los tratamientos consistieron en la aplicación de 1, 10, 25 y 50  $\mu\text{L}$  de AE de ajeno o chirca por placa. En el caso del AE de chirca, se realizó un segundo ensayo aumentando las dosis a 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{L}$  dado que para en el primer ensayo no se observó efecto. Se utilizaron los AE obtenidos como se detalla en la Sección “Evaluación de la aplicación de aceites esenciales para el control de mosca blanca en tomate”, de esta publicación.

Se realizaron 3 placas por tratamiento y cada placa se consideró una réplica (se promedió el diámetro de las 8 colonias de cada placa). Las placas se sellaron con Parafilm® M y se incubaron invertidas en estufa (22 °C, oscuridad) durante 6 días (Figura 2).

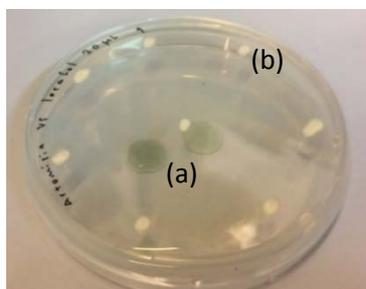


Figura 2: Diseño de bioensayo para la evaluación de la actividad de volátiles sobre *L. lecanii*, donde los tratamientos son aplicados en 2 papeles de filtro (a) sobre la tapa de la placa y el hongo es inoculado en 8 puntos sobre la base de la misma en medio PDA (b); las placas se incuban invertidas como muestra la figura.

Al finalizar el ensayo se midió con calibre (precisión, 0.05 mm) el diámetro de cada colonia (D) como variable indicativa del crecimiento micelial. Se calculó para cada colonia el Porcentaje de Inhibición (% IT) como:

$$\%IT = \frac{(\text{diámetro } C - \text{diámetro } T) * 100}{\text{diámetro } C}$$

A partir de estos datos se calcularon las concentraciones inhibitorias de AE necesarias para reducir en un 50 % el crecimiento micelial ( $CI_{50}$ ).

## Resultados

Los resultados mostraron que los volátiles a 50  $\mu\text{L}$  por placa del AE de ajeno inhibieron totalmente el crecimiento del hongo (Figuras 3a y 4a). En base al % IT (Figura 5) la  $CI_{50}$  calculada fue de 0.12 (0.11-0.13)  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . Umpiérrez *et al.* (2012) reportaron que la  $DL_{50}$  para los volátiles de este AE frente a *T. vaporariorum* es de 0.12 (0.09-0.14)  $\text{mg}/\text{cm}^3$ , por lo que a una concentración efectiva para controlar el 50 % de los adultos de mosca el crecimiento micelial de *L. lecanii* se podría ver afectado, disminuyendo la eficiencia de control del LECAFOL®.

Sin embargo, los volátiles de chirca no inhibieron el crecimiento del hongo en dosis 10 veces más altas (Figuras 3b y 4b), por lo que se puede considerar que este AE resultaría inactivo para *L. lecanii*. Los volátiles del AE de chirca fueron reportados como activos sobre adultos de mosca blanca, con una  $DL_{50}$  de 0.06 (0.02-0.11)  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . Por lo tanto, este AE podría ser potencialmente utilizado como una herramienta en el control de mosca en conjunto con el LECAFOL® sin perjudicar el desarrollo de micelio del hongo.

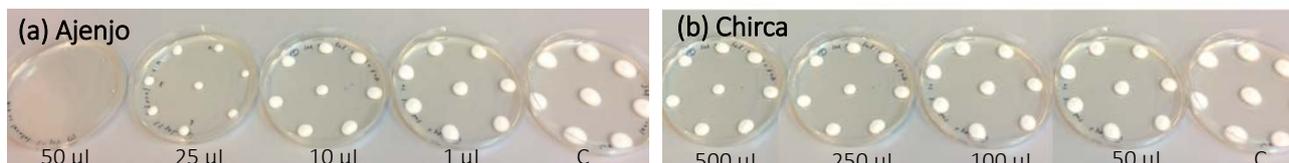


Figura 3: Evaluación de inhibición de crecimiento de micelio de *L. lecanii* por exposición a los vapores AE. Se muestran las placas inoculadas en 8 puntos, luego de 6 días de incubación. (a) *L. lecanii* expuesto a distintas concentraciones de AE de ajeno. (b) *L. lecanii* expuesto a distintas concentraciones de AE de chirca.

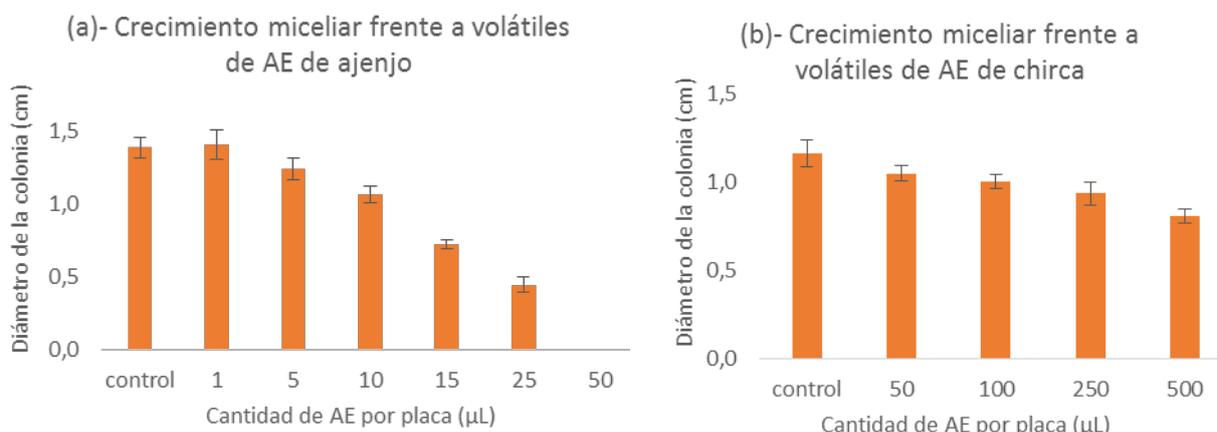


Figura 4 (a) y (b): Crecimiento de micelio (cm) de *L. lecanii* a los 6 días post-inoculación, frente a diferentes concentraciones de los AE de ajeno y chirca. Los resultados se muestran como el promedio del diámetro de las colonias  $\pm$  desviación estándar.

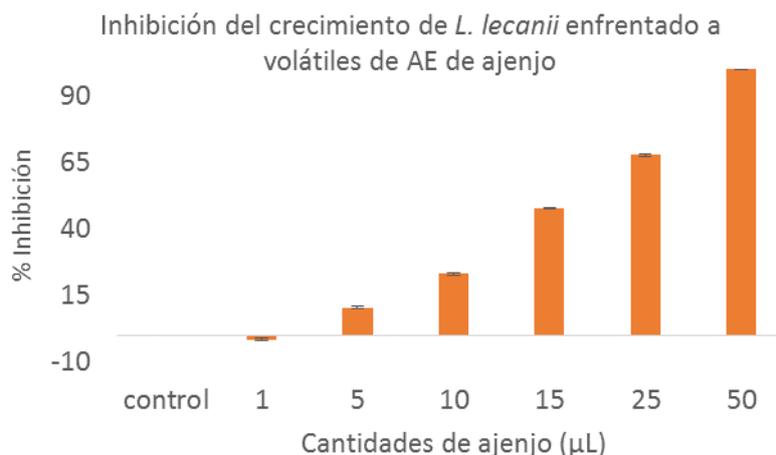


Figura 5: Porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio de *L. lecanii* generado por los volátiles del AE de ajeno.

### Conclusiones

- El AE de chirca podría ser utilizado como una herramienta en el control de mosca en conjunto con el LECAFOL® sin perjudicar el desarrollo de micelio del hongo.
- El AE de ajeno también podría ser utilizado en esquemas de manejo que contemplen los tiempos de crecimiento del hongo y la residualidad del AE.
- Como trabajo futuro deberán hacerse ensayos de compatibilidad por contacto directo del hongo con el AE y evaluar el efecto sobre la germinación de las esporas del mismo.

### Referencias bibliográficas

- Alvarez-Castellanos, P., C. Bishop, and M. Pascual-Villalobos, *Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (Chrysanthemum coronarium) against agricultural pathogens*. *Phytochemistry*, 2001. **57**: p. 99-102.
- Paullier, J. and C. Folch, *Primer insecticida biológico formulado en Uruguay. Nueva herramienta de control de la mosca blanca*. *Revista INIA* 2012. **30**: p. 36-38.
- Umpiérrez, M.L., et al., *Essential oils from Asteraceae as potential biocontrol tools for tomato pests and diseases*. *Phytochemistry reviews*, 2012. **11**(4): p. 339-350.

## ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE OIDIO EN CULTIVOS DE MORRÓN PROTEGIDOS QUE IMPLEMENTAN EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS

Leticia Rubio<sup>1</sup>, José Buenahora<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA)

[jbuenahora@inia.org.uy](mailto:jbuenahora@inia.org.uy), [lrubio@inia.org.uy](mailto:lrubio@inia.org.uy)

### Introducción

Actualmente los mercados tienden a exigir una producción racional y sustentable, que cuide el medio ambiente y genere productos saludables e inocuos para el consumidor. En este sentido, muchas regiones productivas en el mundo y en varios cultivos utilizan la estrategia del MIP para abordar los problemas sanitarios. En los últimos años, el área hortícola de Salto ha comenzado a transitar este camino implementando el control biológico de plagas, fundamentalmente en el cultivo de morrón bajo invernadero. En la actualidad se utilizan con éxito el ácaro depredador *Amblyseius swirskii* para el control de la mosca blanca *Bemisia tabaci*. No obstante, la inclusión de enemigos naturales en los sistemas productivos genera cambios que hacen necesario compatibilizar el manejo del invernadero, del cultivo y racionalizar el uso de los productos fitosanitarios empleados. En el cultivo de morrón el oidio (*Leveillula taurica*) es una de las principales enfermedades y requiere numerosas aplicaciones para su control. En el contexto del MIP, nuestro objetivo ha sido: evaluar la efectividad de distintos productos sobre el control de Oidio (*Leveillula taurica*) en el cultivo de morrón y su efecto sobre la población de enemigos naturales (*Amblyseius swirskii*).

### Materiales y métodos.

Los ensayos se desarrollaron en INIA Salto Grande y en un predio de producción, en cultivos de pimiento protegido, trasplantado en marzo, con una distancia entre filas de 1,6m y entre plantas de 0,25 m. En todos los casos hubo liberación de *Amblyseius swirskii* en la primera floración del cultivo. El diseño experimental fue de parcelas al azar, cada parcela estuvo conformada por 16 plantas (un cantero de 4mts, distancia entre plantas: 0.25m). Los tratamientos tuvieron 3 repeticiones. Las aplicaciones se realizaron con una mochila atomizadora. Las condiciones ambientales fueron registradas mediante un sensor Hobo. Se evaluó severidad de la enfermedad según el porcentaje de área foliar afectada estimado visualmente utilizando una escala (\*). Para evaluar el efecto de los productos sobre los enemigos naturales, en cada parcela se seleccionaron 5 plantas y de cada una se extrajo una hoja apical y una hoja de la zona media, y se realizó el conteo de formas móviles del ácaro bajo lupa binocular, en un círculo de 2,5cm de diámetro en el envés de las hojas. Los datos fueron analizados por el modelo GLM y ANOVA del programa estadístico Infostat.

(\*) Escala visual de 0 a 5, según porcentaje de oidio observado en la parcela:

0: ausencia de oidio, 1: 1-10% de oidio, 2: 11-25%, 3: 26-50%, 4: 51-75%, 5: >75%.

## 1. Efecto del agregado de adyuvantes a fungicidas utilizados para el control de oidio.

**Experimento 1.** Los tratamientos y dosis a utilizar se detallan en la tabla 1.1 y el esquema de aplicaciones en la tabla 1.2.

Tabla 1.1. Tratamientos y dosis utilizadas.

Tratamientos	Principio activo	Dosis (en 10l)
1- Testigo		
2- Amistar Top	Azoxistrobin-Difenoconazole	7cc
3- Amistar Top + Silwet	Azoxistrobin-Difenoconazole + adyuvante	7cc + 20cc
4- Silwet	adyuvante siliconado	20cc
5- Reflex xtra	Isopyrazam-Azoxistrobina	10cc
6- Reflex xtra + Silwet	Isopyrazam-Azoxistrobina + adyuvante	10cc + 20cc

Tabla 1.2. Esquema de aplicaciones.

	Fecha Aplicación			
	6-9-16	13-9-16	19-9-16	27-9-16
1- Testigo				
2- Amistar Top	x	x		x
3- Amistar Top + Silwet	x	x		x
4- Silwet	x	x		x
5- Reflex xtra	x	x		x
6- Reflex xtra+ Silwet	x	x		x

### Resultados experimento 1

La incidencia de la enfermedad al comienzo del experimento era muy baja y no hubo condiciones predisponentes para el patógeno, por lo que no se registró diferencias significativas entre tratamientos. Al final del experimento, con mayor nivel de oidio, todos los tratamientos fueron diferentes al testigo, sin diferencias significativas entre ellos (Cuadro1.1). Sin embargo, el adyuvante por sí mismo tuvo igual control que los sistémicos.

Luego de la primer aplicación, la mayoría de los tratamientos ejercieron un efecto depresivo sobre la población de *A. swirskii* aunque Amistar Top fue significativamente el de mayor impacto. Sin embargo una segunda aplicación, a los 7 días, causó similares efectos nocivos de todos los productos sobre los ácaros depredadores. Si bien la última evaluación ocurre después de un período de 15 días sin aplicación, no se observó una recuperación del número de móviles en las hojas (Cuadro1.2).

Cuadro 1.1. Nivel de oidio en los distintos tratamientos, según escala (\*\*)

Tratamiento	Fecha de evaluación				
	6/09/16 (*)	13-9-16	19-9-16	27-9-16	5-10-16
1- Testigo	1.0a	1.3a	1.6a	2.6a	4.2a
2- Amistar Top	1.3a	1.3a	1.2a	2.2ab	2.0b
3- Amistar Top + Silwet	1.0a	1.0a	0.9a	1.9ab	1.3b
4- Silwet	1.0a	1.0a	1.0a	2.0ab	2.0b
5- Reflex xtra	1.0a	1.0a	1.0a	1.6ab	1.8b
6- Reflex xtra + Silwet	1.0a	1.0a	0.7a	0.9b	1.2b

(\*) Nivel de oidio pre-aplicación.

(\*\*) Escala visual: **0**: ausencia de oidio, **1**: 1-10% de oidio, **2**: 11-25% de oidio, **3**: 26-50% de oidio, **4**: 51-75%, **5**: >75%.

Medias en las columnas con diferente letra son significativamente diferentes al 0,05 (Tukey)

Cuadro 1.2. Efecto de los tratamientos sobre el número de formas móviles de *A. swirskii*.

Tratamientos	Fechas de evaluación			
	6-Set *	13-Set	20-Set	27-Set
Amistar top	1,0 a	0,3 b	0,3 a	0,2 a
Amistar Top+ silwet	0,7 a	0,4 ab	0,4 a	0,1 a
Reflect xtra+ Silwet	0,9 a	0,9 a	0,4 a	0,3 a
Reflect xtra	1,0 a	0,8 a	0,2 a	0,1 a
Silwet	1,0 a	0,9 a	0,3 a	0,4 a

n:30 (5 plantas x 2 estratos x 3 repeticiones)

\* n° de individuos móviles de *A. Swirskii* en el área de muestreo pre-aplicación

Medias en la misma columna con diferente letra son significativamente diferentes al 0,05 (LSD Fisher)

**Experimento 2.** Los tratamientos y dosis a utilizar se detallan en la tabla 2.1 y el esquema de aplicaciones en la tabla 2.2.

Tabla 2.1. Tratamientos y dosis utilizadas.

Tratamientos	Principio activo	Dosis (en 10l)
1- Rally	Myclobutanil	6g
2- Rally+ Ac. Mineral	Myclobutanil + Aceite parafínico	6g+25cc
3- Rally + Silwet	Myclobutanil + adyuvante	6g+2cc
4- Silwet	adyuvante siliconado	2cc
5- Ac. Mineral	Aceite parafínico	50cc
6- Testigo		

Tabla 2.2. Esquema de aplicaciones.

	Fecha Aplicación		
	5-6-17	13-6-17	19-9-17
1- Rally	x		x
2- Rally+ Ac. Mineral	x		x
3- Rally + Silwet	x		x
4- Silwet	x		x
5- Ac. Mineral	x		x
6- Testigo			

### Resultado experimento 2

No hubo diferencias significativas en el control de oidio al incorporar adyuvantes al fungicida, sin embargo hubo control al utilizar solo Silwet a la misma dosis o aceite mineral al 0,5% (Cuadro 2.1).

Luego de la primer aplicación, todos los tratamientos ejercieron un efecto depresivo sobre la población de *A. swirskii*. Realizada una segunda evaluación, el 19 de junio a los 15 días de la aplicación, se registró una significativa recuperación del número de móviles en el tratamiento con Rally + aceite mineral al 0,25% (Cuadro2.2). El aceite al 0,5% parece tener un mayor efecto negativo en el ácaro depredador. Cuando Silwet se aplicó solo mostró un efecto nocivo menor que en la mezcla con el fungicida (cuadro 2.2).

Cuadro 2.1. Nivel de oidio en los distintos tratamientos, según escala (\*\*)

Tratamiento	Fecha de evaluación			
	31-5-17	13-6-17	19-6-17	26-6-17
1- Rally	1,1 a	0,7 a	0,6 b	0,9 b
2- Rally+ Ac. Mineral	1,1 a	0,5 a	1,1 ab	1,1 ab
3- Rally + Silwet	1,1 a	0,6 a	1,0 ab	0,75 b
4- Silwet	1,0 a	0,6 a	1,0 ab	0,87 b
5- Ac. Mineral	1,1a	0,4 a	0,8 ab	0.75 b
6- Testigo	1,0 a	1,0 a	1,5 a	2.0 a

(\*) Nivel de oidio pre-aplicación.

(\*\*) Escala visual: **0**: ausencia de oidio, **1**: 1-10% de oidio, **2**:11-25% de oidio, **3**: 26-50% de oidio, **4**:51-75%, **5**>75%.

Medias en las columnas con diferente letra son significativamente diferentes al 0,05 (Tukey)

Cuadro 2.2. Efecto de los tratamientos sobre el número de formas móviles de *A. swirskii*.

Tratamientos	Fechas de evaluación		
	5-Jun *	12-Jun	19-Jun
Aceite mineral	0,54 a	0,17 a	0,13 b
Rally	0,38 ab	0,27 a	0,13 b
Rally + Aceite mineral	0,42 a	0,29 a	0,42 a
Rally + Silwet	0,15 b	0,15 a	0,15 b
Silwet	0,35 ab	0,19 a	0,29 ab

n:48 (6 plantas x 2 estratos x 4 repeticiones)

\* n° de individuos móviles de *A. Swirskii* en el área de muestreo pre-aplicación

Medias en las columnas con diferente letra son significativamente diferentes al 0,05 (LSD Fisher)

## 2. Evaluación de aceites de distinto origen para el control de oidio

Los tratamientos y dosis a utilizar se detallan en la tabla 3.1 y el esquema de aplicaciones en la tabla 3.2.

Tabla 3.1. Tratamientos y dosis utilizadas.

Tratamientos	Principio activo	Dosis (en 10l)
1- Testigo		
2- Aceite de soja	Aceite vegetal refinado	10cc
3- Aceite mineral	Aceite parafínico	10cc
4- Neem 300ppm	Azadiractina 0,3g/l	30cc

Tabla 3.2. Esquema de aplicaciones

Tratamiento	Fecha Aplicación			
	3-10-16	10-10-16	18-10-16	25-10-16
1				
2	x	x	x	x
3	x	x	x	x
4	x	x	x	x

## Resultados

Al final del experimento, los tratamientos en base a aceites fueron significativamente diferentes al testigo sin tratar (Cuadro3.1), pero no hubo diferencias en control según la fuente de aceite utilizada.

Luego del primer tratamiento todo los productos tuvieron similar efecto depresivo sobre *A. swirskii* aunque también descendió el número de móviles en las parcelas testigo. Ocurrida un segunda aplicación, el aceite de soja al 0,1% fué significativamente el de mejor desempeño.

Respecto al aceite de neem se observa un efecto negativo en las poblaciones del ácaro depredador aunque como ya se ha mencionado, si el tratamiento no se repite, este efecto es de corta duración.

Cuadro 3.1. Nivel de oidio en los distintos tratamientos, según escala (\*\*)

Tratamiento	Fecha de evaluación				
	3-10-16	10-10-16	17-10-16	24-10-16	31-10-16
1- Testigo	1a	1,8a	3,2a	3,8a	4,5a
2- Aceite de soja	1a	1a	1,8a	1,8b	1,7b
3- Aceite mineral	1,2a	1,3a	2a	1,7b	1,6b
4- Neem 300ppm	1,3a	1,4a	2,1a	1,3b	1,6b

(\*) nivel de oidio pre-aplicación.

(\*\*) Escala visual: **0**: ausencia de oidio, **1**: 1-10% de oidio, **2**: 11-25% de oidio, **3**: 26-50% de oidio, **4**: 51-75%, **5**: >75%.

Medias en las columnas con diferente letra son significativamente diferentes al 0,05 (Tukey)

Cuadro 3.2. Efecto de los tratamientos sobre el número de formas móviles de *A. swirskii*

Tratamiento	Fechas de evaluación		
	3-Oct	10-Oct	18-Oct
Aceite mineral	0,2 b	0,2 a	0,6 b
Aceite soja	0,1 b	0,3 a	1,3 a
Neem300	0,3 b	0,3 a	0,8 ab
Testigo	0,8 a	0,3 a	1,2 a

n:30 (5 plantas x 2 estratos x 3 repeticiones)

\* n° de individuos móviles de *A. Swirskii* en el área de muestreo pre-aplicación

Medias en las columnas con diferente letra son significativamente diferentes al 0,05 (LSD Fisher)

### 3. Efecto del uso de inductores de resistencia para el control de oidio.

Los tratamientos y dosis a utilizar se detallan en la tabla 4.1 y el esquema de aplicaciones en la tabla 4.2.

Tabla 4.1. Tratamientos y dosis utilizadas

Tratamientos	Dosis (en 10l)
1-Rally	Myclobutanil 6g
2- Rally+Sulfato de K	Myclobutanil+ K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6g+30g
3- Sulfato de K	420g/Kg de K-180g/Kg de S 30g
4- Armurox	Complejo activo de péptidos con silicio 50cc
5- Biocid	Fenoles de Lignina+ Quitosano+ aminoácidos esenciales 50cc
6- Testigo	

Tabla 4.2. Esquema de aplicaciones

Tratamiento	Fecha Aplicación			
	30-5-17	7-6-17	14-6-17	20-6-17
1-Rally	x	x		x
2- Rally+Sulfato de K	x	x		x
3- Sulfato de K	x	x	x	x
4- Armurox	x	x	x	x
5- Biocid	x	x	x	x
6- Testigo				

## Resultados

Sí bien los inductores fueron aplicados con bajo nivel de enfermedad, lo ideal es que se apliquen antes de que los síntomas aparezcan en el cultivo. En este experimento todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes al testigo en cuanto al control de oidio, en general sin diferencias entre ellos (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Nivel de oidio en los distintos tratamientos, según escala (\*\*)

Tratamiento	Fecha de evaluación					
	30-5-17	7-6-17	14-6-17	20-6-17	28-6-17	5-7-17
1-Rally	1,0 a	1,0 a	0,6 b	0,9 b	0,7 c	1,1 b
2- Rally+Sulfato de K	1,0 a	0,9 a	0,7 b	0,8 b	0,9 bc	1,4 b
3- Sulfato de K	1,1 a	0,8 a	0,6 b	0,8 b	0,8 c	1,6 b
4- Armurox	1,0 a	0,6 a	0,7 b	0,9 b	1,1 bc	1,5 b
5- Biocid	0,9 a	0,8 a	0,7 b	1,5 a	1,3 b	1,6 b
6- Testigo	0,9 a	1,4 a	1,4 a	1,75 a	2,3 a	2,9 a

(\*) nivel de oidio pre-aplicación.

(\*\*) Escala visual: **0**: ausencia de oidio, **1**: 1-10% de oidio, **2**:11-25% de oidio, **3**: 26-50% de oidio, **4**:51-75%, **5**>75%.

Medias en las columnas con diferente letra son significativamente diferentes al 0,05 (Tukey)

## Consideraciones finales:

- Adyuvantes y aceites pueden incorporarse a los esquemas de tratamientos para el control de oidio, en ambos casos mostraron un buen desempeño.
- Se dispone de una lista de productos evaluados para el control de oidio en sistemas con *Amblyseius swirskii*. Dado que generalmente observamos un efecto depresivo de los tratamientos en sus poblaciones, la rotación de productos y el período entre

aplicaciones son factores claves para el mantenimiento del enemigo natural en el cultivo.

- Se debe continuar evaluando los inductores de resistencia procurando comenzar los tratamientos antes que ocurran las condiciones predisponentes para la enfermedad.