

ISSN: 1688-9258

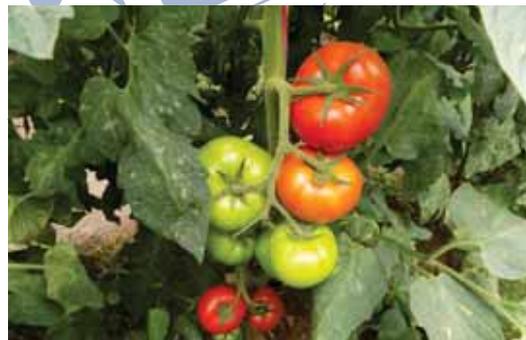


Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY



INIA Las Brujas
1964 - 2014

Jornada de Divulgación Resultados Experimentales en Sanidad de Tomate y Morrón



Programa de Investigación en Producción Hortícola
Serie Actividades de Difusión N°756
3 de diciembre de 2015

LAS BRUJAS 

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente

D.M.T.V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente



Ing. Agr. Jorge Peñaricano

D.M.V., MSc. Pablo Zerbino



Ing. Agr. Joaquín Mangado

Ing. Agr. Pablo Gorriti



Jornada de Divulgación

Resultados Experimentales en Sanidad de Tomate y Morrón

Programa de Investigación en Producción Hortícola

INIA Las Brujas – INIA Salto Grande

3 de diciembre, 2015

CONTENIDO

Cancro bacteriano

P3. - Identificación, caracterización y diagnóstico molecular de bacterias patógenas que afectan a los cultivos de tomate.

María Inés Siri, Valentina Croce, María Inés Lapaz, Florencia Hernández, María José Montelongo, Matías González, Diego Maeso, María Julia Piannzola.

P17. - Buscando nuevas herramientas para controlar un viejo enemigo: empleo del receptor EFR en tomate para el control de *Clavibacter michiganensis*.

Marco Dalla Rizza, Sara Murchio, Vilma Walacek, Federico Boschi, Matías Maidana, Claudia Schwartzman, Gustavo Giménez, Diego Maeso.

P24. - Evaluación de desinfectantes para prevenir la transmisión de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* en tomate mediante tijeras de poda.

Maeso Diego, Walasek Wilma, Fernández Alfredo.

P32. - Eficiencia de productos aplicados en riego en el control de cancro bacteriano de tomate (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*).

Maeso, D.C.; Walasek, W. ; Fernández, A.

P40. - Evaluación de productos aplicados al follaje para el control del cancro bacteriano del tomate. Temporada 2013-14.

Diego Maeso, Jorge Arboleya, Alfredo Fernández y Wilma Walasek.

P44. - 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.

Diego Maeso, Alfredo Fernández, Wilma Walasek.

P62. - Aceites esenciales de plantas nativas promisorios para el control de bacteriosis en tomate.

Mercedes García Roche, Elena Pérez.

Entomología

P66. - Evaluación del efecto de la aplicación de aceites esenciales para el control de mosca blanca en tomate.

Umpiérrez, M.L., Rossini, C., Paullier, J.

P74. - Evaluación de la repelencia de *Solanum commersonii* para el control de mosca blanca en tomate.

Umpiérrez, M.L., Rossini, C., Paullier, J.

P82. - Contribución al control biológico de plagas de la horticultura en la región de Salto. Avances de investigación. Proyecto INNOVAGRO.

Basso César, Buenahora José, Bao Leticia, Lorenzo María, Caraballo María, Ziminov Mónica, Grille Gabriela, Méndez Luciana.

P84. - Evaluación de productos fungicidas e insecticidas en pimientos protegidos como un aporte al manejo integrado de enfermedades y plagas.

José Buenahora, Leticia Rubio.

Peste negra

P92. - Seguimiento de "Peste negra" en morrón: Experimentos en la zona sur de Uruguay. Ciclo 2013-2014.

Diego Maeso, Jorge Paullier, Pablo González, Jorge Arboleya, Alfredo Fernández, Wilma Walasek.

Mancha bacteriana

P108. - Evaluación de productos aplicados al follaje para el control de mancha bacteriana del tomate. Temporada 2013-2014.

Diego Maeso, Alfredo Fernández.

P112. - Control de la mancha bacteriana del tomate (*Xanthomonas* spp.) en cultivo a campo para industria mediante aplicaciones foliares. 2014-2015.

Diego Maeso, Alfredo Fernández, Wilma Walasek.

IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BACTERIAS PATÓGENAS QUE AFECTAN A LOS CULTIVOS DE TOMATE.

María Inés Siri¹, Valentina Croce¹, María Inés Lapaz¹, Florencia Hernández¹, María José Montelongo², Matías González³, Diego Maeso³, María Julia Piannzola¹

¹ Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República. Av. Gral. Flores 2124, CP 11800, Montevideo, Uruguay.

² Cátedra de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Av. Garzón CP 12900, Montevideo, Uruguay.

³ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (Estaciones experimentales Las Brujas y Salto Grande).

msiri@fq.edu.uy, mpianzzo@fq.edu.uy

Palabras clave.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas* spp., MLSA-MLST, qPCR, control preventivo.

Resumen.

Las enfermedades bacterianas constituyen un grave problema para la producción de tomate (*Solanum lycopersicon*) tanto en condiciones de cultivo a campo como protegido. Ante la ocurrencia de condiciones ambientales favorables para el desarrollo bacteriano, se hace muy difícil su manejo pudiendo ocasionar importantes pérdidas en los cultivos. En general, se considera que la estrategia más eficiente para lograr un control efectivo de estas enfermedades es apuntar a un control preventivo, evitando que el patógeno entre en contacto con el cultivo. Para ello, es necesario implementar acciones coordinadas entre los actores que intervienen a diferentes niveles para el control de la enfermedad: proveedores de semilla, viveristas, productores, técnicos e investigadores.

En este trabajo se presentan los avances de investigación en relación al estudio de dos importantes bacterias patógenas de tomate: *Xanthomonas* spp., agente causal de la mancha bacteriana y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), responsable del cancro bacteriano del tomate. Estos estudios fueron realizados en el marco del Proyecto CSIC Grupos I+D "Fitopatógenos de importancia hortícola" que reunió la participación de investigadores de Facultad de Química, Facultad de Agronomía e INIA. Los trabajos realizados se enfocaron a generar conocimiento sobre el tipo de cepas presentes en nuestro país, su variabilidad genética, principales vías de infección y diseminación; información esencial para establecer estrategias de control eficiente. Además, estos estudios permitieron desarrollar herramientas moleculares de identificación, tipificación y diagnóstico, que podrán ser aplicadas para el control de estos patógenos. Por último, los recursos humanos y capacidades de investigación generados a través de este proyecto podrán ser adaptados para el estudio de otros fitopatógenos de relevancia para el sistema productivo.

La mancha bacteriana del tomate causada por *Xanthomonas* spp.

Entre los problemas sanitarios más importantes del cultivo de tomate se encuentra la enfermedad conocida como "mancha bacteriana", causada por bacterias del género *Xanthomonas* (EPPO-PQR, 2015). En Uruguay, se la considera el problema fitosanitario más importante en años lluviosos y cálidos, distribuyéndose en todas las áreas de producción

(Berrueta et al., 2014). Puede afectar todas las partes vegetativas de la planta. En todos los casos reduce la productividad por la destrucción del follaje y la caída de flores y frutos en formación. También tiene grandes efectos en la disminución de la calidad del producto, tanto para el consumo directo como para el procesamiento industrial.

Originalmente el agente causal de la mancha bacteriana en tomate se asignó a un único taxón, *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. Sin embargo, actualmente se acepta que las cepas de *Xanthomonas* que afectan a los cultivos de tomate y morrón constituyen un grupo heterogéneo formado por cuatro especies: *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri* (Jones et al., 2004).

Trabajos previos realizados en Uruguay permitieron generar una colección muy completa de cepas de *Xanthomonas* aisladas a partir de frutos de tomate con síntomas típicos de mancha bacteriana (Montelongo, 2012). Esta colección fue caracterizada mediante determinación de razas, evaluación de resistencia a sulfato de cobre y antibióticos y comparación de la agresividad de los aislamientos (Montelongo, 2012). Sin embargo, no se conocían las especies de *Xanthomonas* predominantes en nuestro país, información esencial para seleccionar las fuentes de resistencia a utilizar en el programa de mejoramiento genético de tomate que se desarrolla en INIA, así como para establecer medidas de vigilancia epidemiológica de este patógeno. En base a estos antecedentes, nos propusimos avanzar en la identificación de las especies de *Xanthomonas* que afectan los cultivos de tomate en Uruguay mediante el uso de diferentes métodos moleculares.

El cancro bacteriano del tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*).

El cancro bacteriano del tomate es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta a este cultivo a nivel mundial (EPPO, 2013). Se trata de una enfermedad con un amplio rango de síntomas. En el campo, puede manifestarse como un marchitamiento generalizado o sistémico que causa la muerte de la planta (cancro primario) y/o como una fase foliar no sistémica (cancro secundario) que ocasiona un quemado característico de los márgenes de las hojas (Agrios, 2005).

La semilla infectada es el principal origen de infección y disseminación de este patógeno (de Leon et al, 2011). Una vez que está presente en el cultivo tiene la capacidad de diseminarse fácilmente, afectando a todas las plantas en parcelas o invernaderos en cuestión de semanas (Sharabani et al., 2013). *Cmm* no es un patógeno de suelo, sin embargo, se ha comprobado que puede sobrevivir por períodos de más de 3 años cuando se asocia a restos de cultivos, lo que representa una vía alternativa de infección (Chang et al., 1991). También puede diseminarse de manera mecánica por las manos, herramientas de trabajo, poda y otras labores culturales (Eichenlaub et al., 2006). Las infecciones latentes en plántulas asintomáticas también contribuyen a su disseminación ya que al ser transplantadas a campo o invernáculo constituyen una fuente de inóculo adicional (Gitatis et al., 1991).

La mejor estrategia de control de esta enfermedad es el control preventivo y el uso de semillas sanas es la principal medida a la que se debe apuntar. Está reportado que la existencia de 1 sola semilla infectada en un lote de 10.000 es suficiente para iniciar una epidemia en condiciones ambientales favorables (de León et al., 2008). El tratamiento químico o térmico de las semillas ha demostrado una reducción de los niveles de contaminación por *Cmm*, pero estos métodos no existe ningún método que asegure la completa erradicación del patógeno de la semilla de tomate sin afectar su germinación (de Leon et al., 2008; Sen et al., 2015).

Para asegurar un estricto control de la calidad fitosanitaria de la semilla, muchos países han adoptado medidas cuarentenarias. En Europa, *Cmm* ha sido clasificado como plaga

cuarentenaria tipo A2, y la introducción de semilla de tomate está estrictamente regulada (EPPO, 2013). En Uruguay, *Cmm* no figura como plaga cuarentenaria ni regulada según las disposiciones establecidas por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Por lo tanto actualmente no se realiza ningún control fitosanitario a las semillas de tomate que ingresan al país. Sin embargo, se hace evidente la necesidad de contar con capacidades que nos permitan evaluar la calidad fitosanitaria de semilla comercial. En este contexto, los objetivos de este trabajo en relación a *Cmm* fueron: i) realizar un relevamiento de las cepas de *Cmm* que afectan los cultivos de tomate en Uruguay, ii) optimizar diferentes métodos moleculares para la identificación y tipificación de las cepas aisladas, y iii) desarrollar métodos moleculares de diagnóstico de *Cmm* en material de propagación (semilla y plántulas).

Metodología.

Aislamiento, cultivo y conservación de las cepas.

Se analizó una colección de 111 cepas de *Xanthomonas spp.* causantes de mancha bacteriana del tomate generada en el marco de la Tesis de Maestría de la Ing. Agr. María José Montelongo. Los aislamientos se realizaron a partir de frutos con síntomas atribuibles a mancha bacteriana provenientes de predios ubicados en el departamento de Canelones durante el período 2007-2012.

Por otro lado, se analizaron 33 cepas de *Cmm* aisladas durante el período 2011-2015, a partir de cultivos de tomate con síntomas de cancro de la zona sur (Montevideo, Canelones y San José) y de la zona norte (Salto). También se incluyeron en el análisis 22 cepas aisladas de brotes previos de cancro bacteriano, las cuales fueron aportadas por el Ing. Agr. Enrique Verdier (DGSA-MGAP) y Elisa Silvera (Facultad de Agronomía).

El cultivo de las cepas de *Cmm* y *Xanthomonas* se realizó en medio agar nutriente dextrosa (NAD) o agar nutriente extracto de levadura (NBY), incubando las placas a 28°C durante 48-72 hs. Las cepas son conservadas por congelamiento a -70°C y forman parte de la colección de Microorganismos de Importancia Agrícola e Industrial (MAI) del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química.

Caracterización molecular de las cepas de *Xanthomonas* y *Cmm*.

La extracción ADN de las cepas se realizó a partir de cultivos líquidos en caldo NBY incubados a 28°C por 24 hs, utilizando protocolos clásicos de extracción para bacterias gram negativas (*Xanthomonas*) y gram positivas (*Cmm*) (Sambroock and Russell, 2001).

Se utilizaron dos abordajes moleculares diferentes para identificar los aislamientos de *Xanthomonas spp.* a nivel de especie.

Por un lado, se realizó la amplificación utilizando el método de multiplex-PCR desarrollado por Araújo y colaboradores (2012) para la identificación de las cuatro especies de *Xanthomonas* causantes de mancha bacteriana en tomate: *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri*.

Además, se analizó un subgrupo de 33 aislamientos representativos de esta colección mediante el método *Multilocus Sequence Analysis and Typing* (MLSA-MLST), basado en la amplificación y secuenciación de 5 genes *housekeeping* (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *gyrB*, *rpoD*). La amplificación se realizó utilizando los cebadores y las condiciones descritas por Mhedbi-Hajri y colaboradores (2013). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones por el Servicio de Macrogen (Kumchun, Seúl, Corea). En el análisis filogenético se incluyeron secuencias depositadas en la base de datos *GenBank* de las cuatro cepas de referencia de las especies de *Xanthomonas* causantes de mancha bacteriana en tomate (*X.*

vesicatoria ATCC35937, *X. perforans* 91-118, *X. euvesicatoria* 83M y *X. gardneri* ATCC19865). Como grupo externo para el análisis se utilizó la cepa *X. campestris* pv. *raphani* 756C. Las secuencias fueron editadas y alineadas utilizando el programa Genius (Hall, 1999). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de neighbor-joining en el programa MEGA 5.0. Los árboles resultantes y la topología fueron evaluados mediante el análisis de bootstrap basado en 1000 repeticiones. Las secuencias de los diferentes genes se analizaron individualmente y concatenadas. En todos los árboles filogenéticos se consideraron clusters consistentes los que presentaban valores de bootstrap $\geq 70\%$.

Las cepas de *Cmm* fueron identificadas mediante amplificación y análisis de secuencia del gen 16S rRNA y por amplificación con cebadores específicos (Jacques et al., 2012). También se realizó la caracterización en base a la presencia o ausencia de genes específicos de virulencia de *Cmm* (*pat1*, *celA*, *ppaA*, *chpC* y *tomA*) (Kleitman et al., 2008). Posteriormente, se realizó un análisis de la diversidad genética dentro de 39 aislamientos de esta colección mediante la técnica MLSA-MLST según el esquema reportado por Jacques et al. (2012). La metodología seguida para realizar este análisis se encuentra detallada en el trabajo de Croce et al. (2015).

Desarrollo y evaluación de un método de diagnóstico de *Cmm* mediante qPCR.

Se evaluaron dos sistemas de cebadores y sonda para qPCR (*Ptssk* y *MVS21*) recomendados en la última versión del protocolo de la ISF para identificación de *Cmm* (ISF, 2015). Para evaluar la eficiencia de estos sistemas y determinar la sensibilidad de las reacciones de qPCR en nuestras condiciones, se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas del ADN de una de las cepas de *Cmm* abarcando concentraciones desde 20 ng/ μ l a 0,2 pg/ μ l.

Posteriormente, se evaluaron distintos procedimientos con el objetivo de optimizar un protocolo de diagnóstico de *Cmm* en muestras de semillas (Figura 1). Para evaluar la sensibilidad de estos métodos, se prepararon semillas infectadas de manera artificial con diferentes concentraciones de *Cmm* (10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 ufc/semilla). Las mismas fueron utilizadas para infectar lotes de 2000 semillas sanas y evaluar así el límite de sensibilidad de la qPCR (Figura 1). Los lotes de semilla fueron procesadas según el protocolo ISF (2015) y el extracto obtenido fue analizado en paralelo por dos metodologías diferentes: i) sobre 10 ml se realizó la extracción de ADN y posterior amplificación por qPCR, y ii) BIO qPCR: se sembraron 2 placas de medio selectivo para *Cmm* y se incubaron a 28°C. Luego de 72 horas se lavó una de las placas con 2 ml de agua estéril, se juntó en un tubo y se realizó una lisis celular (20 minutos a 99°C). Este lisado fue utilizado como molde en la reacción de qPCR. La segunda placa se dejó incubando como placa control para la observación de colonias de *Cmm*. Todas las reacciones de qPCR se realizaron utilizando el sistema *TaqMan MVS21* (ISF, 2015).

También se adaptaron estos procedimientos para evaluar la detección de *Cmm* en plantas de tomate jóvenes. Las semillas infectadas mencionadas anteriormente se pusieron a germinar y se realizó la detección del patógeno sobre las plantas luego de 4 semanas en cámara de crecimiento. Cada muestra de distinto nivel de infección se armó con pooles de 5 plantas y a su vez se separaron en 2 tipos de muestras: cotiledones y parte aérea de la planta. Se utilizaron las mismas metodologías que para el análisis en muestras de semillas: qPCR directa y BIO qPCR (Figura 2).

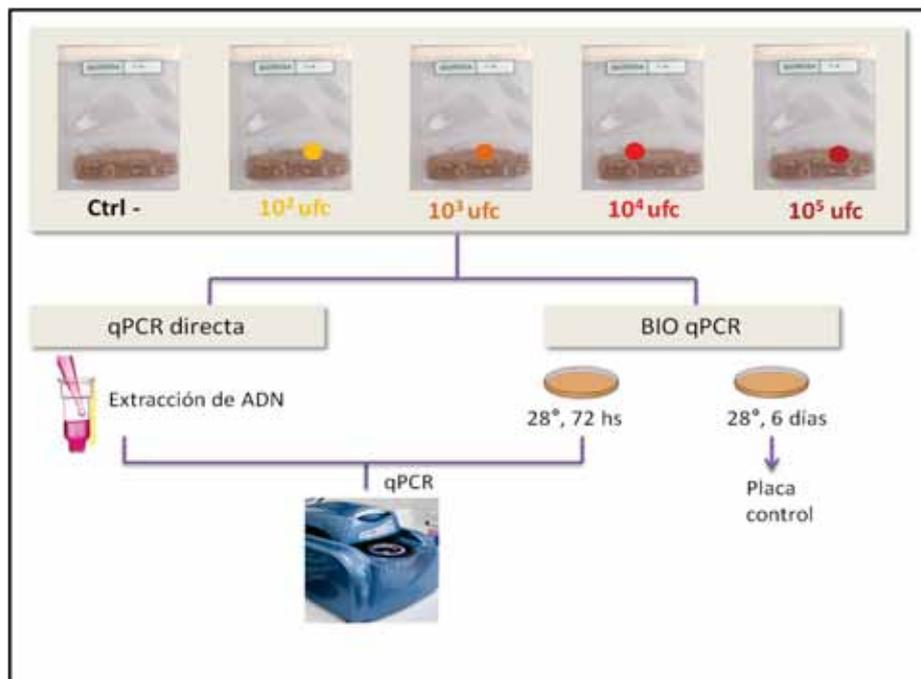


Figura 1. Estrategia adoptada para la evaluación de métodos de detección de *Cmm* en semillas de tomate. Se utilizaron lotes de 2000 semillas sanas inoculadas con 1 semilla infectada con diferentes niveles del patógeno (10^2 a 10^5 ufc/semilla). Como control negativo (Ctrl -) se utilizó un lote de 2000 semillas sanas.

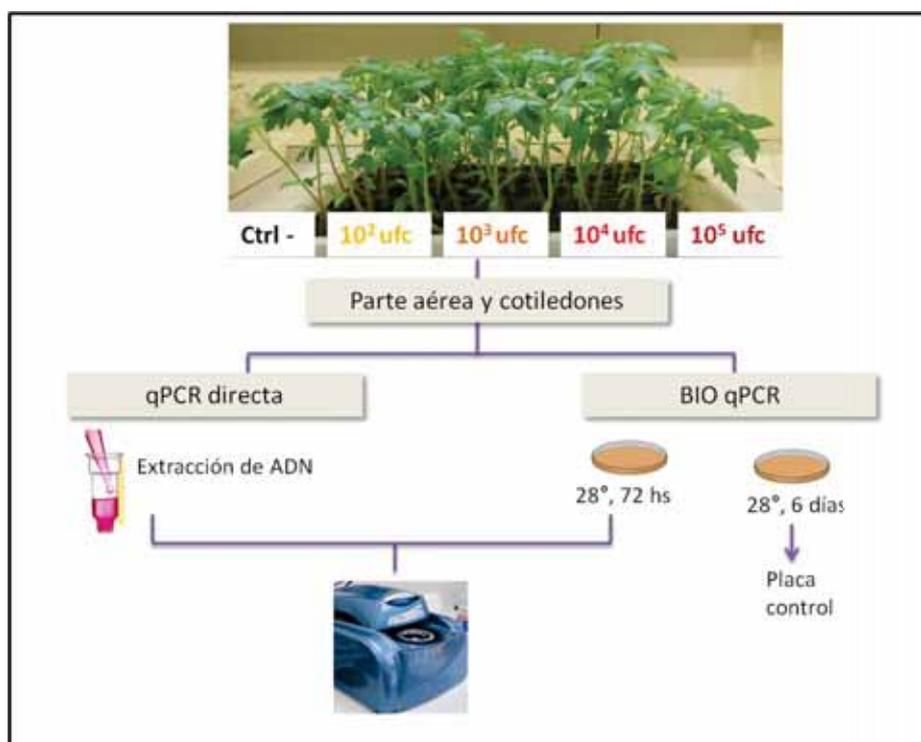


Figura 2. Estrategia adoptada para la evaluación de métodos de detección de *Cmm* en plántulas de tomate generadas a partir de semillas con diferentes niveles de infección (10^2 a 10^5 ufc/semilla).

Resultados y discusión.

Identificación de las especies de *Xanthomonas* que afectan a los cultivos de tomate en Uruguay.

Se utilizaron diferentes métodos moleculares capaces de identificar a nivel de especie las poblaciones de *Xanthomonas* que afectan los cultivos de tomate en Uruguay. En primera instancia, se utilizó la técnica de multiplex-PCR desarrollado por Araújo y colaboradores (2012), la cual permite la identificación de las cuatro especies de *Xanthomonas* patógenas de tomate en una misma reacción de amplificación. Se pusieron a punto las condiciones de reacción utilizando ADN de cuatro cepas de referencia pertenecientes a las especies *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri* (Figura 3). Posteriormente, se analizaron 88 cepas de la colección, logrando asignar 68 a la especie *X. vesicatoria* y 12 a *X. gardneri* (Figura 3). Algunas cepas (8) no produjeron ningún producto de amplificación, no pudiendo ser asignadas a ninguna de las cuatro especies descritas como patógenas de tomate.

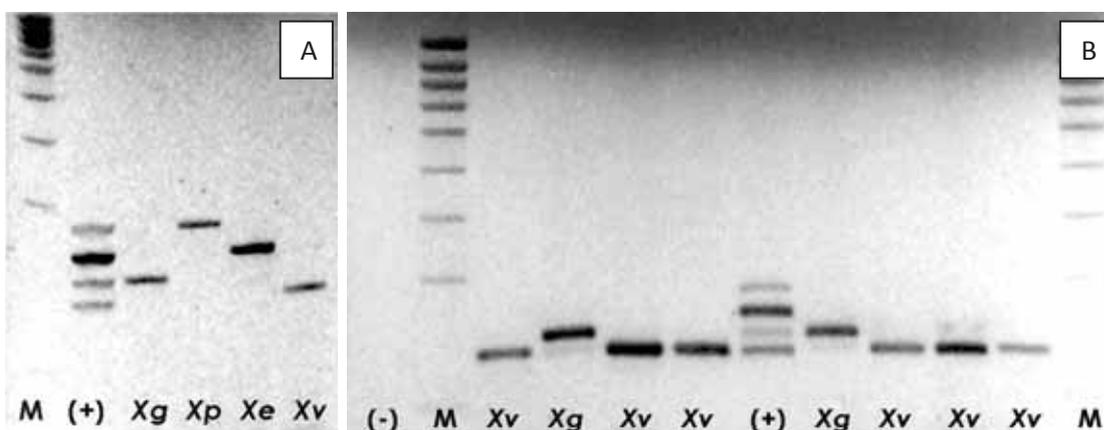


Figura 3. Productos de PCR obtenidos con la técnica multiplex-PCR utilizando cebadores específicos para *X. gardneri* (Xg), *X. perforans* (Xp), *X. euvesicatoria* (Xe) y *X. vesicatoria* (Xv). A) Cepas de referencia de cada una de las especies. B) Cepas de *Xanthomonas* aisladas en Uruguay. M: marcador de peso molecular, (+) control positivo con ADN de las cuatro especies, (-) control negativo sin ADN.

Para complementar este estudio y evaluar en mayor profundidad la diversidad genética de los aislamientos de *Xanthomonas* en nuestro país, se realizó un estudio filogenético utilizando la técnica MLSA-MLST. Esta técnica está basada en el análisis de polimorfismos a nivel de la secuencia de ADN de varios loci genéticos conservados involucrados en funciones metabólicas básicas y en los últimos años se ha utilizado con éxito para la clasificación taxonómica de las especies de *Xanthomonas* (Mhedbi-Hajri et al., 2013; Jibrin et al., 2015; Timilsina et al., 2015). En este trabajo, se aplicó el esquema MLSA descrito por Mhedbi-Hajri y colaboradores (2013) para el análisis de 33 cepas de *Xanthomonas* de nuestra colección. Los resultados de este análisis son concordantes con los obtenidos mediante multiplex-PCR, indicando que *X. vesicatoria* y *X. gardneri* son las especies prevalentes en los cultivos de tomate en Uruguay (Figura 4). Por otro lado, ninguno de los aislamientos analizados se asignó a las especies *X. euvesicatoria* y *X. perforans*, lo que indicaría que estas especies no se encuentran presentes en nuestro país, resaltando la necesidad de implementar medidas tendientes a la vigilancia de estos patógenos. El análisis filogenético también reveló la existencia de varios haplotipos dentro de los aislamientos pertenecientes a la especie *X. vesicatoria*, lo que sugiere la ocurrencia de varios eventos de introducción de esta especie en nuestro país. Por otro lado, no

se encontró una correlación entre la especie y el origen de las cepas ya que tanto *X. vesicatoria* como *X. gardneri* fueron aisladas de todas las regiones de producción del país. Por último, se encontraron dos aislamientos (MAI2002 y MAI2036) que no se agrupan con ninguna de las especies de referencia incluidas en el análisis. Es necesario realizar análisis adicionales para identificar estos aislamientos, ya que los mismos tampoco pudieron ser amplificadas mediante la reacción de multiplex-PCR. Este es el primer estudio que describe el estado de las especies de *Xanthomonas* causantes de mancha bacteriana de tomate en Uruguay.

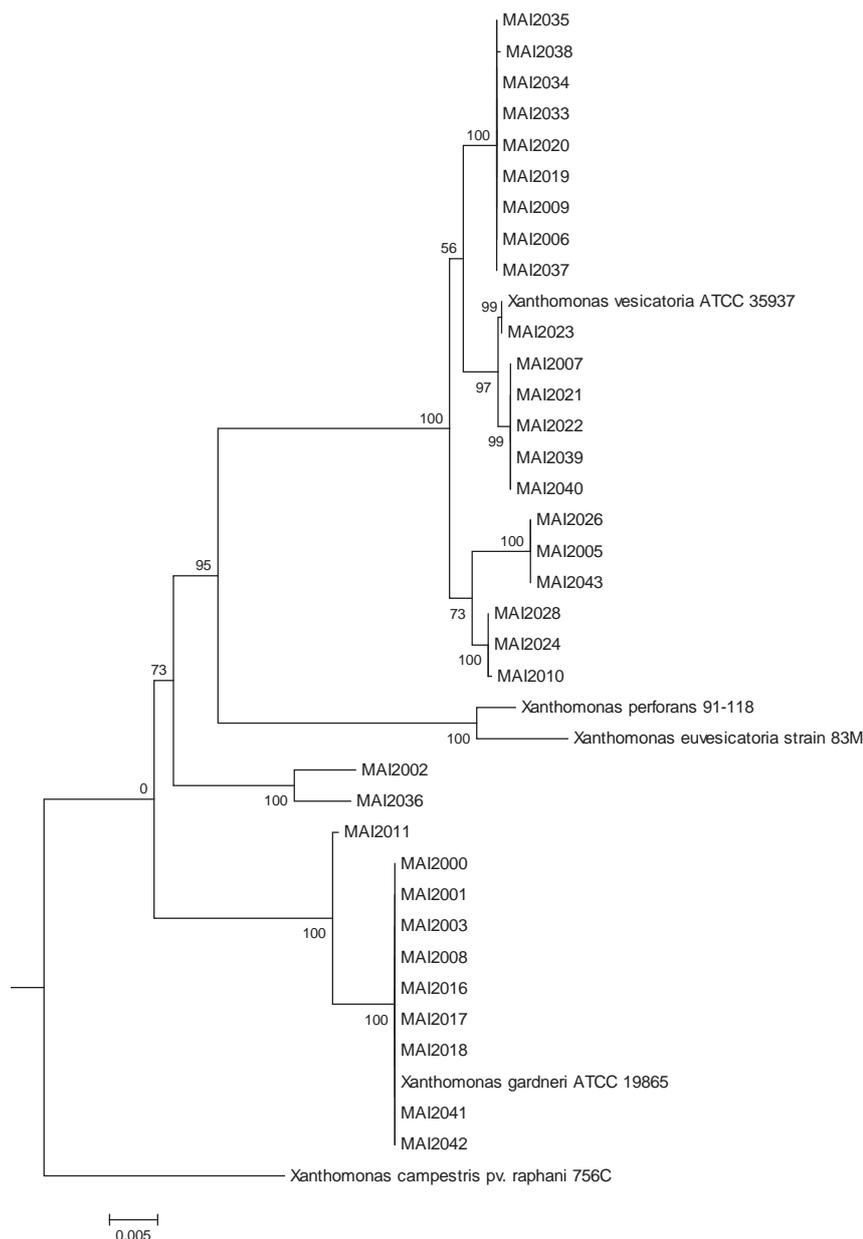


Figura 4. Árbol filogenético construido usando el método *neighbor-joining* a partir del alineamiento de las secuencias parciales concatenadas de los cinco genes *housekeeping* (*atpD*, *dnaK*, *efp*, *gyrB*, *rpoD*) de cepas de *Xanthomonas* patógenas de tomate. Valores de *bootstrap* >70% (basados en 1000 repeticiones) se indican en los nodos.

Identificación y evaluación de la diversidad genética de las cepas de *Cmm* causantes de cancro bacteriano del tomate en Uruguay.

Con el objetivo de caracterizar las cepas de *Cmm* que afectan los cultivos de tomate en Uruguay, se generó una colección de 55 cepas aisladas de cultivos provenientes de las principales zonas de producción (Norte y Sur). Todas las cepas fueron capaces de causar patogenicidad en tomate, produciendo los típicos síntomas de marchitamiento y cancro en tallo luego de 14 días de la inoculación (Figura 5). El análisis de secuencias del 16S rRNA de todas las cepas reveló un 99-100% de identidad respecto a la cepa de referencia de *Cmm* NCPPB 382, y también se verificó la presencia de varios genes de patogenicidad.

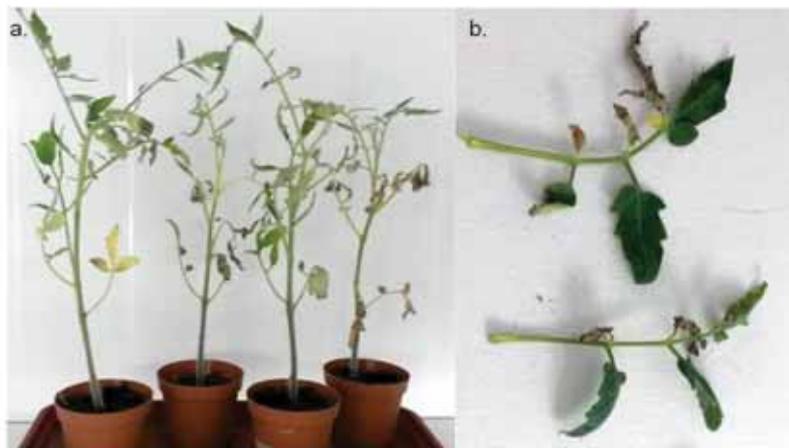


Figura 5. Síntomas típicos de cancro bacteriano en plantas de tomate inoculadas con una de las cepas de *Cmm* aisladas en Uruguay (14 dpi): a) marchitamiento generalizado, b) marchitamiento unilateral.

Se evaluó la diversidad genética de las cepas de *Cmm* aisladas con el objetivo de generar conocimiento para futuros estudios epidemiológicos que profundicen en los principales mecanismos de transmisión y la introducción de nuevas variantes del patógeno en el país. A través de este estudio apuntamos a responder varias preguntas: i) saber si un brote de infección localizado es originado por uno o más cepas diferentes del patógeno, ii) inferir un posible origen de los brotes a partir de la comparación de los perfiles genéticos de cepas de diferentes localidades y iii) determinar cómo se relacionan las cepas presentes en Uruguay con otras cepas de *Cmm* aisladas del resto del mundo. Se utilizó el método MLSA-MLST que ha sido aplicado con éxito en estudios de epidemiología molecular de varios patógenos humanos y vegetales, demostrando una gran reproducibilidad y capacidad de discriminar los aislamientos a nivel infraespecífico (Almeida et al., 2010).

Hasta el momento se analizaron 39 cepas de *Cmm* aisladas en Uruguay, quedando pendiente el análisis de las cepas aisladas más recientemente. Este análisis se realizó durante una estancia de investigación en el Laboratorio IRHS, INRA, Angers, Francia en el marco de una colaboración con la Dra. Marie-Agnès Jacques. Los resultados obtenidos se encuentran publicados en el artículo de Croce et al. (2015). Se detallan a continuación los hallazgos más relevantes de este estudio.

En la Figura 6 se muestra el árbol filogenético obtenido a partir de este análisis, incluyendo también 68 cepas de *Cmm* provenientes de una colección mundial de aislamientos. Se identificaron un total de 36 variantes alélicas (STs) dentro de la población de cepas de *Cmm*, confirmando la aplicabilidad de esta técnica como herramienta de tipificación. Las cepas aisladas en Uruguay se distribuyeron en 10 de estos STs, 8 de los cuáles fueron identificados por primera vez en este estudio.

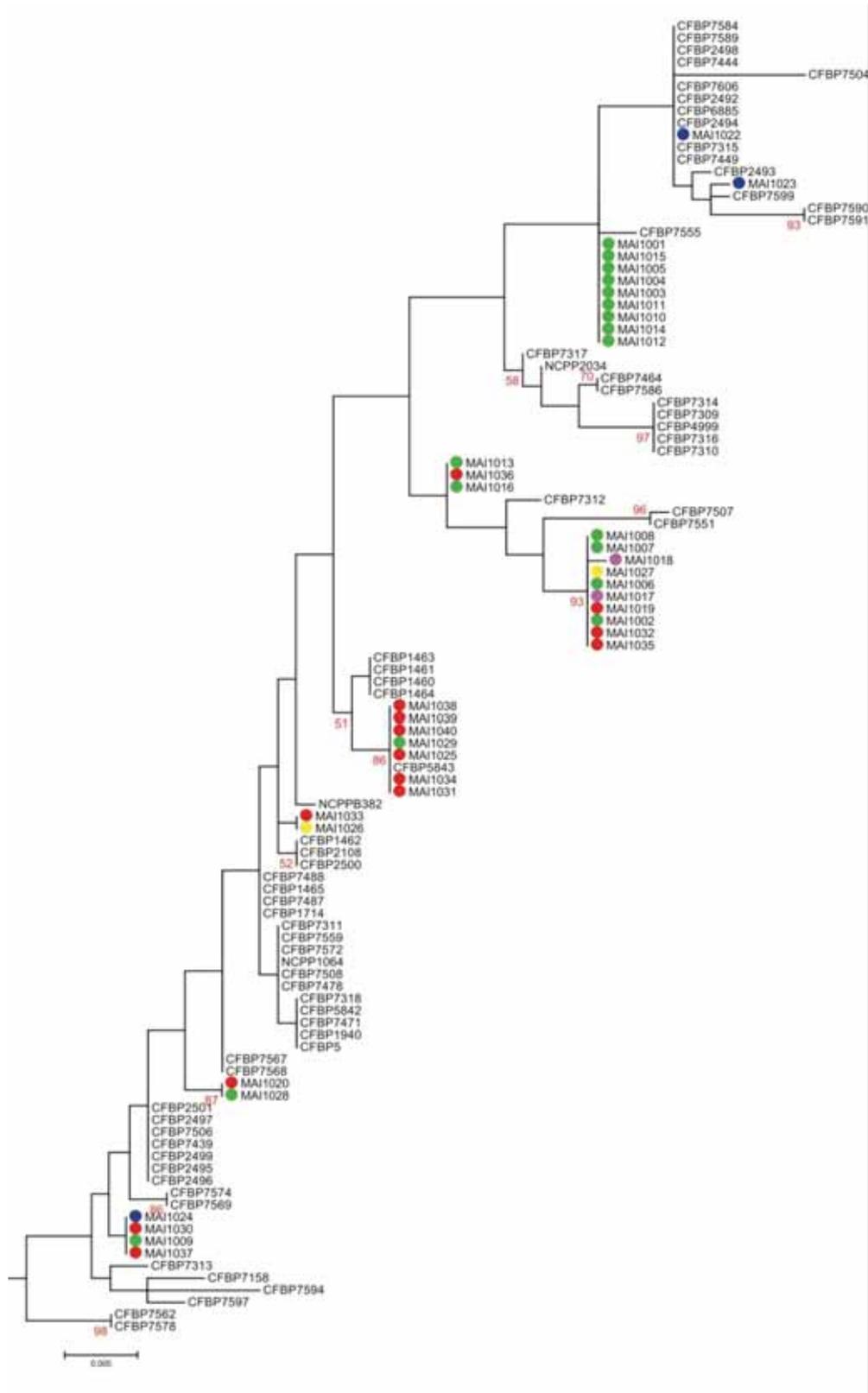


Figura 6. Árbol filogenético construido usando el método de máxima verosimilitud a partir del alineamiento de las secuencias parciales concatenadas de los cinco genes *housekeeping* (*atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *ppk*, *recA*) de cepas de *Cmm*. Valores de *bootstrap* >50% (basados en 1000 repeticiones) se indican en los nodos. El origen geográfico de las cepas aisladas en Uruguay se indica con colores (Salto: verde, Artigas: azul, Montevideo: rojo, Canelones: amarillo, San José: rosado).

En la Figura 7 se representa la distribución de estos STs en las diferentes zonas de producción del país. Un resultado interesante a destacar, es la ocurrencia de brotes originados por diferentes cepas de *Cmm* (asignados a diferentes STs). Este es el caso, de los brotes ocurridos en Salto durante las zafas de 2011 y 2012, los cuales fueron originados por cepas distribuidas en 6 STs diferentes. Por otro lado, algunos STs están asociados a una región o brote específico, como es el caso del ST3 aislado únicamente en Salto durante la zafa de 2012. Por el contrario, otros STs se identificaron como causantes de brotes en diferentes años y en todas las zonas de producción.



Figura 7. Distribución geográfica de las diferentes cepas de *Cmm* aisladas en Uruguay. Los números representan los tipos de secuencia (STs) determinados mediante análisis MLSA-MLST.

Como resultado de este estudio se observó que las cepas uruguayas tienen orígenes diversos, destacándose la transmisión global del patógeno a través de la semilla. Además, se encontraron nuevas variantes alélicas respecto a las previamente identificadas aportando mayor información en cuanto a la diversidad genética de esta subespecie.

Desarrollo de un método de diagnóstico molecular de *Cmm* en material de propagación (semilla y plántulas).

Dada los bajos niveles de infección que se requieren para iniciar una epidemia por *Cmm* en condiciones favorables, es necesario contar con métodos rápidos, confiables y de alta sensibilidad para la detección del patógeno en lotes de semillas contaminadas, especialmente en el comercio internacional. Los métodos basados en PCR presentan varias ventajas frente a otras metodologías de diagnóstico y se utilizan cada vez más en protocolos para análisis fitosanitarios (de León et al., 2011). La PCR en tiempo real (qPCR) es una variante que conjuga las ventajas del uso de la *Taq* polimerasa con la detección mediante fluorescencia del producto específico, sin necesidad de realizar ninguna manipulación adicional posterior a la amplificación. Esta particularidad reduce notablemente los tiempos de análisis permitiendo estandarizar el ensayo para el análisis de un gran número de muestras. Otras ventajas frente a la PCR clásica son su mayor sensibilidad, disminución del riesgo de ocurrencia de falsos positivos y posibilidad de efectuar la cuantificación del ADN diana (Valasek and Repa, 2005).

En este trabajo, se evaluaron diferentes metodologías basadas en qPCR para desarrollar protocolos de diagnóstico de *Cmm* en muestras que contribuyen a la diseminación del patógeno (semilla y plántula). Para ello, se trabajó en colaboración con el Dr. Leandro de León a través de una pasantía de investigación que realizó la estudiante V. Croce en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de INIA, Madrid, España.

Se tomó como punto de partida los sistemas de detección de *Cmm* (*Ptssk* y *MVS21*) recomendados por la ISF (*International Seed Federation*) (ISF, 2015). Se evaluaron estos sistemas en nuestras condiciones, resultando que ambos presentaron muy buenos niveles de eficiencia y sensibilidad (límite de detección 2 pg/ μ l de ADN) (Figura 8). Este resultado indica que ambos sistemas podrían ser utilizados de igual manera para la detección de *Cmm* en extractos de semillas. La especificidad del sistema *Ptssk* ha sido verificada previamente en trabajos previos (Jacques et al., 2012), mientras que el sistema *MVS21* ha sido incorporado al protocolo de la ISF recientemente y no existen al momento trabajos publicados que utilicen este sistema.

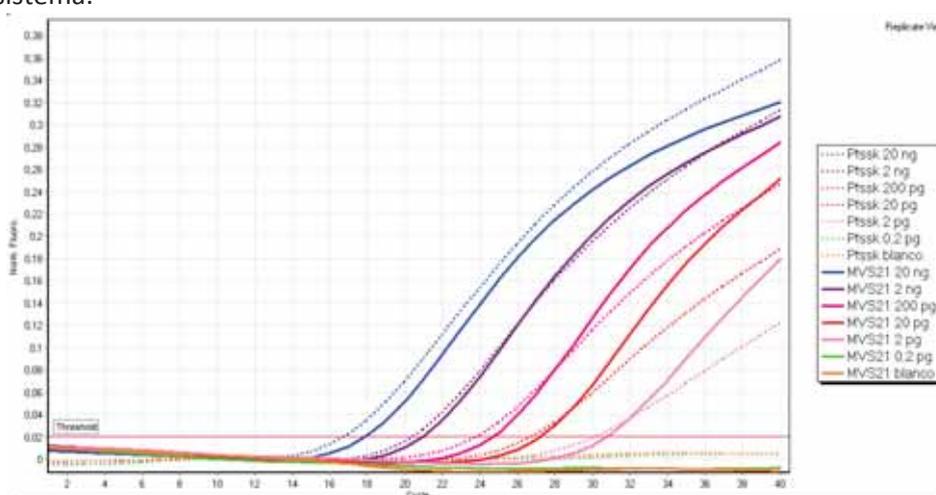


Figura 8. Curvas de calibración (Fluorescencia vs ciclos) de las reacciones de qPCR con diferentes sistemas *TaqMan* para detección de *Cmm* (*Ptssk* y *MVS21*). Se analizaron diferentes concentraciones de ADN de *Cmm* en un rango de 20 ng a 0,2 pg por reacción.

El protocolo de detección recomendado por la ISF, tiene la limitante de que el análisis de las muestras de semillas abarca el aislamiento del patógeno y la posterior identificación de las colonias aisladas mediante qPCR. Dado que las muestras de semillas pueden estar muy contaminadas por otros microorganismos saprófitos, el aislamiento puede resultar muy dificultoso y laborioso. Además los medios utilizados no presentan una selectividad absoluta para *Cmm*, por lo que en este tipo de muestras el aislamiento del patógeno es complejo e insume mucho tiempo. En este trabajo, se propuso optimizar un protocolo de detección directa en extracto de semillas que presente buena sensibilidad y confiabilidad. Con este objetivo, se evaluaron 2 metodologías: extracción de ADN seguida de una amplificación por qPCR y BIO qPCR. Ambas metodologías mostraron resultados similares en cuanto a su sensibilidad, siendo capaces de detectar la presencia de *Cmm* en los lotes inoculados con una semilla infectada con 10^5 , 10^4 y 10^3 ufc del patógeno. De esta forma, el límite de sensibilidad de la qPCR con ambas metodologías fue de 1 semilla infectada (con 10^3 ufc) en un lote de 2000 semillas sanas. Este resultado es muy bueno ya que aunque no se puede establecer con exactitud el nivel de contaminación de cada semilla infectada de manera natural, está reportado que es de 10^2 - 10^4 ufc/semilla (Fatmi y Schaad, 1988). En relación a la comparación

de ambas metodologías propuestas, la ventaja de la qPCR directa es su rapidez, ya que permite realizar el análisis de las muestras en un día. Por otro lado, el método basado en BIO qPCR, a pesar de insumir un mayor tiempo de análisis (72 hs) tiene la ventaja de detectar únicamente las células viables del patógeno y de permitir contar con un cultivo control que sirve como respaldo de los resultados obtenidos.

Las semillas infectadas artificialmente, también se pusieron a germinar con el objetivo de evaluar la detección del patógeno en plántulas. La detección en plantas jóvenes, puede resultar de importancia a nivel de viveros. Si es posible detectar a la bacteria en plantas jóvenes infectadas en viveros, se evitaría llevar esas plantas a campo para que luego desarrollen enfermedad. En una primera instancia, se verificó la transmisión de la bacteria de estas semillas infectadas a la planta. A las 8 semanas de crecimiento, se observaron síntomas típicos de cancro en plantas generadas a partir de semillas con los niveles más bajos de infección (10^2 ufc) (Figura 9). A partir de estas plantas se realizaron aislamientos, logrando verificar la presencia de *Cmm* en todas estas muestras. Este resultado resalta la importancia de contar con métodos de diagnóstico capaces de detectar niveles bajos de infección en los lotes de semillas.



Figura 9. Síntomas típicos de cancro bacteriano en una planta de tomate de 8 semanas generada a partir de una semilla artificialmente inoculada con un nivel de infección de 10^2 ufc/semilla de *Cmm*.

En cuanto a la evaluación de las metodologías para detección de *Cmm* en plántulas, se siguió el esquema de la Figura 2. En este caso, las metodologías de qPCR directa y BIOqPCR también mostraron resultados similares en cuanto a su sensibilidad. Sin embargo, no se obtuvieron los mismos resultados al analizar los cotiledones y la parte aérea de la planta. Mientras que en cotiledones fue posible la detección de *Cmm* en plantas provenientes de semillas infectadas con 10^4 y 10^5 ufc, en la parte aérea de la planta se detectó hasta en las de 10^2 ufc. Estos resultados preliminares sirven como punto de partida para diseñar un protocolo de diagnóstico de *Cmm* a nivel de viveros.

Las metodologías desarrolladas en este trabajo podrán ser transferidas a otras instituciones (INASE, INIA, etc.) para su aplicación a la evaluación de la calidad fitosanitaria de semilla y plántulas de tomate. De esta forma se pretende lograr un mejor aprovechamiento de las plataformas tecnológicas disponibles actualmente en nuestro país, disminuyendo el impacto que tiene actualmente esta importante enfermedad para el sector hortícola nacional.

Agradecimientos.

Se agradece la colaboración de la Dra. E. Silvera (Facultad de Agronomía) y el Ing. Agr. Enrique Verdier (MGAP) por el aporte de aislamientos de *Cmm* utilizados en este estudio. También se agradece al Ing. Agr. Federico Boschi (INASE) por el aporte de lotes de semilla de tomate para la evaluación de las metodologías de diagnóstico de *Cmm* y por discusiones e ideas aportadas en relación a este trabajo. Por último, queremos agradecer a la Dra. Marie-Agnés Jacques (INRA-Angers, Francia) y al Dr. Leandro de León (INIA-Madrid, España) por recibir a la estudiante V. Croce para realizar estancias de investigación en sus respectivos laboratorios. Fuentes de financiamiento: Proyecto CSIC Grupos I+D N°652 (2011-2015), PEDECIBA (Beca de movilidad para que V. Croce realice una pasantía en INIA-Madrid, 2015), ANII (Beca de Maestría, V. Croce, 2013-2015).

Referencias Bibliográficas.

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. 5th ed. University of Florida. Elsevier Academic Press, p 651-653.
- Almeida NF, Yan S, Cai R, Clarke CR, Morris CE, Schaad NW, et al. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*. 100:208–215.
- Araújo ER, Costa JR, Ferreira MASV and Quezado-Duval AM. 2012. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. *J Appl Microbiol*, 113: 1479-1490.
- Berrueta C, Giménez G, Galván G, Borges A. 2014. Componentes de resistencia a *Xanthomonas vesicatoria* raza T2 en genotipos de tomate en condiciones de invernadero y cámara de crecimiento. *Agrociencia Uruguay*, 18(1): 86-96.
- Chang RJ, Ries SM, Pataky JK. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology* 81: 1276-1281.
- Croce V, Pianzola MJ, Durand K, González-Arcos M, Jacques MA, Siri MI. 2015. Multilocus Sequence Typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains affecting tomato crops in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-015-0738-0.
- de León L, Siverio F, Lopez MM, and Rodriguez A. 2008. Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection* 27: 1277-1283.
- de León L, Siverio F, López MM, Rodríguez A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant disease*, 95: 1328–1339.
- Eichenlaub R, Gartemann KH, and Burger A. 2006. *Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria. Pages 385-421 in: Plant-Associated Bacteria. S. S. Gnanamanickam, ed. Springer, The Netherlands.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013. EPPO Standards Diagnostic PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPPO Bulletin* 43, 46–67.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2015. EPPO-PQR (Plant Quarantine Data Retrieval system). Available online: www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm
- Fatmi M and Schaad NW. 1988. Semiselective Agar Medium for Isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganense* from Tomato Seed. *Phytopathology* 78: 121-126.
- Gitaitis R, Beaver RW, Voloudakis AE. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*. 75: 834-838.
- Jacques MA, Durand K, Orgeur G, Balidas S, Fricot C, Bonneau S, et al. 2012. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23): 8388–8402.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. 2004. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 755 - 762.
- Hall T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*.

- ISF (International Seed Federation). 2015. Method for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato seed. Version 4.3, September, 2015, online, http://www.worldseed.org/isf/detection_methods.html.
- Jibrin MO, Timilsina S, Potnis N, Minsavage GV, Shenge KC, Akpa AD, Alegbejo MD, Beed F, Vallad GW, and Jones JB. 2015. First report of atypical *Xanthomonas euvesicatoria* strains causing bacterial spot of tomato in Nigeria. *Plant Disease*, 99(3): 415-415.
- Kleitman F, Barash I, Burger A, Iraki N, Falah Y, Sessa G, et al. 2008. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4): 463–475.
- Mhedbi-Hajri N, Hajri A, Boureau T, Darrasse A, Durand K, Brin C, Fischer-Le Saux M, Manceau C, Poussier S, Pruvost O, Lemaire C and Jacques MA. 2013. Evolutionary history of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas axonopodis*. *PLoS ONE* 8(3): e58474.
- Montelongo MJ. 2012. Caracterización de *Xanthomonas spp.* causantes de la mancha bacteriana del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Uruguay [Tesis de Maestría]. Montevideo: Facultad de Agronomía. 70p.
- Sambrook J Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A laboratory manual,. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sen Y, van der Wolf J, Visser RGF, van Heusden S. 2015. Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance and interactions. *Plant Disease* 99 (1): 4 - 13.
- Sharabani G, Manulis-Sasson S, Borenstein M, Shulhani R, Lofthouse M, Chalupowicz L and Shtienberg D. 2013. The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato Greenhouses. *Plant Pathology*, 62: 578–586.
- Timilsina S, Jibrin MO, Potnis N, Minsavage GV, Kebede M, Schwartz A, Bart R, Staskawicz B, Boyer C, Vallad GE, Pruvost O, Jones JB, Goss EM. 2015. Multilocus sequence analysis of xanthomonads causing bacterial spot of tomato and pepper plants reveals strains generated by recombination among species and recent global spread of *Xanthomonas gardneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 1520–1529.
- Valasek MA and Repa JJ. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29: 151-159.

BUSCANDO NUEVAS HERRAMIENTAS PARA CONTROLAR UN VIEJO ENEMIGO: EMPLEO DEL RECEPTOR EFR EN TOMATE PARA EL CONTROL DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*.

Marco Dalla Rizza¹, Sara Murchio¹, Vilma Wallace², Federico Boschi³, Matías Maidana¹, Claudia Schvartzman¹, Gustavo Giménez² y Diego Maeso²

¹Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas

²Programa Nacional de Horticultura, INIA Las Brujas

³INASE

Introducción

La ingeniería genética es considerada una herramienta más dentro del mejoramiento genético de plantas que puede facilitar la disponibilidad de genes cercanos o lejanos de la especie introducidos en su genoma mediante técnicas biotecnológicas. Una de las principales ventajas de esta herramienta es mejorar en las plantas alguna característica de interés productivo, de manejo y de resistencia a estrés, plagas y enfermedades, entre otras, utilizando un rango de genes más amplio.

Cada una de las variantes de la integración del transgén que se encuentran en plantas transformadas se denomina *evento*. Los eventos pueden diferir en la posición del transgén en el genoma, el número de copias y el nivel de integridad del transgén. El desarrollo de los eventos transgénicos puede ser limitado por muchos factores incluyendo los niveles de expresión, la estabilidad de la inserción y su herencia, y la identificación de eventos simples de inserción. Cuando se realiza una transformación genética generalmente se obtienen plantas hemicigotas T0 (el transgén se inserta sin una contraparte alélica) que sucesivamente deben pasar por una serie de cruzamientos dirigidos para obtener plantas homocigotas pasando simultáneamente por un proceso de selección buscando inserciones simples, con alta expresión de la característica y estable. En el caso de tomate, después de la inserción del transgén (evento primario T0), se realizan autofecundaciones sucesivas hasta llegar a T3/T4 para obtener progenies con alto porcentaje de homocigosis para el carácter deseado.

El cancro bacteriano del tomate es causado por el actinomicete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y es una de las enfermedades más importantes del cultivo en Uruguay. El mejoramiento genético presenta algunas soluciones con fuentes parciales de resistencia en especies emparentadas. El control químico de estas enfermedades es prácticamente imposible de realizar, ya que los pesticidas estudiados han mostrado muy baja efectividad. El patógeno sobrevive en la semilla en bajos niveles y este medio es la principal fuente de transmisión del inóculo primario. Sin embargo, cuenta con una diseminación muy eficiente a través del agua y las labores que se realizan sobre el cultivo por lo que una vez introducido, la infección se generaliza rápidamente y se pierde el cultivo en su totalidad (Xu et al. 2013). La enfermedad suele encontrarse en forma latente y los síntomas se desarrollan una vez que la planta alcanza la madurez. Los mismos comienzan con el marchitamiento unilateral y la posterior necrosis de las hojas basales. Luego la enfermedad asciende y finalmente la planta se marchita completamente. Este marchitamiento puede estar acompañado de canchros en tallos y pecíolos y manchas necróticas en los folíolos. Además se suelen observar síntomas derivados de la transmisión secundaria los cuales se manifiestan como necrosis marginal de la lámina.

El receptor EFR proveniente de *Arabidopsis thaliana* es un receptor de membrana que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos el que puede detectar bacterias fitopatógenas. El reconocimiento del factor de elongación EF-Tu de la bacteria desencadena la resistencia basal de la planta. Lacombe et al., (2010) han reportado que la transferencia de este gen *efr* a plantas de tomate ha sido exitosa para aumentar el grado de resistencia al cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris*. El objetivo de este trabajo es profundizar en la caracterización de la transformación con este gen hacia la generación de variantes de tomate resistentes a *Clavibacter michiganensis*. Particularmente, determinar el porcentaje de plantas transformadas de tomate en T2 y T3 que presentan el gen *efr* de *A. thaliana* obtenidas mediante autofecundación y realizar una primera evaluación de inoculación con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Metodología

Plantas de tomate de la variedad Milongón fueron transformadas en The Sainsbury Laboratory (UK) con una construcción para expresión del gen *efr*. En enero de 2015 se recibieron semillas de líneas T1 y T2 de tomate transformadas con esta construcción (Líneas 4, 6, 16, 20, 29) las que se sembraron en almacigueras en tierra tref estéril y adecuada fertilización para completar el ciclo y poder cosechar la semilla bajo estrictas normas de bioseguridad.

Lo primero que se debe estudiar en este método de mejoramiento genético es la presencia del transgén en cada línea de mejoramiento. Se constató la presencia del inserto mediante PCR con primers específicos para *efr* a partir de ADN genómico de plantas transformadas T2 y T3 y de plantas control sin transformar (WT). Como control de amplificación se empleó gen endógeno de papa lat52 en la misma reacción de PCR.

Se evaluó la respuesta de los eventos a la infección por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mediante inoculación con este microorganismo y seguimiento de los síntomas. Para ello inicialmente se inocularon plantas T2 por el método de punción axilar con 10^8 UFC/ml de la cepa 17 LB de Cmm de la colección del laboratorio de Fitopatología de INIA LB (16/4/2015). Las plantas fueron mantenidas en cámara húmeda embolsadas en plástico 24 horas antes y después de la inoculación (Figura 1).

Las condiciones de temperatura y humedad relativa en la cámara donde se llevó a cabo el experimento fueron registradas mediante un equipo ibutton Hygrochrom. Los valores promedio diarios se muestran en la figura 2. La temperatura se mantuvo cercana a 20°C y la HR superior a 70% siendo valores adecuados para el desarrollo de la enfermedad.

En el Cuadro 1 se describen los materiales inoculados y sus características.

Cuadro 1. Materiales de tomate Milongón transformado inoculados con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Línea	N° de plantas	
	Con inserto	Sin inserto
16	12	1
20	5	0
6	12	7
4	14	14
29	20	6

Al mismo tiempo se inocularon cuatro plantas sin modificar con el patógeno y dos con agua estéril.



Figura 1. Colonias Cmm, solución para inoculación, método de inoculación, pos inoculación



Figura 2. Promedio diario de temperatura y humedad relativa durante el experimento.

Los primeros síntomas aparecieron a los 18 días pos inoculación y se evaluaron externa e internamente.

Se registró el número de plantas con: 1) necrosis de la zona de inoculación, 2) amarillamiento de hojas inferiores, 3) marchitamiento de hojas inferiores, 4) necrosado de bordes de hojas, 5) marchitamiento de la mitad de hojas, 6) marchitamiento apical, 7) líneas en tallo y 8) canchros entre los 18-32 dpi.

A 35 dpi (21/5/2015) se cortaron longitudinalmente los tallos de las plantas inoculadas y se evaluó el estado de vasos y médula. Los 5 cm correspondientes al sector inoculado fueron conservados en heladera y fueron analizados mediante la prueba ELISA utilizando el antisuero monoclonal para CMM comercializado por AGDIA Inc. siguiendo el protocolo recomendado por la empresa.

Los síntomas se clasificaron en: a) tejido esponjoso no necrosado, b) médula amarronada, c) vasos amarronados, y d) puntos marrones en la sección.

Se calculó el porcentaje de plantas que presentaban cada tipo de síntomas en cada línea con y sin inserto. También se analizó el porcentaje de plantas que presentaban al menos uno de estos síntomas.

A los 70 dpi (25/6/2015) se evaluó el porcentaje de plantas que habían rebrotado luego del corte y el estado del tejido vascular y médula restante. Algunas de esas plantas fueron analizadas por ELISA.

Resultados y Discusión

Se analizaron en promedio 30 plantas por línea en las generaciones T2 y T3. La mayoría de líneas de plantas analizadas presentaron el inserto del gen EFR cuando se realizó la amplificación por PCR con primers específicos a diferencia de las plantas WT, control donde no se observó la presencia del transgén (Fig. 1). En algunas de las plantas analizadas no se observó presencia del inserto lo que puede deberse a que las plantas analizadas corresponden a la generación T2 y T3 donde en cada autofecundación el inserto está segregando. Es esperable observar un aumento del porcentaje de plantas transformadas al incrementar el número de autofecundaciones (Tabla 1).

Cuadro 2. Porcentaje de plantas transformadas determinado en líneas transformadas de tomate para las generaciones T2 y T3 determinadas mediante PCR.

Porcentaje /Línea	4	6	16	20	29
T2	60	59	84	67	80
T3	90	80	100	90	85

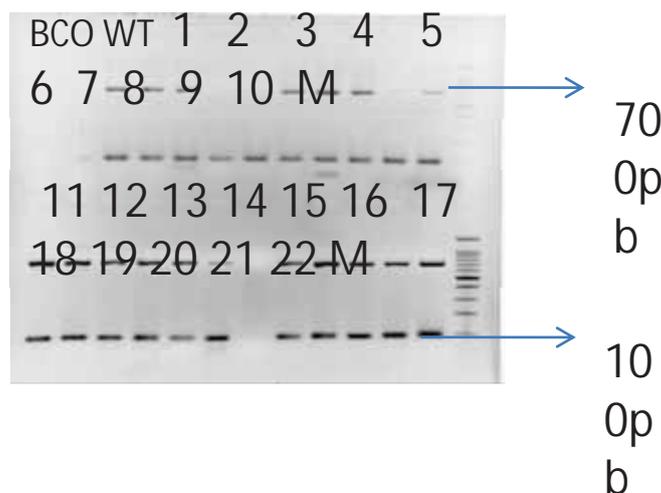


Figura 3. Productos de amplificación del gen *efr* (peso aproximado de banda 700 bp) y del gen endógeno *lat 52* de tomate (peso aproximado de banda 100 pb) observados en la línea 4, generación T3.

De acuerdo a lo esperado, al aumentar el número de autofecundaciones se obtienen proporciones mayores de plantas con el gen *efr* y se espera asimismo un aumento de la frecuencia de plantas homocigotas.

Las inoculaciones realizadas en las plantas T2 no mostraron diferencias importantes entre los controles sin transformar y los eventos analizados. Esto pudo deberse a que el método de inoculación fue muy agresivo y a que el material no tiene el transgén en homocigosis. Actualmente se está evaluando la inoculación de plantas T3 mediante corte de raíces, el cual se asemeja a la infección en campo.

Cuadro 3. Porcentaje de plantas con síntomas en la evaluación final.

	Amarillamiento hoja inferior	Marchitamiento hoja inferior	Necrosis borde hojas	Marchitez foliar unilateral	Marchitez apical	Necrosis zona inoculada	Líneas en tallo	Cancro
Sin inserto	96	100	96	100	61	89	82	89
Con inserto	100	97	100	94	57	86	70	75
Testigo inoculado	100	100	100	100	50	100	100	25

Cuadro 4. Días promedio a aparición de síntomas.

	Amarillamiento hoja inferior	Marchitamiento hoja inferior	Necrosis borde hojas	Marchitez foliar unilateral	Marchitez apical	Necrosis zona inoculada	Líneas en tallo	Cancro
Sin inserto	22	26	23	24	26	21	26	28
Con inserto	21	24	24	26	25	22	27	28
Testigo inoculado	18	18	24	21	26	18	25	31

Perspectivas y estudios a futuro

En la estación de INIA Las Brujas se están realizando ensayos de investigación en el cual se inocula la planta con la bacteria patógena para evaluar su respuesta de resistencia a la enfermedad. Los resultados preliminares obtenidos estimulan a continuar desarrollando el mejoramiento genético por este camino. En futuras etapas del mejoramiento se realizarán nuevos ensayos para observar respuesta a patógenos.



Figura 4. Síntomas de cancro bacteriano observados durante el experimento. Primer fila izquierda a derecha: a) necrosis zona inoculada, b) amarillamiento hojas basales, c) marchitamiento hoja basal, segunda fila de izquierda a derecha: d) necrosis de borde de hoja, e) marchitamiento de mitad de hoja, f) marchitamiento apical, tercer fila de izquierda a derecha: g) líneas en tallos y h,i) cancro.

Referencias Bibliográficas

Arruabarrena A, Stransfeld L, Dalla Rizza M, C Zipfel 2014. Caracterización de líneas de tomate transformadas con el gen *efr*. Serie Actividades de Difusión N° 741. VIII Jornada de Agrobiotecnología INIA.

Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BP, Staskawicz B, Jones JDG, Zipfel C. 2010. Interfamily transfer of a plant

pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. Nat Biotechnol 28: 365–369.

Xu X, Rajashekara G, Pierce P and S. Miller 2011. Colonization of tomato seedlings by bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* under different humidity regimes. Phytopathology, 102, 177-184.

EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES PARA PREVENIR LA TRASMISIÓN DE *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS* EN TOMATE MEDIANTE TIJERAS DE PODA

Maeso Diego¹, Walasek Wilma¹, Fernández Alfredo¹

¹ INIA Las Brujas. Ruta 48 km 10, Rincón del Colorado, 90200 Canelones, Uruguay. Correo electrónico: dmaeso@inia.org.uy

Palabras clave: cancro bacteriano, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, desinfectantes.

Introducción

El cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) es una enfermedad importante del cultivo del tomate (Strider, 1969; Davis *et al.*, 1984). Provoca marchitamiento, muerte de plantas y pérdidas en la producción. Dada la facilidad con que se disemina esta enfermedad por labores y la prolongada latencia de la infección (Chang *et al.*, 1992), niveles muy bajos de infección de semillas (0,01 %) pueden traducirse en importantes epidemias en cultivo (Chang *et al.*, 1991; Gitaitis *et al.*, 1991). Hasta el momento, en Uruguay no existen cultivares resistentes disponibles a nivel comercial con capacidad de reemplazar a los usados actualmente, por lo que el control de la enfermedad se basa en la prevención utilizando semilla libre del patógeno y evitando su diseminación.

En el cultivo de tomate para consumo fresco se realizan tareas de desbrotado y deshoje utilizando tijeras o navajas, las cuales generan heridas y favorecen la transmisión de Cmm. Tradicionalmente, las herramientas de poda y deshoje se desinfectan con hipoclorito de sodio. Sin embargo, algunos productores lo han reemplazado por otros desinfectantes buscando superar algunas de las limitantes del hipoclorito (efecto corrosivo, inactivación por materia orgánica y fotosensibilidad, entre otras). El presente trabajo tuvo como objetivo comparar la efectividad de varios productos desinfectantes usados por productores de tomate en Uruguay en la prevención de la transmisión de Cmm mediante tijeras.

Materiales y métodos

Material vegetal y tratamientos evaluados

Tomate cultivar Loica, de aproximadamente 50 días de edad (seis hojas extendidas).

Las plantas fueron cultivadas en macetas con sustrato esterilizado (autoclavado a 121 °C por 20 minutos), utilizando semilla desinfectada (inmersión en agua caliente a 50 °C por 25 minutos) en un invernadero con control de temperatura (20-28 °C).

Las plantas fueron cubiertas con bolsas de polietileno por 48 h previo a la aplicación de los tratamientos, y reembolsadas por 48 h luego de aplicarse los mismos.

Los tratamientos evaluados se muestran en el Cuadro 1. Se utilizó un tubo individual con la solución desinfectante para cada planta.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados

Tratamiento	Principio activo	Dosis ¹
1. Sin inoculación	---	---
2. Sin desinfección	---	---
3. Hipoclorito de sodio	Hipoclorito de sodio	1% de cloro activo
4. Virkon S	Monopersulfato potásico (sal triple) 50%	1%
5. Desinfectante a base de iodo Perrin	Agentes tensoactivos en complejo con iodo, 0,8-0,9% de iodo libre o titulable	0,15%
6. Sporekill	Cloruro de didecildimetilamonio 120 g/L (compuesto de amonio cuaternario)	1%

Cultivo de Cmm y preparación de inóculo

Se utilizó la cepa de Cmm LB 17 de la colección del laboratorio de fitopatología de INIA Las Brujas. Para la preparación del inóculo la cepa seleccionada se cultivó en agar nutritivo dextrosado y se resuspendió en agua estéril.

Experimento 1: Transmisión de Cmm a partir de una suspensión bacteriana

La trasmisión se realizó empleando tijeras sin uso previo de 140 mm de hoja las cuales fueron sumergidas durante diez segundos en la suspensión de Cmm e inmediatamente después en las soluciones del tratamiento correspondiente. Posteriormente, se realizó un corte en el tallo de las plantas de tomate a la altura del primer par de hojas completamente desarrolladas. La tijera fue sumergida en agua estéril en el caso del tratamiento testigo. Las plantas de cada unidad experimental fueron inoculadas con una misma solución bacteriana y una única tijera. La concentración del inóculo fue ajustada a una densidad óptica de 0,1 a 530 nm correspondiente a $1,9 \times 10^8$ ufc ml⁻¹, concentración corroborada posteriormente con el método de dilución en placas.

Experimento 2: Transmisión Cmm a partir de plantas enfermas

La trasmisión fue realizada a partir de las plantas enfermas del tratamiento sin desinfección del experimento 1 o plantas sanas para el tratamiento sin inocular. Para ello se realizaron tres cortes sucesivos en los tallos de las plantas infectadas. Inmediatamente las tijeras fueron sumergidas en las soluciones desinfectantes o en agua estéril según el tratamiento correspondiente. Luego se realizó un corte en el tallo de las plantas de tomate a la altura del primer par de hojas completamente desarrolladas.

Evaluación de la transmisión

Presencia de síntomas externos a los 14 días post tratamiento (marchitamiento, necrosis foliar, emisión de raíces aéreas, amarillamiento). Los datos fueron expresados en porcentaje de plantas enfermas en cada repetición.

A los 42 días de establecidos los tratamientos, los tallos de todas las plantas fueron cortados en forma longitudinal y se observó el estado de su sistema vascular registrándose el porcentaje de plantas que presentaban amarronamiento de vasos y/o médula. Se conservaron secciones de 5 cm de longitud a partir del punto de inoculación para confirmar la presencia de Cmm mediante aislamiento (experimento de transmisión por suspensión bacteriana) o por serología (ambos experimentos).

En el experimento de transmisión por suspensión bacteriana una parte de las secciones de tallo fue desinfectada superficialmente con alcohol 70 % y sumergida por dos horas en 10 ml de agua estéril. Esa suspensión fue sembrada en una placa con agar nutritivo dextrosado. A las 48 h se registró el número de placas en las que crecieron colonias con características similares a Cmm (aparición y Gram positivas), registrándose el porcentaje de plantas a partir de las cuales se aisló este tipo de colonias.

En ambos experimentos, parte de las secciones obtenidas fueron utilizadas para la detección de Cmm por la prueba DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) empleando el antisuero monoclonal MAb Cmm1 (Alvarez *et al.*, 1993; Kaneshiro *et al.*, 2006) incluido en el kit comercializado por AGDIA Inc. (Elkhard, IN46514, EEUU). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante y se calculó el porcentaje de plantas en que se detectó serológicamente Cmm.

Diseño y análisis estadístico

En total se inocularon 120 plantas por tratamiento distribuidas en seis repeticiones de veinte plantas por unidad experimental. Se usó un diseño de bloques completos al azar y cada bloque correspondió a una misma mesa en el invernadero. En cada mesa las plantas fueron colocadas con una separación entre tratamientos de aproximadamente 0,5 m. Los datos fueron sometidos a un análisis de variancia y cuando este indicó efecto significativo del tratamiento ($P > 0,01$) se procedió a la separación de medias mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. Previo a su análisis estadístico los datos en porcentaje fueron transformados por la fórmula $\text{arc sen } \sqrt{\%}$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa de acceso libre Infostat (www.infostat.com.ar).

Resultados

Experimento 1:

En el experimento de transmisión de Cmm a partir de una solución bacteriana los mayores porcentajes de plantas con síntomas, tanto externos como internos, se observaron en el testigo sin desinfectar y en el tratamiento con el desinfectante a base de iodo, siendo superiores al 85 %. El tratamiento con hipoclorito de sodio no difirió estadísticamente del testigo sin inoculación no presentando síntomas externos y solamente 3 % de plantas con haces vasculares necrosados. Los tratamientos con Sporekill® y Virkon S® exhibieron valores intermedios en la evaluación de síntomas (Cuadro 2).

En el 20 % de las plantas del testigo sin inocular y en el 50 % de las correspondientes a la desinfección con Virkon S® se aislaron colonias bacterianas similares a Cmm que no reaccionaron serológicamente con el antisuero específico para este patógeno. En el 95 % de las plantas correspondientes al testigo sin tratar y a la desinfección con el desinfectante a base de yodo se aislaron bacterias similares a Cmm y en el 100 % de las plantas se detectó al patógeno mediante serología. Estos valores no se diferenciaron estadísticamente del 45 % de plantas con detección serológica de Cmm encontrado en el tratamiento con hipoclorito.

En el testigo sin inocular y en las plantas con desinfección con Virkon S® no se detectó serológicamente Cmm no existiendo diferencias significativas con el 10 % de detección en el tratamiento con Sporekill®.

Cuadro 2. Porcentaje de plantas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) transmitido mediante tijeras infectadas con una solución bacteriana estimado a través de la presencia de síntomas y serología¹.

Tratamiento	Plantas con síntomas de Cmm(%)		Plantas con aislamiento de colonias bacterianas (%) ⁴	DAS-ELISA positivo para Cmm (%) ⁵
	Externos ²	Haces vasculares ³		
1. Sin inoculación	0 a ⁶	0 a	20 a	0 a
2. Sin desinfección	87 c	90 d	95 c	100 c
3. Hipoclorito de sodio	0 a	3 ab	15 a	45 b
4. Virkon S	57 b	17 bc	50 b	0 a
5. Desinfectante a base de yodo Perrin	100 c	97 d	95 c	100 c
6. Sporekill	17 b	27 c	25 ab	10 a
CV (%)	32	35	35	30

¹ Todos los datos en porcentajes fueron corregidos por la fórmula $\arcsin \sqrt{v\%}$ para su análisis estadístico.

² Síntomas externos asociados con Cmm (marchitamiento, necrosis foliar, raíces aéreas, amarillamiento).

³ Deterioro de los haces vasculares y/o médula en corte longitudinal.

⁴ Aislamiento de colonias similares a Cmm a partir de la sección longitudinal de los 5 cm siguientes al corte usado en la inoculación.

⁵ Detección de Cmm mediante la prueba DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) en las muestras vegetales.

⁶ Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 1%.

En el experimento de transmisión a partir de plantas, los mayores porcentajes de transmisión también se observaron en el testigo sin desinfectar y en el tratamiento con el desinfectante a base de yodo. El porcentaje de plantas con síntomas fue superior al 85 % diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos. Nuevamente, el tratamiento con hipoclorito de sodio no fue significativamente diferente del testigo sin inocular expresando solo 3 % de plantas con haces vasculares necrosados. Los tratamientos con Sporekill® y Virkon® tuvieron valores intermedios con 17-27 % de las plantas con síntomas pero diferenciándose significativamente del testigo sin desinfección (Cuadro 3).

En el 100 % de las plantas del testigo sin desinfección y en las del tratamiento desinfectante a base de iodo se detectó Cmm mediante análisis serológico. No se detectó Cmm por serología en las plantas sin inocular y en las con desinfección por hipoclorito, mientras que en los tratamientos con Virkon S® y Sporekill® Cmm fue detectado en el 35 y 15 % de las plantas diferenciándose estadísticamente entre sí (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de plantas con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) transmitido mediante tijeras infectadas a partir de plantas enfermas estimado a través de la presencia de síntomas y serología¹.

Tratamiento	Plantas con síntomas de Cmm (%)		DAS-ELISA positivo para Cmm (%) ⁴
	Externos ²	Haces vasculares ³	
1. Sin inoculación	0 a ⁵	0 a	0 a
2. Sin desinfección	87 c	90 d	100 d
3. Hipoclorito de sodio	0 a	3 ab	0 a
4. Virkon S	23 b	17 bc	35 c
5. Desinfectante a base de iodo Perrin	100 c	97 d	100 d
6. Sporekill	17 b	27 c	15 b
CV (%)	32	35	22

¹ Todos los datos en porcentajes fueron corregidos por la fórmula $\arcsin \sqrt{\%}$ para su análisis estadístico.

² Síntomas externos asociados con Cmm (marchitamiento, necrosis foliar, raíces aéreas, amarillamiento), 14 días después de la inoculación.

³ Deterioro de los haces vasculares y/o médula en corte longitudinal, 42 días después de la inoculación.

⁴ Detección de Cmm mediante la prueba DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) en las muestras vegetales, 42 días después de la inoculación.

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

Discusión

Los resultados obtenidos confirman la importancia de la transmisión de esta enfermedad mediante los elementos de corte normalmente utilizados en el cultivo. En ambos experimentos se obtuvo una infección cercana al 100 % al utilizar tijeras contaminadas con el patógeno. En algunos casos este porcentaje se redujo si las tijeras fueron sumergidas en las soluciones desinfectantes previo al corte de plantas sanas. La transmisión obtenida utilizando una solución bacteriana o una planta enferma como fuente de inóculo fue muy similar.

Ninguno de los desinfectantes evaluados logró prevenir totalmente la transmisión de Cmm. Eso concuerda con lo expresado por Kleinhempel *et al.* (1987) quienes sostienen que aún los mejores métodos de desinfección y limpieza son inefectivos para eliminar totalmente bacterias de las herramientas de corte. Según estos autores en las superficies de la hoja de corte existen orificios microscópicos de los cuales el exudado bacteriano no puede ser quitado. Otro aspecto

que pudo haber perjudicado el desempeño de los desinfectantes en este trabajo fue el tiempo de contacto con el material a desinfectar, el cual debe ser por lo menos de diez minutos (Mebalds *et al.*, 1997; van der Wolf *et al.*, 2005; Teviotdale *et al.*, 1991). Por ello, una desinfección rápida como la que se realiza entre plantas durante las labores de desbrote y deshoje en un cultivo comercial no sería suficiente para prevenir la trasmisión.

Sin embargo, en este trabajo se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de desinfección entre los tratamientos evaluados. Al respecto se destacan los tratamientos en los que la desinfección de herramientas fue efectuada con hipoclorito de sodio, Virkon S® y Sporekill®. Los tres tratamientos presentaron los menores porcentajes de plantas con síntomas externos e internos y de presencia de Cmm detectada por la prueba DAS-ELISA frente al testigo sin desinfección coincidiendo con lo observado por Baysal-Gurel *et al.*, 2010.

Si bien la prevención de la trasmisión no fue total y se mantiene el riesgo de diseminación de la enfermedad, se debe tener en cuenta que en este trabajo se utilizaron fuentes de inóculo con alta concentración de bacterias. Según Thyr, 1968, Meletzus *et al.* 1993 y Garteman *et al.*, 2003, la aparición de síntomas depende de la población bacteriana colonizando el huésped. Cmm puede vivir como endófito en la planta de tomate pero para ocasionar síntomas debe superar una población de 10^8 cfu/g de tejido además de poseer algunos plásmidos involucrados en la patogenicidad (Meletzus *et al.* 1993). A ese nivel la bacteria es capaz de provocar la alteración física del xilema lo cual junto a la producción de extrapolisacáridos impide la normal circulación de agua.

En un cultivo comercial las plantas con síntomas seguramente son eliminadas previamente al deshoje o desbrote o no se realizan labores en el resto del cultivo usando la misma herramienta.

A pesar de que en trabajos se obtuvieron buenos resultados utilizando desinfectantes a base de iodo para *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Koponen *et al.*, 1992), en nuestro estudio la solución de iodo jabonosa empleada no tuvo efecto en la prevención de la trasmisión. Los valores obtenidos fueron muy similares a los del testigo sin desinfección, por lo que su uso no sería recomendable en cultivos comerciales para ese fin. Probablemente la diferencia radique en la naturaleza química de los compuestos a base de iodo evaluados.

De acuerdo a los resultados obtenidos de mantenerse las condiciones de uso (tiempo de acción) el mejor desinfectante para evitar la trasmisión por tijeras es la solución de hipoclorito de sodio. Sin embargo, en las condiciones de campo deberán tenerse en cuenta la pérdida de su efectividad por fotodegradación o por acumulación de materia orgánica, aspectos que no son mencionados como limitantes para los otros productos evaluados. Una alternativa para mejorar el desempeño de esta medida puede ser el uso de múltiples tijeras de forma de aumentar el tiempo de permanencia en la solución desinfectante.

De todas formas la falta de prevención total de la trasmisión hace imprescindible que esta medida sea incluida como parte de un manejo integrado de la enfermedad y no en forma aislada.

En este trabajo se encontraron diferencias entre los porcentajes de infección con Cmm estimados mediante el aislamiento en medio de cultivo, serología y presencia de síntomas. La utilización de medios de cultivo que no fueron semiselectivos, tal como se recomienda para la detección de este patógeno (OEPP/EPP, 2003), permitió el aislamiento de bacterias con colonias similares a Cmm pero que no correspondían al patógeno en estudio, aún en el tratamiento testigo sin infectar. Kaneshiro *et al.* (2006) mencionan varias bacterias similares a Cmm aisladas de tomate que no reaccionan con el antisuero monoclonal Cmm1 (*Microbacterium saperdae*, *M. laevaniformans*, *Sanguibacter keddieii*, *Curtobacter citreum*, *C. pusillum*).

El hecho de que los porcentajes de detección de Cmm por ELISA fueran mayor que los porcentajes de plantas con síntomas visibles en los tratamientos puede ser debido a la ocurrencia de un período de latencia prolongado (Tsiantos, 1987, Chang *et al.* 1992) y/o a su presencia como endófito sin llegar a concentraciones que hayan causado síntomas (Thyr, 1968, Meletzus *et al.* 1993 y Garteman *et al.*, 2003).

Bibliografía

Alvarez, A, Derie, M, Benedict, A, Gabrielson, R. 1993. Characteristics of a monoclonal antibody to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 83:1405.

Ark, PA. 1944. Studies on bacterial canker of tomato. *Phytopathology*, 34:394-400.

Baysal-Gurel, F, Xu, X, Rajashekara, G, Miller, SA. 2010. Effect of disinfectants on transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during grafting. *Phytopathology* 100:S13.

Carlton, WM, Gleason, ML, Braun, EJ. 1994. Effects of pruning on tomato plants supporting epiphytic populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 78:742-745.

Chang, RJ, Ries, SM, Pataky, JK. 1992. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Disease*, 76:1150-1155.

Chang, RJ, Ries, SM, Pataky, JK. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81:1276-1281.

Davis, MJ, Gillespie, AG, Vidaver, AK, Harris, RW. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 107- 117.

Gartemann, KH, Kirchner, O, Engemann, J, Gräfen, I, Eichenlaub, R, Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106: 179-191

Gitaitis, RD, Beaver, RW, Voloudakis, AE. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*, 75:834-838.

Gleason, ML, Braun, EJ, Carlton, WM, Peterson, RH 1991. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, 81:1519-1523.

Kaneshiro W, Mizumoto C, Alvarez A. 2006. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 45 – 56

Kleinhempel, H, Nachtigall, M, Ficke, W, Ehrig, F. 1987. Disinfection of pruning shears for the prevention of the fire blight. *Acta Horticulturae*, 217:211-218.

Koponen, H, Manninen, M, Harji, P, Avikainen, H, Rahvonen, R. 1992. The effect of disinfectants on *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* and *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* on different surface materials. *Agricultural Science in Finland*, 1(6): 597-602.

Lelliot R, Stead D. 1987. Methods in Plant Pathology : Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Vol. 2. Oxford : Blackwell Scientific Publications. 216p.

Mebalds, M, Tregua W, van der Linden, A. 1997. Disinfection protocols for equipment used in the nursery industry. Horticultural Research & Development Corporation. Australia. NY 612. 65 p.

Meletzuz, D, Bermpohl, A, Dreier, J, Eichenlaub, R. 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Journal of Bacteriology 175 (7): 2131-2136.

OEPP/EPPO. 2003. Quarantine pest Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003 Data Sheets on Quarantine Pests. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Consultado agosto 2011. Disponible en: http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_ds.pdf.

Strider, DL. 1969. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, 193.

Teviotdale, BL, Wiley, MF, Harper, DH. 1991. How disinfectants compare in preventing transmission of fire blight. California Agriculture, 45:21-23.

Thyr, BD. 1968. Bacterial canker of tomato: Inoculum level needed for infection. Plant Disease Reporter 52:741-743.

Thomas, RC. 1930. The canker disease of tomato. Ohio Agricultural Experiment Station Bulletin, 145:116-122.

Tsiantos J. 1987. Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *Journal of Phytopathology*, 119: 142 - 146.

van der Wolf, JM, Elphinstone, JG, Stead, DE, Metzler, M, Müller, P, Hukkanen, A and Karjalainen, R. 2005. Plant research international Wageningen Report 95. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. [En línea] Consultado 6 junio 2014. Disponible en: <http://edepot.wur.nl/39352>

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

Maeso, D.C.¹; Walasek, W.¹; Fernández, A.¹

¹ 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 cámara de crecimiento (26 °C, 16 hs luz 8 hs oscuridad) e invernadero de vidrio sin calefaccionar (18-24 °C). 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 realizaron 3 aplicaciones semanales pre inoculación y 3 pos inoculación. Se usó un diseño de bloques al azar con tres repeticiones, con cuatro plantas por parcela. Se evaluó el porcentaje de plantas enfermas desde los 13 días posinoculación (dpi). A los 28 (cámara) y 38 (invernadero) dpi se registró el estado de vasos y médula en corte longitudinal de tallos. Hasta 24 dpi Bio D, EM, y Biorend presentaron los menores porcentajes de plantas enfermas en cámara no diferenciándose estadísticamente con el testigo sin inocular. Biorend presentó el menor porcentaje de distorsión en corte de tallos seguido por Nacillus y Bio D. En invernadero el menor porcentaje de plantas enfermas hasta 27 dpi se obtuvo con Nacillus y Bio D. Bio D presentó el menor porcentaje de plantas con distorsión en tallos. DAS-ELISA confirmó la infección en todas las plantas salvo en las no inoculadas. Si bien los resultados de estos experimentos en maceta deberán ser confirmados en condiciones de cultivo 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 (rafia, tutores, etc.). Se han realizado múltiples trabajos de investigación sobre aspectos prácticos de esta enfermedad vinculados a su manejo integrado pero hasta el momento no se han encontrado métodos efectivos para su control basándose el mismo 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 confirmado la 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 el efecto de productos formulados a base de *Bacillus subtilis* y algunos productos inductores de resistencia sobre la incidencia de cancro bacteriano.

Materiales y métodos

Material vegetal: Tomate cultivar Michele

Siembra en almácigas: 28/4/2015.

Trasplante a macetas de 1 l capacidad: 1/6/2015

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 1×10^8 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 (15/5, 22/5 y 28/5) en macetas en 50 cc de solución por planta (5/6, 12/6, 18/6 y 30/6 éste último solo en el experimento en invernáculo).

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 cc/l

Biorend (quitosano), 2% 20 cc/l

Sulfato de cobre 0,1 g/l

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

Experimento 1: En cámara de crecimiento Sanyo R 502 a 26°C 18 y 6 horas luz/oscuridad. La temperatura osciló alrededor de los 25°C y la humedad relativa se trató de mantener alta (70-90%) mediante la colocación de recipientes con agua.

Experimento 2: En invernadero con control de temperatura (ver gráfica).

Diseño experimental: En ambos experimentos se usó un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones siendo las mismas los estantes en la cámara o las mesas en el invernadero. Las parcelas estaban compuestas de cuatro plantas cada una. Los datos en porcentaje fueron transformados por $\arcsen\sqrt{\%}$ previo a su análisis.

Evaluaciones:

- 1) Evolución del número de plantas enfermas. Se registró el porcentaje de plantas con síntomas de la enfermedad en los períodos: 11-28 dpi (cámara) y 14-38 dpi (invernáculo).
- 2) Estado de vasos y médula en corte longitudinal de tallos a los 28 (cámara) y 38 (invernadero) 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).
- 3) Todas las plantas fueron analizadas por la prueba DAS ELISA al fin de los experimentos para verificar infección con Cmm (reactivos AGDIA Inc. Elkhart, IN, EEUU).



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

Resultados

Experimento 1: Cámara

En la figura 2 y el cuadro 1 se muestran la evolución de la incidencia de la enfermedad desde el comienzo de síntomas 11 días pos inoculación, dpi, y el estado de las secciones longitudinales de los tallos a fin del experimento.

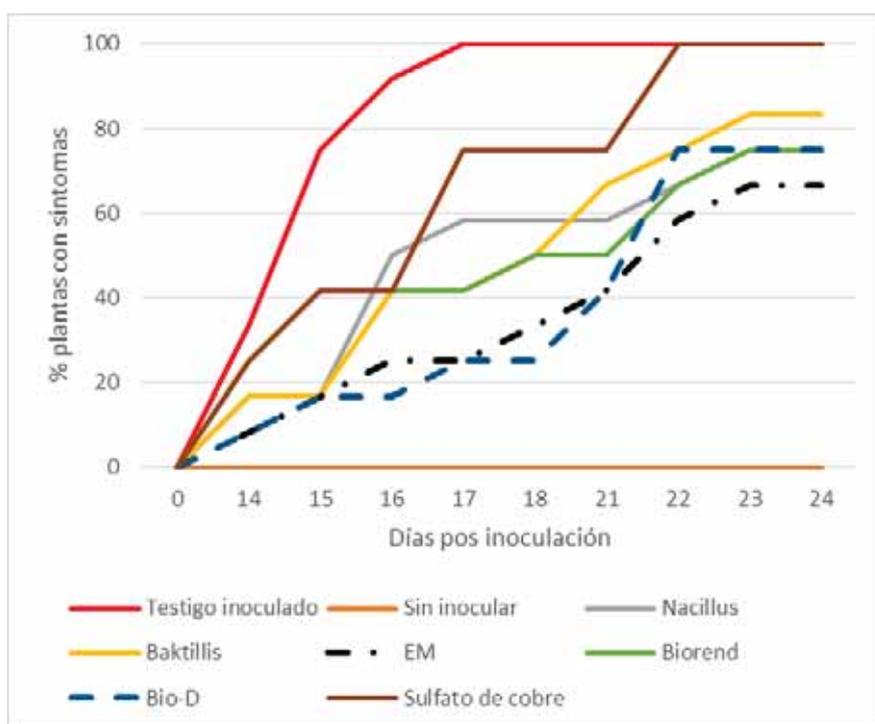


Figura 2. Evolución del porcentaje de plantas enfermas. Experimento en cámara.

Cuadro 1. Porcentaje de plantas enfermas y estado de tallos en sección longitudinal al final del experimento en cámara.

Tratamientos	% plantas enfermas 17 dpi	% plantas enfermas 22 dpi	% plantas sección tallo marrón	Intensidad de distorsión sección ²
Testigo inoculado	100 c ¹	100 c	75 cd	2,3 b
Sin inocular	0 a	0 a	0 a	0,0 a
Nacillus	58 bc	67 bc	42 bc	1,3 ab
Baktillis	42 ab	75 bc	58 cd	1,3 ab
EM	25 ab	58 b	83 d	1,7 ab
Biorend	42 ab	67 b	17 ab	0,3 a
Bio-D	25 ab	75 bc	42 bc	1,0 ab
Sulfato de cobre	75 bc	100 c	75 cd	2,3 b

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

² Intensidad de distorsión: 0 = sin síntomas, 1= leves, 2= moderados y 3= fuertes.



Figura 3. Plantas con síntomas de cancro bacteriano en experimento de cámara.



Figura 4. Amarronamiento de médula y vasos en secciones longitudinales de tallos en experimento en cámara.

Experimento 2: Invernáculo

En la figura 5 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 el estado de las secciones longitudinales de los tallos a fin del experimento.

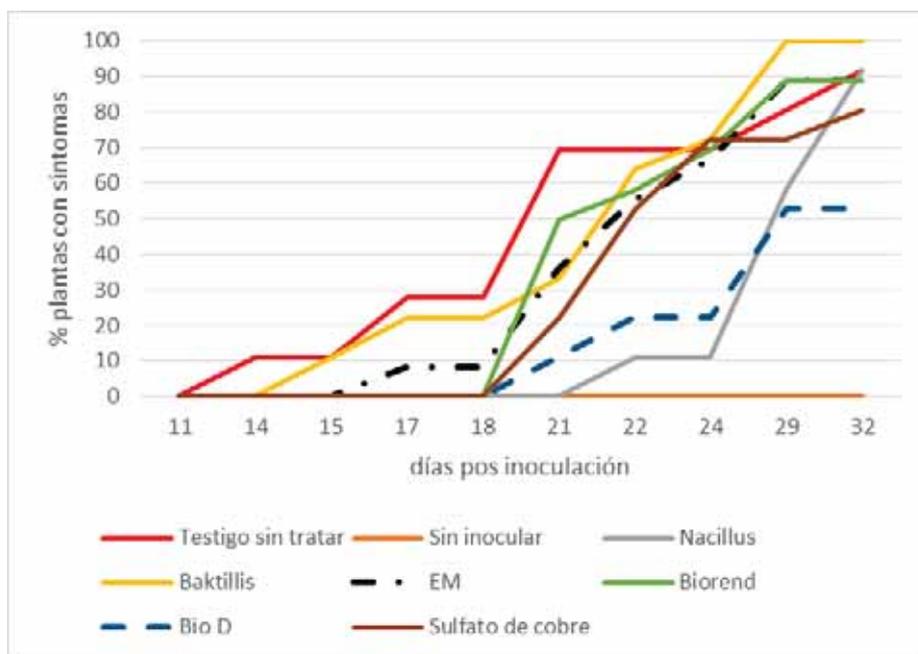


Figura 5. Evolución del porcentaje de plantas enfermas. Experimento en invernadero.

Cuadro 2. Porcentaje de plantas enfermas y estado de tallos en sección longitudinal al final del experimento en invernadero.

Tratamientos	% plantas enfermas 24 dpi	% plantas enfermas 29 dpi	% plantas sección tallo marrón 35 dpi	Intensidad de distorsión sección (0-3) ²
Testigo inoculado	70 b ¹	92 c	92 c	2,1 b
Sin inocular	0 a	0 a	0 a	0,0 a
Nacillus	11 a	91 c	100 c	1,4 b
Baktillis	72 b	100 c	100 c	2,2 b
EM	67 b	89 bc	89 c	1,6 b
Biorend	69 b	89 bc	89 c	1,2 b
Bio-D	22 ab	53 b	44 b	1,3 b
Sulfato de cobre	72 b	81 bc	92 c	1,9 b

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

² Intensidad de distorsión: 0 = sin síntomas, 1= leves, 2= moderados y 3= fuertes.

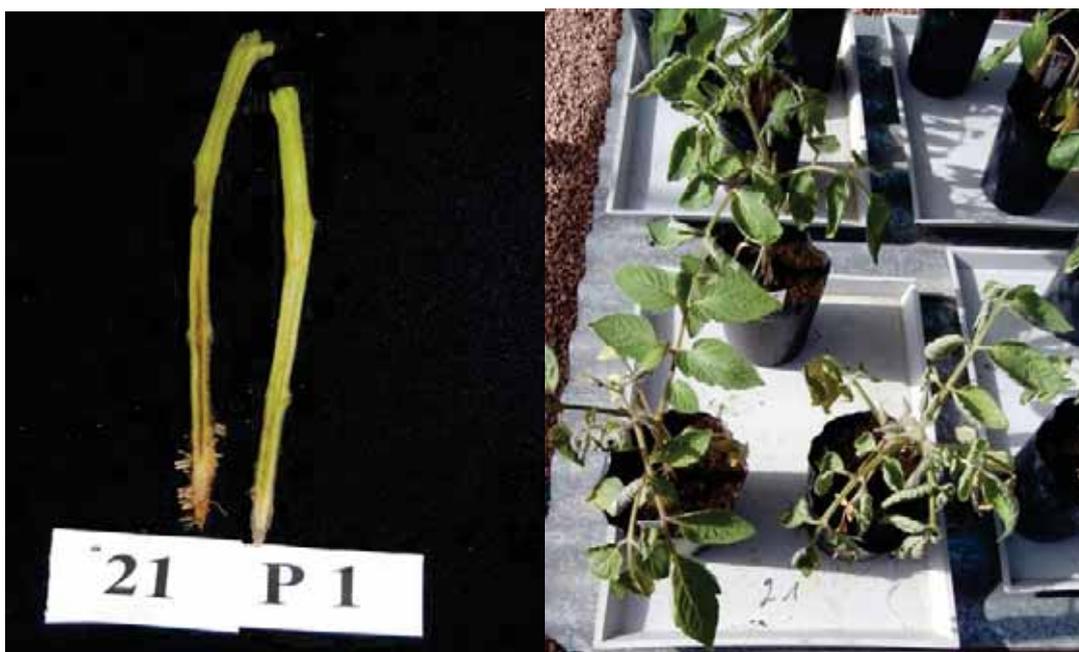


Figura 6. Síntomas de cancro bacteriano en experimento en invernáculo.

Conclusiones

Experimento en cámara:

1. Ninguno de los tratamientos evaluados previno totalmente la enfermedad.
2. Los menores porcentajes de plantas enfermas en el experimento en cámara a los 17 dpi se observaron en los tratamientos en que se aplicó: Biorend, Bio D, EM y Baktillis mientras que a los 22 dpi únicamente los tratamientos con Biorend, EM y Bio D se diferenciaron del testigo sin aplicaciones.
3. Los menores porcentajes de plantas con amarronamiento de tallos y vasos fueron presentados por los tratamientos con Biorend seguidos por Nacillus y Bio D. Siendo aquellos de Biorend los de menor intensidad.

Experimento en invernadero:

1. Ninguno de los tratamientos evaluados previno totalmente la enfermedad.
2. Los menores porcentajes de plantas enfermas a los 24 dpi en el experimento en invernadero fueron los de Nacillus y Bio D.
3. El menor porcentaje de plantas enfermas y con problemas de amarronamiento de tallos se observó en el tratamiento con Bio D.

Tomando en cuenta ambos experimentos se puede decir que los tratamientos con Bio D, Nacillus y Biorend son alternativas a estudiar y evaluar en condiciones de cultivo pudiendo ser consideradas en el manejo de esta enfermedad.

EVALUACIÓN DE PRODUCTOS APLICADOS AL FOLLAJE PARA EL CONTROL DEL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE. TEMPORADA 2013-14.

Diego Maeso, Jorge Arboleya, Alfredo Fernández y Wilma Walasek¹.

¹ INIA Las Brujas. Ruta 48 km 10. Rincón del Colorado. Canelones. Uruguay. dmaeso@inia.org.uy.

Palabras clave: cancro bacteriano, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, control.

Introducción

Durante los últimos años se han realizado experimentos tendientes a evaluar diferentes medidas para el manejo del cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*): desinfección de semillas, desinfección y manejo del agua de riego, rotaciones, etc. En este trabajo se muestran los resultados del último de una serie de ensayos en los que se evaluó la eficacia de productos aplicados al follaje en tomate cultivado al aire libre.

Localización: Campo experimental, INIA Las Brujas. En un cuadro donde existen fuertes antecedentes de cancro bacteriano.

Almácigo: 24/9/2013 con semilla tratada con baño en agua caliente. Cultivar Michelle (Sakata).

Fecha de trasplante: 24/10/13

Distancia de plantación: 0,60 x 0,50 m.

Diseño experimental: Bloques al azar con cuatro repeticiones. Cada parcela constó de dos filas de cuatro metros de largo.

Variedad: Michelle (Sakata), semilla desinfectada con agua caliente. Tomate de mercado entutorado.

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

Tratamientos:

Formados por aplicaciones semanales a partir del 10/12/13 de los siguientes compuestos:

Cuadro 1. Características de los tratamientos evaluados.

Nombre Comercial	Principio Activo	Dosis/100 l	Modo de acción
1. Bion 500 WG	Acibenzolar S methyl	5 g	Inductor de resistencia
2. Afital Cobre	Anhídrido fosfórico (P2O5): 25 % Cobre (Cu): 5%	250 cc	Inductor de resistencia
3. Biorend Cobre	Quitosano y Sulfato de Cobre Penta hidratado más una base quelatante orgánica	150 cc	Inductor de resistencia
4. Biorend	Quitosano	250 cc	Inductor de resistencia
5. Fanavid 85	oxicloruro de cobre 50% PM	300 g	Bactericida
6. Testigo sin tratar.			

Gasto de agua: 1000 l/ha. Aplicación con pulverizadora manual de mochila.

Evaluaciones

De seguimiento sanitario: Desde el comienzo de la enfermedad (20/12/13) se registró semanalmente el número de plantas afectadas por fila. A cada planta se le asignaron grados según la severidad de la enfermedad usando la siguiente escala: 0 = sin síntomas, 1= una o dos hojas comenzando a marchitar, 2= algunas hojas marchitas y comienzo de secado de las mismas, 3= algunas hojas secas, planta en su mayor parte marchita, 4= planta marchita casi muerta y 5 = planta muerta.

Con los valores de incidencia (porcentaje de plantas afectadas) y severidad se calculó el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE) para el período de evaluación.

Al fin del ciclo (20/2/14) se evaluó el estado del sistema vascular de los tallos de todas las plantas de cada parcela cortándolos longitudinalmente desde el cuello. Cuatro plantas por parcela fueron analizadas por la prueba ELISA para verificar la presencia de Cmm en su interior.

También se evaluó el efecto de los tratamientos en el control mancha bacteriana usando una escala visual de porcentaje de área cubierta con la enfermedad (3/2 y 12/2/2014).

Resultados:

Evolución del número de plantas enfermas (incidencia).

En esta temporada la evolución de la enfermedad fue rápida y casi total desde su aparición por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en el porcentaje de plantas enfermas ni en el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad en el período. Desde el 20/12/2013 todos los tratamientos presentaron más del 90% de las plantas enfermas.

Evolución de la severidad.

En el cuadro 2 y en la figura 1 se muestra la evolución de la severidad de la enfermedad en los seis tratamientos. Se destacan los menores valores de severidad estadísticamente significativos observados en los tratamientos a base de Biorend Cobre, Bion, y Oxiclورو de cobre durante la mayor parte del ciclo.

Cuadro 2. Severidad de síntomas de cancro bacteriano (escala 0-5) y el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad.

Tratamiento	13/01/2014	27/01/2014	ADCPE ¹
1. Bion 500 WG	2.64 abc	3.09 a	144 a
2. Afital Cobre	2.68 abc	3.42 b	153 ab
3. Biorend Cobre	2.51 a	3.10 a	145 a
4. Biorend	2.83 c	3.77 c	162 c
5. Fanavid 85	2.38 a	2.82 a	139 a
6. Testigo sin tratar.	2.88 c	3.69 bc	163 c
Coef. de variación (%)	4.2	4.6	4.3

¹ADCPE= Área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (calculada con todos los datos).

² Los valores seguidos por igual letra no son diferentes estadísticamente por la prueba Duncan al 1%. Para su análisis los datos fueron llevados a porcentaje sobre el valor máximo (5) y corregidos por arcsen v%

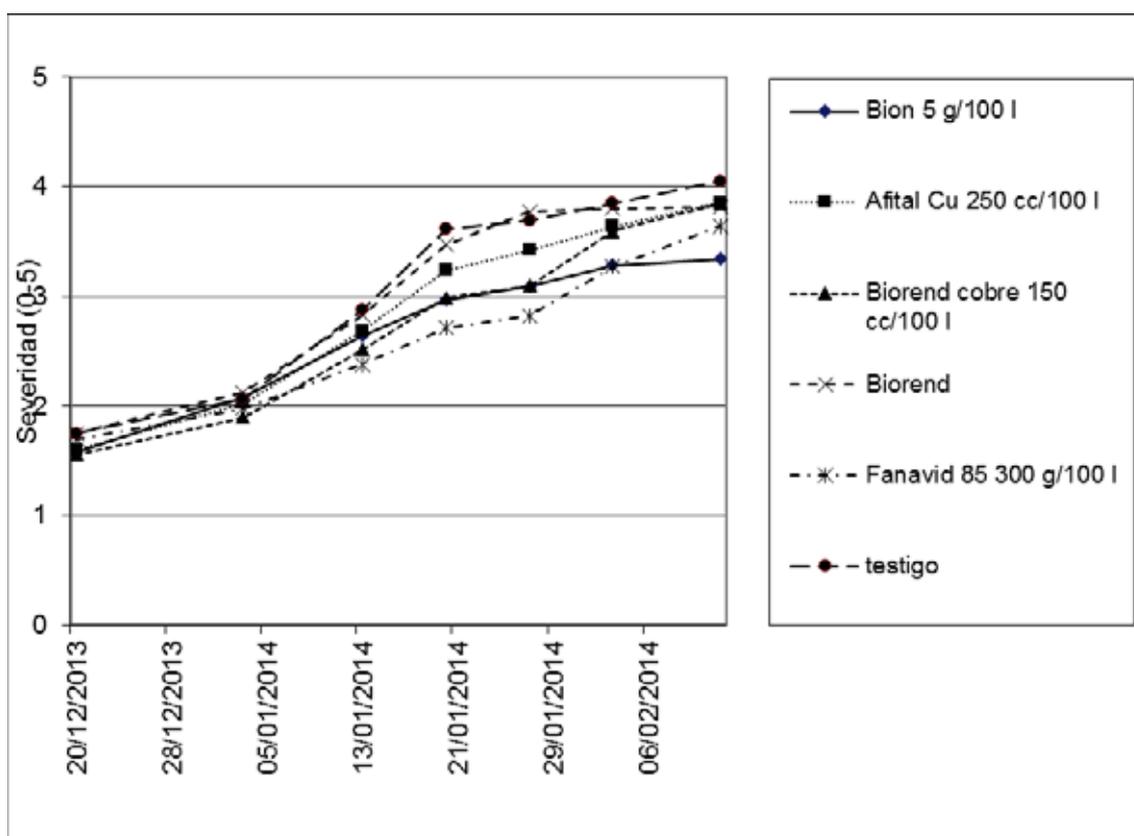


Figura 1. Evolución de la severidad de la enfermedad medida con una escala 0-5 (0= sin síntomas, 5= planta muerta).

Estado del sistema vascular y prueba ELISA.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en el porcentaje de plantas con amarronamiento en cortes longitudinales variando los porcentajes entre 37% (Biorend Cobre) y 56% (Testigo sin tratar) con un coeficiente de variación alto (44%) para esta evaluación.

En el cuadro 3 se presentan los resultados del análisis serológico de cuatro plantas por parcela a fin de ciclo en porcentaje de plantas con detección de Cmm a fin de ciclo.

Cuadro 3. Porcentaje de plantas con detección de Cmm por DAS ELISA a fin de ciclo (del análisis de cuatro plantas por parcela)

Tratamiento	Porcentaje de plantas con detección de Cmm
1. Bion 500 WG	88 ab ¹
2. Afital Cobre	69 ab
3. Biorend Cobre	63 ab
4. Biorend	81 ab
5. Oxidocloruro de cobre	50 a
6. Testigo sin tratar.	100 b
Coef. de variación (%)	33

¹ Los valores seguidos por igual letra no son diferentes estadísticamente por la prueba Duncan al 5%. Para su análisis los datos fueron corregidos por arcsen √%

Efecto secundario sobre mancha bacteriana.

En el cuadro 4 se muestran los resultados de las evaluaciones de severidad de mancha bacteriana para los distintos tratamientos.

Cuadro 4. Porcentaje de área foliar cubierta con mancha bacteriana (severidad).

Tratamiento	03/02/2014	12/02/2014
1. Bion 500 WG	18 a ¹	24 a
2. Afital Cobre	14 a	28 ab
3. Biorend Cobre	16 a	29 ab
4. Biorend	18 a	28 ab
5. Oxidocloruro de cobre	14 a	36 bc
6. Testigo sin tratar.	33 b	40 c
Coef. de variación (%)	17	13

¹ Las medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente por la prueba Duncan de rangos múltiples al 5% de probabilidad. Los valores en % fueron corregidos por $\arcsen \sqrt{v}$ previo a su análisis.

Comentarios

1. Ninguno de los tratamientos evaluados tuvo efecto sobre el porcentaje de plantas enfermas ni su evolución.
2. La menor severidad de la enfermedad se observó en las parcelas tratadas con Biorend Cobre, oxidocloruro de cobre y Bion.
3. No se encontraron diferencias entre los tratamientos en cuanto al estado de vasos a fin de ciclo.
4. Todos los tratamientos presentaron menor porcentaje de detección de Cmm por ELISA frente al testigo sin tratar siendo los menores porcentajes aquellos de las parcelas tratadas con cobre.
5. Todos los tratamientos presentaron un buen control secundario de mancha bacteriana frente al testigo sin tratar, destacándose Bion.

Conclusiones

Tomando en cuenta las tres temporadas en que estos tratamientos fueron evaluados se puede concluir:

1. Si bien en alguno de los experimentos se observaron diferencias en el porcentaje de plantas enfermas, los tratamientos en general no mostraron diferencias en incidencia por lo que no serían efectivos para prevenir la diseminación de la enfermedad.
2. Las diferencias entre tratamientos se observaron en la severidad de la enfermedad (grado de intensidad de síntomas). Los tratamientos que presentaron menor intensidad de síntomas en las tres temporadas fueron: Biorend cobre, Bion y los fungicidas cúpricos (hidróxido u oxidocloruro).
3. En general esas diferencias estuvieron asociadas con distinto grado de afección de los tallos (amarronamiento de médula y vasos en cortes longitudinales).

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.

Diego Maeso, Alfredo Fernández, Wilma Walasek¹

¹Programa Producción Hortícola. Sección Protección Vegetal. INIA Las Brujas. Ruta 48 km 10. Rincón del Colorado. Canelones. Uruguay. dmaeso@inia.org.uy

Palabras clave: Cancro bacteriano, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, *Bacillus subtilis*, control.

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).

A continuación se presentan los resultados de dos experimentos uno al aire libre en INIA LB y otro en invernáculo comercial realizados en la temporada 2014-2015.

Objetivos

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

Experimento 1. Cultivo al aire libre en INIA LB.

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 CO₂ (R&D sprayers, EEUU). Gasto por hectárea varió de 600 a 1500 l/há durante la temporada.

Cultivo: Tomate de mesa, variedad Michelle. Distancia de plantación 0,6 x 0,50 m en cabana doble fila. Fecha de siembra 5/9/2014, trasplante 21/10/2014.

Diseño experimental: Bloques al azar con cuatro repeticiones. Cada parcela constaba de una cabana de dos filas de ocho plantas cada una (figura 2).



Figura 2. Detalle de una parcela.

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).

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. Tixan	Alginato de cobre	200 cc	Cada 7-10 días
9. Testigo sin tratar			

Las aplicaciones preventivas comenzaron el 28/11/2014, mientras que las aplicaciones pos-inoculación comenzaron el 13/1/2015. Los tratamientos preventivos (1, 3, 5, 6, 7 y 8) recibieron 14 aplicaciones mientras que los pos-inoculación (2 y 4), 7. La última aplicación de todos los tratamientos fue realizada el día 24/2/15.

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 9/1/2015 (dos por fila). Se utilizó una suspensión de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml y se realizó una herida cortando una hoja completamente desarrollada con una tijera embebida en la solución bacteriana (figura 3).



Figura 3. 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 (mediados de febrero 2015) 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 y la figura 4 se muestra la evolución de la incidencia de la enfermedad (porcentaje de plantas que presentaban algún síntoma de la enfermedad frente al total).

Cuadro 2. Incidencia de cancro bacteriano 2015 (%).

Tratamiento	19/01	27/01	02/02	09/02	ADCPE total
1. Nacillus 300 g/100 l	27 b ¹	55 bc	80 bc	83 b	2480 bc
2. Nacillus 500 g/100 l	19 ab	50 abc	52 b	61 b	2071 b
3. Baktillis 300 g/100 l	30 b	41 abc	66 bc	75 b	2298 bc
4. Baktillis 500 g/100l	14 ab	39 ab	70 bc	75 b	2218 bc
5. HidroCup 77% 300 g/100 l	9 a	22 a	20 a	22 a	1198 a
6. Biorend cobre 150 cc/100 l	13 ab	36 abc	63 bc	66 b	2169 b
7. Bion 5 g/100 l	20 ab	31 ab	63 bc	71 b	2088 b
8. Tixan 200 cc/100 l	32 b	82 c	79 bc	89 b	2562 bc
9. Testigo sin tratar	27 b	59 bc	98 c	98 b	2802 c

¹ 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 19/1 (10 días pos inoculación). La menor incidencia de la enfermedad se observó durante toda la temporada en el tratamiento a base de HidroCup. En las primeras evaluaciones (19 y 27/1) la incidencia en este tratamiento no se diferenció estadísticamente de la observada en los tratamientos con Nacillus, Baktillis, Biorend cobre y Bion. Posteriormente el porcentaje de plantas enfermas aumentó en estos últimos y al final de la estación no existieron diferencias con lo registrado en el testigo sin tratar.

Los tratamientos con menor incidencia de la enfermedad considerando el ADCPE calculada para toda la temporada fueron HidroCup seguido por Nacillus (500 g/100 l), Biorend cobre y Bion. El resto de los tratamientos no se diferenciaron del testigo sin tratar.

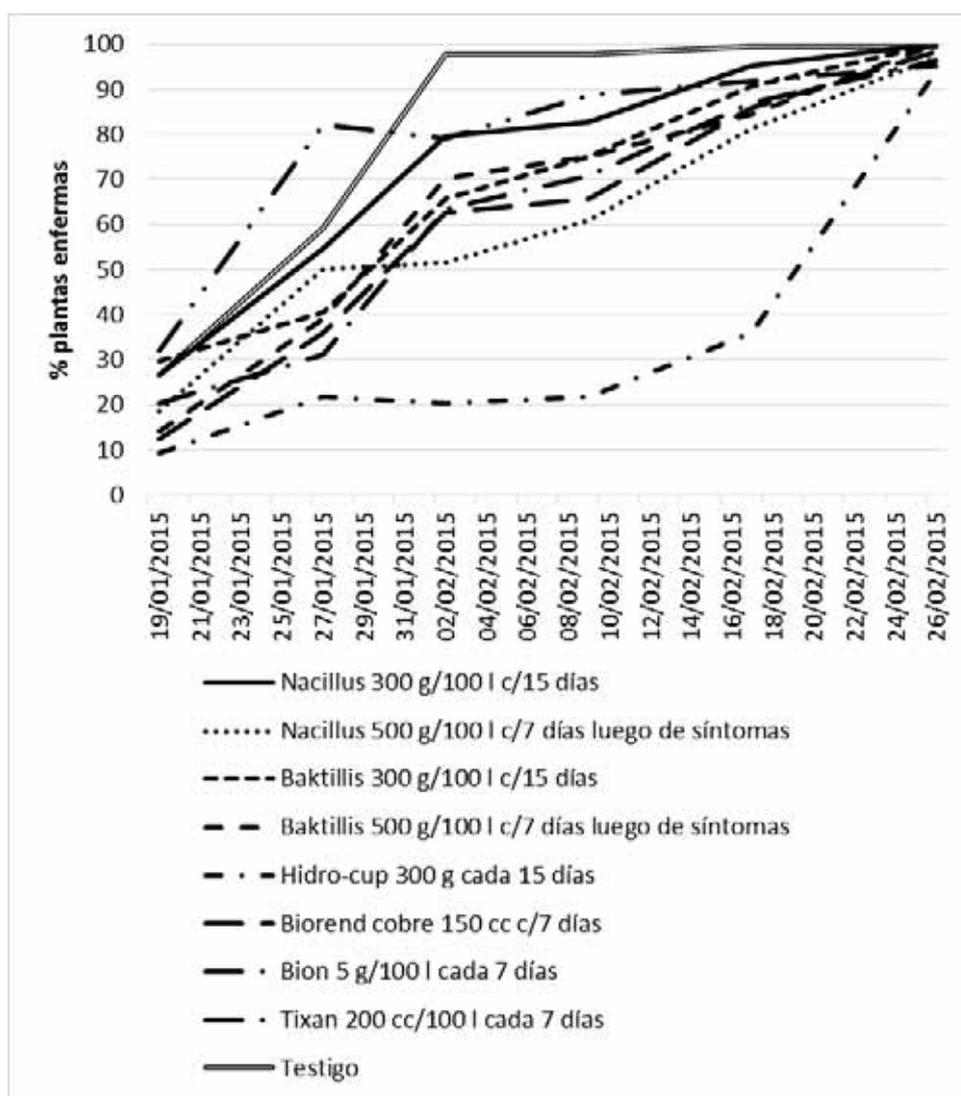


Figura 4. Evolución de la incidencia (porcentaje de plantas enfermas) de cancro bacteriano en los distintos tratamientos.

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	19/01	02/02	17/02	ADCPE total
1. Nacillus 300 g/100 l	0,30 bc	1,1 cde	1,7 bc	1139 bcd
2. Nacillus 500 g/100 l	0,20 abc	0,6 b	1,3 b	897 b
3. Baktillis 300 g/100 l	0,30 bc	0,8 bcd	1,6 bc	1038 bc
4. Baktillis 500 g/100	0,14 ab	0,8 bcd	1,3 b	897 b
5. HidroCup 77% 300 g/100 l	0,09 a	0,2 a	0,4 a	529 a
6. Biorend cobre 150 cc/100 l	0,13 abc	0,7 bc	1,4 b	921 b
7. Bion 5 g/100 l	0,21 abc	0,8 bcd	1,4 b	923 b
8. Tixan 200 cc/100 l	0,34 c	1,3 de	2,0 cd	1252 cd
9. Testigo sin tratar	0,27 bc	1,7 e	2,5 d	1349 d

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

En general los ataques de cancro bacteriano no llegaron a producir grandes pérdidas no superando en promedio los valores de severidad 3 (marchitamiento moderado). Bajo esas circunstancias analizando toda la temporada en general el mejor control se obtuvo en el tratamiento a base de HidroCup seguido por los tratamientos a base de Nacillus y Baktillis a 500 g/100 l, Biorend cobre y Bion. Los tratamientos a base de Tixan y con las menores dosis de Baktillis y Nacillus no se diferenciaron del testigo sin tratar en la mayoría de las evaluaciones.

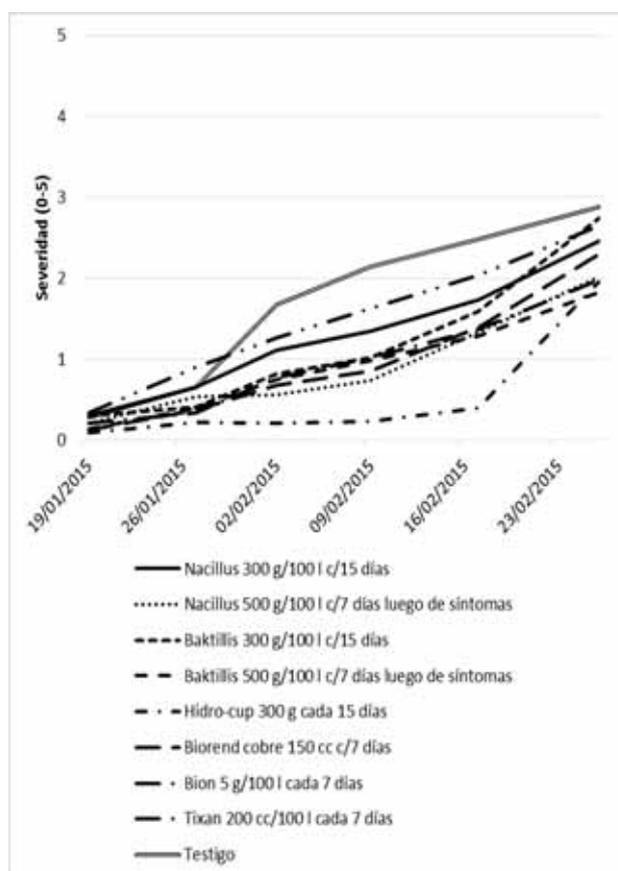


Figura 5. Evolución de la severidad (0-5) de cancro bacteriano.

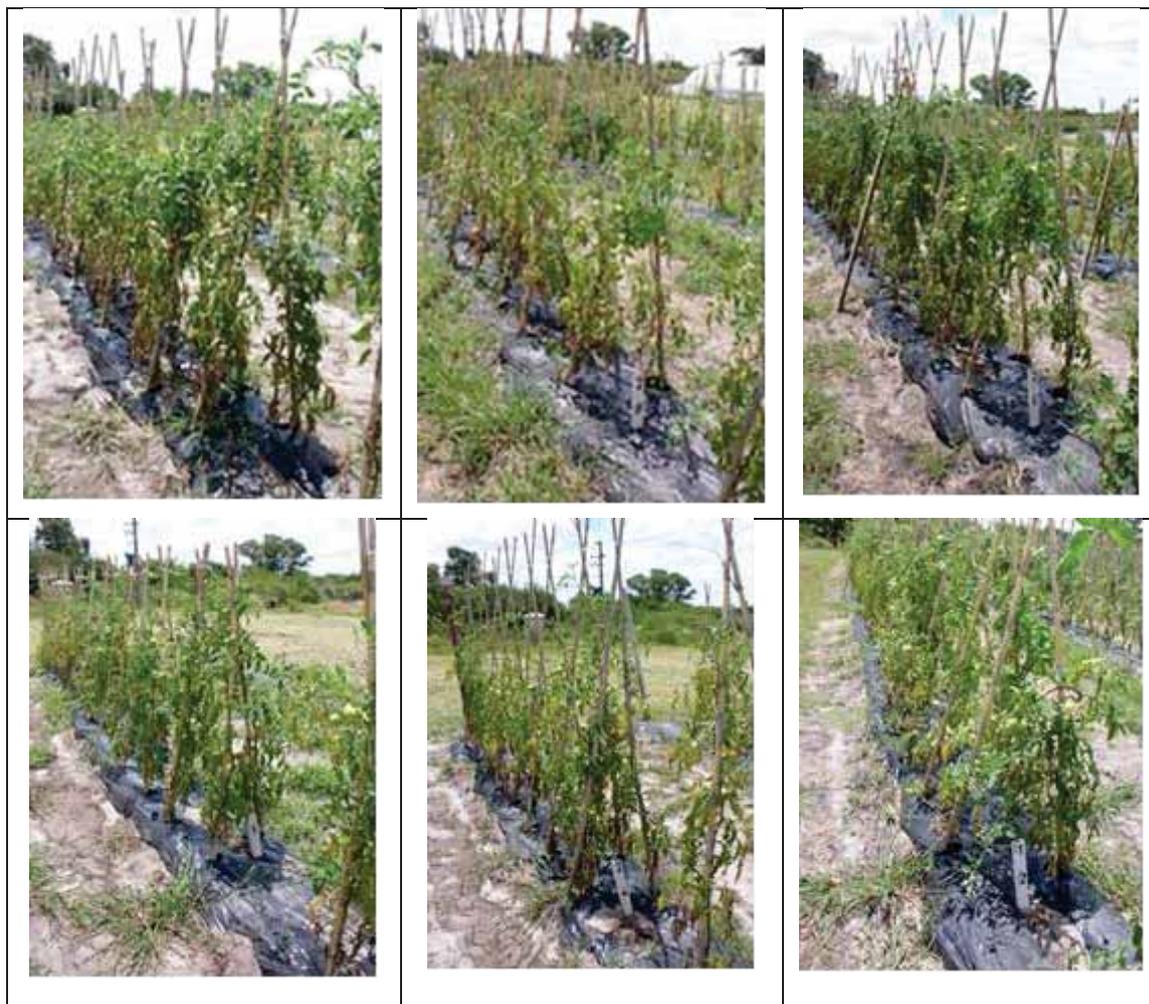


Figura 6. Síntomas en algunas parcelas al 17/2/2015. Arriba de izquierda a derecha: Testigo sin tratar, Tixan, Biorend Cu. Debajo de izquierda a derecha: HidroCup, Baktillis 500 g/100 l y Nacillus 500 g/100 l.

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
1. Nacillus 300 g/100 l	42 ab
2. Nacillus 500 g/100 l	25 ab
3. Baktillis 300 g/100 l	29 ab
4. Baktillis 500 g/100	25 ab
5. HidroCup 77% 300 g/100 l	13 a
6. Biorend cobre 150 cc/100 l	21 ab
7. Bion 5 g/100 l	13 a
8. Tixan 200 cc/100 l	58 b
9. Testigo sin tratar	46 ab

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



Figura 7. Síntomas de cancro bacteriano evaluados en los cortes longitudinales a fin de ciclo (coloración anormal de vasos y médula, médula con consistencia esponjosa).

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, Nacillus y Baktillis a mayor dosis pos-inoculación y Bion. 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 algunos inconvenientes a futuro: fitotoxicidad derivada de la acumulación en suelo de cobre y la selección de cepas con capacidad de 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, productos inductores de resistencia como el acibenzolar S methyl (Bion), quitosano (Biorend Cobre), o aquellos formulados a base de cepas de *Bacillus subtilis*, de buen desempeño en esta prueba, aparecen como medidas sustitutivas o complementarias que permitirán al menos disminuir la cantidad de cobre aplicado por temporada.

Es de destacar que, dada su forma de acción, la aplicación de estos inductores debe ser realizada previamente a la aparición de la enfermedad. En este experimento la aplicación de Baktillis y Nacillus en su dosis más alta fue realizada pocos días después de la inoculación o sea en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad. La definición del momento de inicio de las aplicaciones es un tema a resolver, en este experimento el comenzar las aplicaciones inmediatamente después de la inoculación significó una diferencia de 7 aplicaciones menos. Si bien se tratan de resultados de una sola temporada estos productos funcionaron mejor a la dosis más alta.

Conclusiones

- 1) El ataque de cancro bacteriano en este experimento si bien llegó a afectar a casi el 100% de las plantas en el tratamiento testigo no revistió una severidad muy alta no superando el nivel 3 (marchitamiento moderado).
- 2) El mejor control de la enfermedad evaluado como incidencia, severidad y presencia de síntomas en cortes de tallos se observó en los tratamientos a base de HidroCup, Bion, Nacillus y Baktillis (ambos pos-inoculación a 500 g/100 l) y Biorend Cobre.

Experimento 2. Cultivo en invernáculo en predio comercial.

Materiales y Métodos

Ubicación: Establecimiento del Sr. Omar Fernández. Camino Paso del Medio. Canelón Chico. Departamento de Canelones. Cultivo de tomate en invernadero comercial sin calefacción con cubierta plástica y estructura de madera.

Forma de aplicación: Foliar mediante pulverizadora de mochila con CO₂ (R&D sprayers, EEUU). Gasto por hectárea varió de 600 a 2000 l durante la temporada.

Cultivo: Tomate de mesa, variedad Torry. Distancia de plantación 1,6 x 0,25 m. Fecha de trasplante 11/11/2014.

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

Cuadro 5. Tratamientos evaluados en el ensayo.

Tratamiento	Principio activo	Dosis/100 l	Intervalo
1. Nacillus	<i>Bacillus subtilis</i>	Preventiva 300 g	Cada 15 días
2. Nacillus	<i>Bacillus subtilis</i>	Posinoculación 500 g	Cada 7-10 días luego de inoculación
3. Baktillis	<i>Bacillus subtilis</i>	Preventiva 300 g	Cada 15 días
4. Baktillis	<i>Bacillus subtilis</i>	Posinoculación 500 g	Cada 7-10 días luego de inoculación
5. HidroCup 77%	Hidróxido de cobre	300 g	Cada 15 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 obtenido de hongos de suelo	500 cc	Cada 7-10 días
9. Testigo sin tratar			

Las aplicaciones preventivas comenzaron el 4/12/2014, mientras que las pos-inoculación comenzaron el 30/1/2015. Los tratamientos preventivos semanales (6, 7 y 8) recibieron 13 aplicaciones, los quincenales (1, 3 y 5) siete, mientras que los pos-inoculación (2 y 4) tres. La última aplicación de todos los tratamientos fue realizada el día 2/3/15.

Diseño experimental:

Bloques al azar con cuatro repeticiones. El invernáculo constaba de seis filas, las dos externas fueron dejadas como bordes y cada una de las centrales formó parte de un bloque. Las parcelas constaban de cuatro metros de largo (16 plantas) dejándose dos metros externos al frente y al fondo del invernadero como borde (figuras 1 y 2).



Figura 8. Vista panorámica del ensayo. Las cuatro filas centrales fueron las utilizadas en el experimento.



Figura 9. Detalle de una parcela (desde la estaca hasta la cinta amarilla).

Inoculación:

Se inocularon cuatro plantas en el comienzo de cada parcela el 14/1/2015. Se utilizó una suspensión de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml y se realizó una herida cortando una hoja completamente desarrollada con una tijera embebida en la solución bacteriana (figura 10).



Figura 10. Inoculación. Izquierda corte con tijeras embebidas en solución bacteriana. Derecha plantas inoculadas identificadas en el comienzo de cada parcela.

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).

Parámetros evaluados:

Evolución de la enfermedad.

A partir de la instalación del ensayo se evaluó semanalmente el porcentaje de plantas enfermas por parcela (incidencia). Para evaluar la severidad a cada una de ellas se le asignó un grado en 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. Todos los valores en porcentaje fueron transformados por la fórmula $\arcsen \sqrt{\%}$ previo a su análisis estadístico. 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.

Resultados

Incidencia

En el cuadro 6 y la figura 11 se muestra la evolución de la incidencia de la enfermedad (porcentaje de plantas que presentaban algún síntoma de la enfermedad frente al total).

Cuadro 6. Incidencia de cancro bacteriano (% de plantas enfermas).

Tratamiento	22/01	10/02	12/03	23/03	ADCPE Hasta 2/3	ADCPE total
1. Nacillus 300 g/100 l	0,0 NS ¹	8,3 b ²	11,6 a	16,0 abc	262 abc	718 abc
2. Nacillus 500 g/100 l	0,0	5,5 ab	13,3 ab	13,5 ab	162 a	571 ab
3. Baktillis 300 g/100 l	0,0	9,6 bc	15,3 ab	16,6 bc	290 abcd	803 abc
4. Baktillis 500 g/100 l	0,0	1,6 a	10,3 a	13,5 ab	160 a	534 a
5. HidroCup 77% 300 g/100 l	1,6	13,7 c	12,3 a	10,8 a	371 cd	744 abc
6. Biorend cobre 150 cc/100 l	0,0	10,4 bc	13,8 ab	16,3 bc	222 abc	673 ab
7. Bion 5 g/100 l	0,0	5,6 ab	16,0 ab	19,3 c	188 ab	738 abc
8. Bio-D Zn Mn 500 cc/100 l	0,0	10,5 bc	15,5 ab	15,9 abc	351 bcd	846 bc
9. Testigo sin tratar	0,6	14,5 c	19,0 b	18,0 bc	428 d	985 c

¹ NS = sin diferencias estadísticamente significativas en el análisis de variancia.

² Los valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente al 5% por la prueba Duncan de rangos múltiples.

Los primeros síntomas de la enfermedad comenzaron a observarse el 22/1 (8 días pos inoculación) solamente en algunas parcelas del tratamiento con HidroCup pero su evolución fue muy lenta. Recién en la evaluación del 10/2 se comenzaron a registrar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos siendo el tratamiento con Baktillis pos-síntomas el que presentó menor porcentaje de plantas afectadas en esa evaluación y el 12/3. El tratamiento con HidroCup también presentó menor incidencia en las evaluaciones del 12/3 y 20/3.

Los tratamientos con menor incidencia de la enfermedad considerando el ADCPE calculada en el período con aplicaciones (hasta 2/3) fueron Baktillis y Nacillus pos-inoculación, Bion, Nacillus pre-inoculación y Biorend Cu diferenciándose del testigo sin tratar. Los valores más bajos del ADCPE de toda la temporada correspondieron a Baktillis y Nacillus pos-inoculación y Biorend Cu separándose de aquellos del testigo sin tratar.

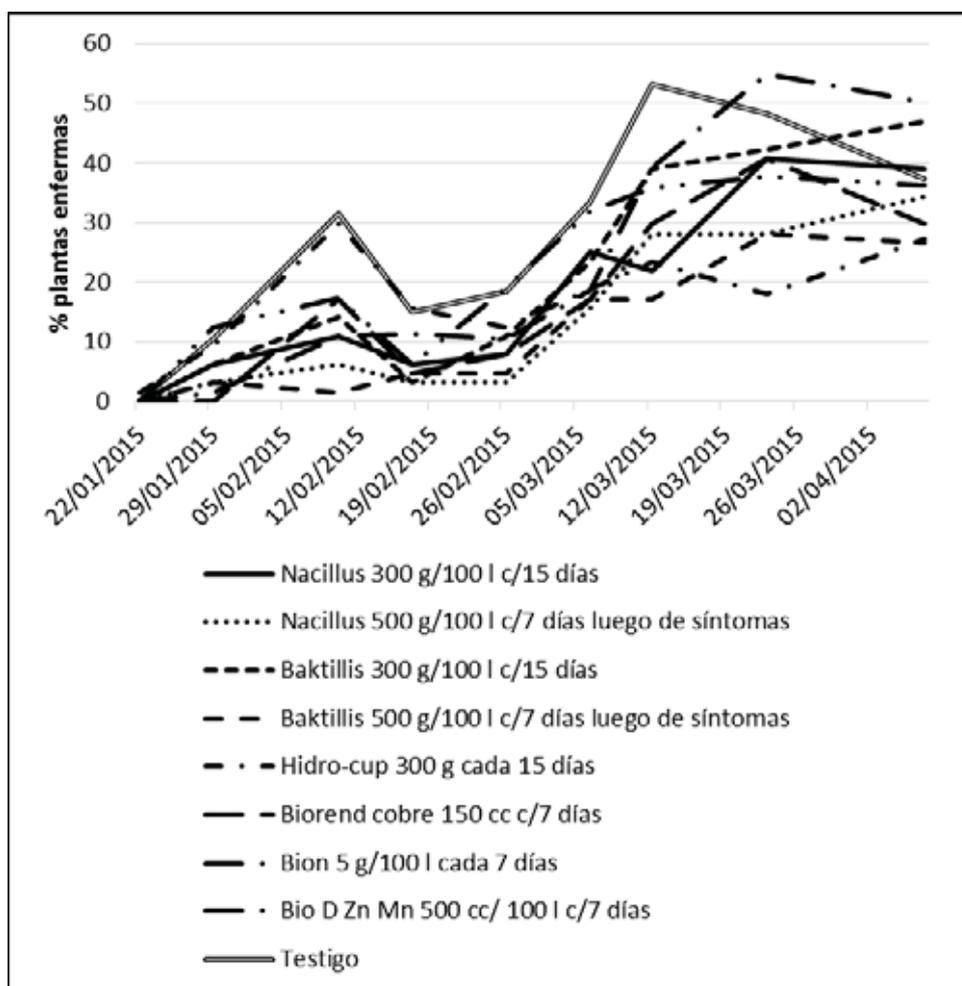


Figura 11. Evolución de la incidencia (porcentaje de plantas enfermas) de cancro bacteriano en los distintos tratamientos.

Severidad

En el cuadro 7 y la figura 12 se muestran los resultados de las evaluaciones de severidad realizadas (intensidad de la enfermedad según una escala 0-5).

Cuadro 7. Resultados de las evaluaciones de severidad de cancro bacteriano (según escala 0-5).

Tratamiento	10/02	12/03	23/03	ADCPE Hasta 2/3	ADCPE total
1. Nacillus 300 g/100 l	0,13 a ¹	0,4 NS ²	1,0 NS	295 abc	997 NS
2. Nacillus 500 g/100 l	0,06 a	0,6	1,0	180 a	950
3. Baktillis 300 g/100 l	0,14 ab	0,8	1,0	297 abc	1100
4. Baktillis 500 g/100	0,02 a	0,5	0,7	189 ab	836
5. HidroCup 77%	0,33 c	0,4	0,4	409 c	975
6. Biorend cobre 150 cc/100 l	0,17 abc	1,0	1,2	258 abc	1071
7. Bion 5 g/100 l	0,11 ab	1,3	2,0	204 ab	1385
8. Bio-D Zn Mn 500 cc/100 l	0,19 abc	0,7	1,0	385 bc	1207
9. Testigo sin tratar	0,31 bc	1,0	1,2	429 c	1353

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

² NS = sin diferencias estadísticamente significativas en el análisis de variancia.

Solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en la evaluación del 10/2/2015 y en el ADCPE hasta el 2/3/2015 (período con aplicaciones). Los menores valores de severidad se encontraron en las parcelas tratadas con Nacillus y Baktillis pos-inoculación, seguidas por aquellas tratadas con Bion. El resto de los tratamientos no se diferenciaron del testigo sin tratar.

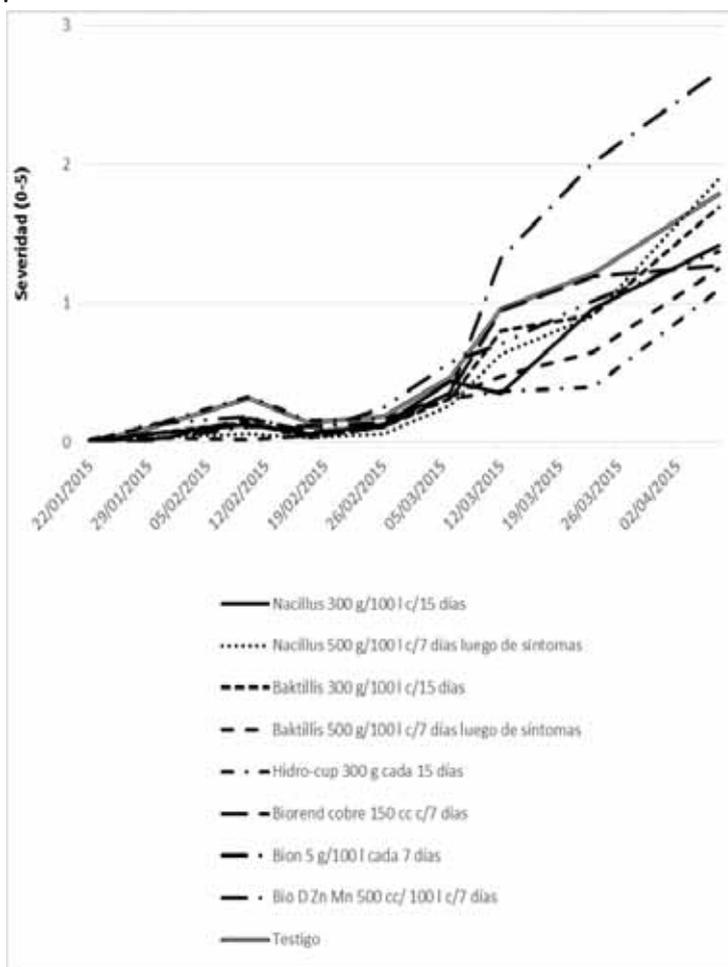


Figura 12. Evolución de la severidad (0-5) de cancro bacteriano.



Figura 13. Izquierda: Inicio de síntomas de cancro bacteriano en el ensayo.



Figura 14. Síntomas en algunas parcelas al 23/3/2015. Arriba de izquierda a derecha: Testigo sin tratar, Bio-D, Biorend Cu, Bion. Debajo de izquierda a derecha: Hidro-cup, Baktillis 500 g/100 l, Baktillis 300 g/100 l y Nacillus 500 g/100 l.

Discusión

A pesar que en el establecimiento donde se ubicó el ensayo tradicionalmente ocurren fuertes ataques de cancro bacteriano del tomate y de haber realizado la inoculación de algunas plantas de cada parcela, no se logró un ataque fuerte de la misma, aún en el testigo sin tratar. El porcentaje de plantas enfermas no superó el 20% y la severidad de la enfermedad en promedio, no llegó al grado 3 al fin del ensayo (plantas con marchitamiento moderado).

A pesar de ello se observaron diferencias entre los tratamientos a favor de Baktillis y Nacillus fundamentalmente en sus mayores dosis aplicados pos-inoculación, Bion y Biorend Cu todos aplicados cada 7-10 días. Es interesante que los efectos de estos tratamientos sobre la incidencia perduraron aún luego de interrumpidas las aplicaciones sugiriendo el mantenimiento de la respuesta vía planta atribuida a ellos.

El poco control obtenido con el tratamiento de HidroCup muy probablemente esté influenciado por la temprana incidencia de la enfermedad en las parcelas de este tratamiento (22/1) cuya diseminación no pudo ser controlada por este producto dado su acción únicamente preventiva y externa y que el mismo a su vez fue aplicado a intervalos quincenales.

Conclusiones

Se encontró un efecto beneficioso en el control del cancro bacteriano del tomate de las aplicaciones foliares reiteradas de productos inductores de resistencia principalmente de aquellos a base de *Bacillus subtilis* (Baktillis, Nacillus) aplicados cada 7-10 días a dosis altas luego de la inoculación en condiciones de desarrollo moderado de la enfermedad.

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 – Ciencias Agrarias e Biologicas V. 4, N. 2, p. 12-20, 2010.

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.; KLOPPER, J.W.; PARE, P.W. Bacterial volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v.134, p.1017–1026, 2004.

ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS NATIVAS PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE BACTERIOSIS EN TOMATE

Mercedes García Roche¹, Elena Pérez².

¹Trabajo final de Grado. Licenciatura en Biotecnología. Universidad ORT_Uruguay.

²Programa Nacional de Horticultura. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay.

Contacto: elenaperez@inia.org.uy

1. Introducción.

Para el control de las bacteriosis en tomate se recomienda el uso de semillas sanas, de cultivares resistentes y la protección de tejidos susceptibles con productos cúpricos y/o mancozeb. Sin embargo, estas medidas son difíciles de lograr debido a que no siempre se cuenta con semillas sanas y cultivares resistentes y adaptados a las condiciones de producción de Uruguay. A su vez, los tratamientos con productos químicos pueden ser poco efectivos en condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad o cuando los niveles de inóculo son altos. Por ello, es un desafío encontrar alternativas efectivas y amigables con el medio ambiente para el control de las enfermedades producidas por las bacterias. Una de las alternativas innovadoras y de novel desarrollo es el uso de aceites esenciales en el control de patógenos de plantas. Por su procedencia natural los hacen más seguros para las personas y el medioambiente y además tiene bajo riesgo de desarrollo de resistencia por la compleja mezcla de compuestos que hace que actúen diversos mecanismos de acción.

El objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto de 15 aceites esenciales (a.e.) obtenidos de plantas nativas de Uruguay, sobre el control de las bacterias *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que afectan a *Solanum lycopersicum* L. (tomate) y contar con una primera aproximación a la dosis efectiva para evaluaciones en plantas.

2. Materiales y Métodos.

2.1 Aceites esenciales

Se utilizaron aceites esenciales disponibles en el laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental de INIA – Salto Grande que habían sido extraídos por el método clásico de hidrodestilación utilizando una trampa tipo Clevenger y conservados en frascos de rosca de color ámbar a 4 °C (Lombardo, et al., 2013).

2.2 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Pseudomonas syringae* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* fueron proporcionadas por el Dr. Diego Maeso, Estación Experimental INIA _ Las Brujas.

2.3 Estudios de actividad antimicrobiana *in vitro*

Se realizó una evaluación cualitativa mediante bioautografía directa y cuantitativa mediante microdilución en medio líquido para conocer la mínima concentración inhibitoria.

3. Resultados.

3.1 Bioautografía directa.

Con algunas excepciones (cuadro 1) los aceites esenciales inhibieron el desarrollo de las bacterias evaluadas. El 53%, inhibieron el crecimiento de las cuatro bacterias en estudio, 73% tuvieron efecto sobre *X. gardneri*, 80% sobre *X. vesicatoria*, 67% sobre *P. syringae* y 93% sobre *C. michiganensis subsp. michiganensis*. Aunque el tamaño de los halos de inhibición fue variable, no es un método cuantitativo confiable debido a que los aceites esenciales pueden expandirse en forma desigual sobre la placa cromatográfica.

Cuadro 1 - Clasificación de la intensidad de la inhibición de los aceites esenciales sobre las bacterias *X. gardneri*, *X. vesicatoria*, *P. syringae* y *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (CMM) considerando el diámetro del halo desarrollado en la evaluación por bioautografía directa¹

	<i>X.gardneri</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>P. syringae</i>	CMM
Aceite	Tamaño halo (en cm)			
<i>Schinus molle</i> (H)	X	XX	-	XX
<i>Schinus molle</i> (Fr)	XX	XX	-	XXX
<i>Achyrocline flaccida</i>	XX	XX	XXX	XXX
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	-	-	XX	XX
<i>Baccharis trimera</i>	XX	XX	XXXX	XXX
<i>Conyza bonariensis</i>	XX	XX	XX	XX
<i>Pluchea sagittalis</i>	-	XX	XX	XXX
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	XXXX	XXX	XXXX	XX
<i>Ocimum selloi</i>	XXX	XX	X	XXXX
<i>Blepharocalyx salicifolia</i>	XXX	XX	XX	XXX
<i>Acca sellowiana</i>	XX	XXX	XX	XXX
<i>Eugenia uniflora</i>	XXX	XXX	XX	XXXX
<i>Psidium cattleianum</i>	XXX	XX	X	XXX
<i>Aloysia gratissima</i>	-	-	X	-
<i>Lippia alba</i>	XXXX	XXX	XXX	XXXX

¹ (-) = Ausencia de halo; (X) = inhibición baja, diámetro ≤ 1,1 cm; (XX) = inhibición intermedia, 2,0 cm ≥ diámetro > 1,1 cm; (XXX) = inhibición alta, diámetro ≥ 2,1 cm (XXXX) = inhibición total.

3.2. Microdilución en medio sólido

Las concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas fueron con *Chenopodium ambrosioides* para *X. vesicatoria* (500 µg.ml⁻¹), *X. gardneri* (500 µg.ml⁻¹) y *P. syringae* (250 µg.ml⁻¹); *Lippia alba* (500 µg.ml⁻¹) para *X. gardneri* y *Acca sellowiana* (125 µg.ml⁻¹) para *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (cuadro 3).

Cuadro 2. Mínima concentración inhibitoria de los aceites esenciales sobre las bacterias *X. gardneri*, *X. vesicatoria*, *P. syringae* y *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (CMM) mediante evaluación de microdilución en medio sólido¹

	<i>X.gardneri</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>P. syringae</i>	CMM
Aceite	Concentración inhibitoria mínima (en ppm)			
<i>Schinus molle</i> (H)	-	-	N/A	-
<i>Schinus molle</i> (Fr)	-	-	N/A	-
<i>Achyrocline flaccida</i>	-	-	1000	500
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	N/A	N/A	-	250
<i>Baccharis trimera</i>	-	-	-	500
<i>Conyza bonariensis</i>	-	-	-	-
<i>Pluchea sagittalis</i>	N/A	N/A	-	1000 ²
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	500	500	250	500
<i>Ocimum selloi</i>	1000	-	N/A	-
<i>Blepharocalyx salicifolia</i>	-	-	1000	-
<i>Acca sellowiana</i>	-	-	-	125
<i>Eugenia uniflora</i>	1000	1000	-	250
<i>Psidium cattleianum</i>	1000	-	-	-
<i>Aloysia gratissima</i>	N/A	N/A	-	N/A
<i>Lippia alba</i>	500	1000	1000	1000

¹Ausencia de inhibición (-), N/A – no se realizó el ensayo para este aceite y esta bacteria

4. Conclusiones.

1. para el control de bacteriosis en tomate, los aceites esenciales promisorios para el control integrado de las cuatro bacterias son los extraídos de *Chenopodium ambrosioides*, y *Lippia alba*.
2. En el caso del a.e. de Ch. ambrosioides, tener en cuenta que la MIC fue diferente según la especie de bacteria evaluada.
3. Para llegar a un producto o recomendación comercial desde el punto de vista agronómico aun se deben realizar estudios en vivo considerando: concentraciones efectivas, métodos de aplicación, fitotoxicidad, período de protección, formulaciones, entre otras cosas.

La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código INI_X_2013_1_10160 y del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria fondos 50 proyecto N 12827 HO-16_0_0

TECNOLOGÍAS ALTERNATIVAS PARA EL MANEJO DE PLAGAS EN CULTIVOS HORTÍCOLAS BAJO INVERNADERO

Evaluación de la repelencia de *Solanum commersonii* para el control de mosca blanca en tomate.

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

La producción hortícola tiene entre sus principales problemas tecnológicos la incidencia de las plagas. Por lo común, en los sistemas convencionales de producción se emplean plaguicidas de síntesis química como principal herramienta de control, para evitar o reducir los daños económicos.

La aplicación de plaguicidas químicos sin criterio, de manera no razonada y excesiva, no solamente implica mayores riesgos para las personas sino que repercute en una agresión permanente al medio ambiente, lo cual afecta el equilibrio biológico, disminuye la acción de los enemigos naturales, genera resistencia a los plaguicidas y produce contaminación ambiental.

El gran perjudicado además es el público, no solo por la presencia de residuos tóxicos en las hortalizas que consume, las que constituyen un componente básico de la dieta y donde la seguridad alimentaria es un derecho, sino también por el uso de medidas que no preservan el medio ambiente, lo cual es una preocupación adicional de la gente.

La incorporación de tecnologías alternativas al control químico en los sistemas intensivos de producción, es una contribución para una producción más eficiente y diferenciada, respetuosas del medio ambiente, con mayor seguridad en cuanto a inocuidad alimentaria y para las condiciones de trabajo y calidad de vida de los operarios. La incorporación de nuevos agentes de control y de herramientas alternativas, reducirá la aplicación de plaguicidas de síntesis química.

En este sentido, INIA conjuntamente con el Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química (Universidad de la República) trabajan en el desarrollo de métodos alternativos para el control de la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* en producción de tomate bajo invernadero.

Por un lado en el desarrollo de bioplaguicidas a base de aceites esenciales (AE) de chirca (*Eupatorium buniifolium*) y de ajeno (*Artemisia absinthium*) y por otro lado con el estudio de la actividad repelente de la papa silvestre *Solanum commersonii* para el control de dicha plaga.

EVALUACIÓN DE LA REPELENCIA DE *SOLANUM COMMERSONII* PARA EL CONTROL DE MOSCA BLANCA EN TOMATE

Umpiérrez, M.L.¹; Rossini, C.¹; Paullier, J.²

¹ Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo-Uruguay.

² INIA Las Brujas, Canelones-Uruguay.

mail de correspondencia: crossini@fq.edu.uy

Palabras clave: *Solanum commersonii*, tomate, mosca blanca, repelentes

Introducción

Solanum commersonii (Solanaceae) es el nombre científico de una papa silvestre nativa de Uruguay, que además se encuentra presente en el sur de Brasil, sur de Paraguay y noreste de Argentina.

En estudios previos realizados en INIA se constató que las plantas de esta especie presentaban siempre menor infestación por mosca blanca que otros genotipos de papa que compartían el mismo sitio de cultivo con *S. commersonii*. Esta observación condujo a la hipótesis de que la menor tasa de infestación podría deberse a la presencia de sustancias volátiles en esta especie que estuvieran actuando como repelentes de la mosca blanca.

La estrategia que se aplicó fue la de cultivar plantas supuestamente repelentes del insecto plaga intercaladas con plantas del cultivo que queremos proteger, práctica conocida como “intercropping”, en la que dos o más cultivos se plantan y se hacen crecer juntos (Vandermeer, 1989).

La función de las sustancias volátiles repelentes es provocar un rechazo a distancia de los insectos, haciendo que estos no puedan encontrar a la planta que los emite o que la planta no les resulte atractiva. De esta manera, al cultivar intercaladamente una planta que emite volátiles repelentes, las plantas de tomate (cultivo hospedero natural al que queremos proteger) no serán elegidas por la plaga.

Objetivo

Probar la hipótesis de que *S. commersonii* pueda afectar las poblaciones de mosca blanca en tomate cuando ambas plantas se hacen crecer en forma intercalada.

Metodología

El ensayo se realizó en dos macrotúneles experimentales de 10 m x 3.5 m cada uno, instalados en el campo experimental de INIA Las Brujas, durante el otoño de 2014 (Figura 1A).

En cada macrotúnel se colocaron 40 plantas en total (Figura 1B): en uno solo plantas de tomate y en el otro plantas de tomate intercaladas con plantas de *S. commersonii*.

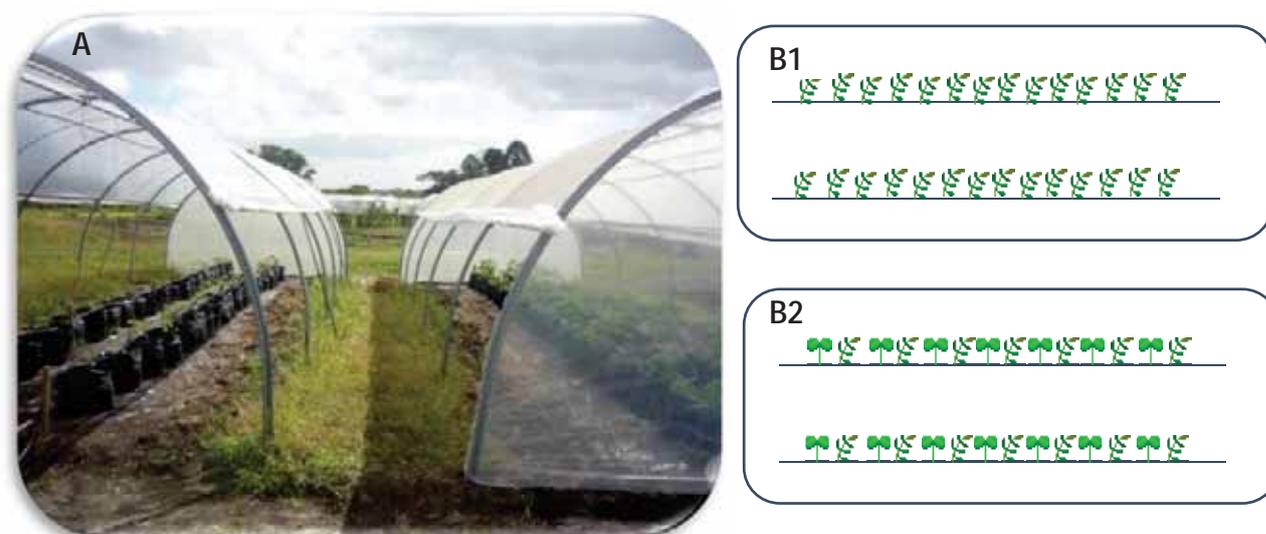


Figura 1: Disposición del experimento realizado en macrotúneles (A). En un macrotúnel se plantó únicamente tomates (B1), y en el otro tomates intercaladas con plantas de *S. commersonii* (B2).

Una vez que las plantas tuvieron el tamaño adecuado se efectuó la infestación controlada con adultos de mosca blanca en ambos macrotúneles.

Tanto para este ensayo como para el descrito a continuación se contó con una cría permanente de mosca blanca establecida en las instalaciones de INIA Las Brujas. La infestación se realizó colocando en cada macrotúnel dos plantas de tomate con mosca blanca provenientes de dicha cría.

Se realizaron evaluaciones semanales en ambos macrotúneles revisando diez plantas de cada especie. Las observaciones en las plantas de tomate se realizaron en dos zonas, la zona superior y la zona inferior, ya que la plaga puede distribuirse diferencialmente en la planta.

El grado de infestación de las plantas con mosca blanca fue evaluado a través de tres variables:

- 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.

Los datos fueron analizados a través de ANOVA para medidas repetidas (para el caso de Nº de adultos y % Incidencia) y Modelo Lineal General (para el caso de Severidad) utilizando el paquete estadístico SPSS Statistics 17.0.

Resultados

Se realizaron comparaciones de las tres variables en el tiempo entre el tomate cultivado solo y el tomate cultivado intercaladamente con plantas de *S. commersonii* (tomate co-cultivado).

En la evaluación del número de adultos de mosca blanca sobre las hojas de tomate de ambos tratamientos en función del tiempo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de población presente en la zona superior de las plantas (Gráfico 1).

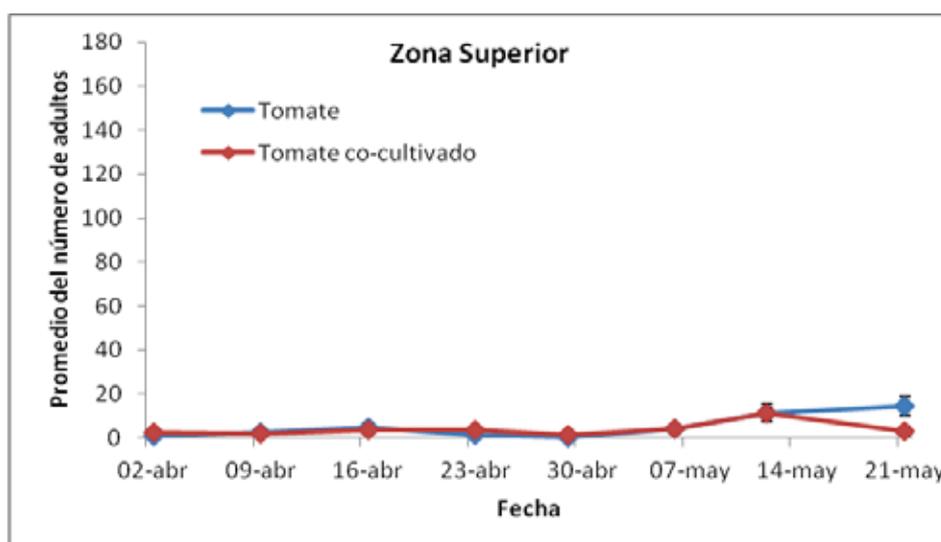


Gráfico 1: Promedio del número de adultos de mosca blanca presentes en la zona superior de las plantas en cada fecha de evaluación (ANOVA: Planta $p = 0.354$, Tiempo $p < 0.001$).

Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de adultos de mosca blanca presentes en la zona inferior entre las plantas de tomate cultivadas solas y las co-cultivadas con *S. commersonii* (Gráfico 2).

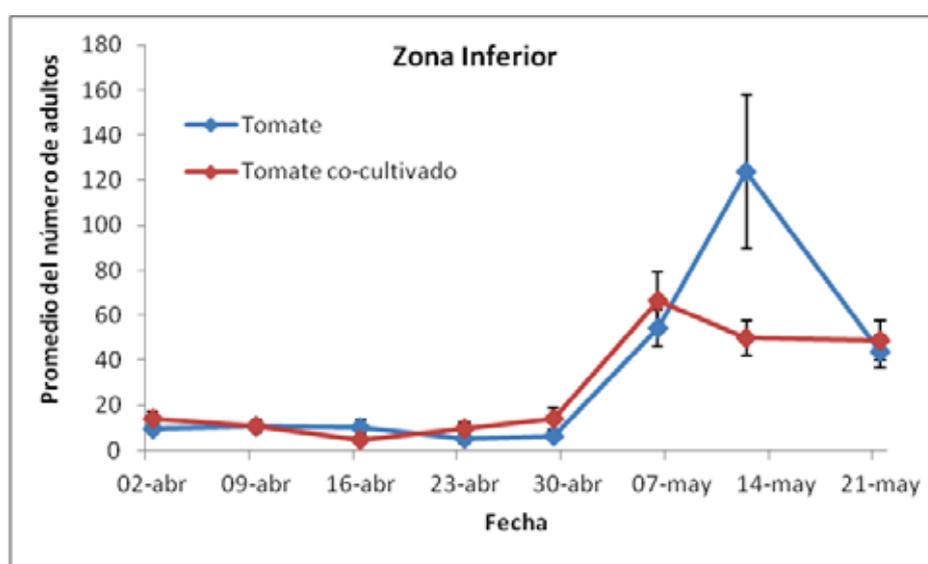


Gráfico 2: Promedio del número de adultos de mosca blanca presentes en la zona inferior de las plantas en cada fecha de evaluación (ANOVA Planta $p = 0.927$, Tiempo $p < 0.001$).

Si comparamos las poblaciones presentes en la zona superior y la inferior se observa que existió una distribución diferencial de los adultos de mosca en la planta, registrándose un mayor número de las mismas en la zona inferior, sobre todo hacia el final del período de evaluación.

Las evaluaciones de los niveles poblacionales de ninfas sobre el envés de los folíolos para el caso de la medición de incidencia de ataque en ambos tratamientos, tampoco detectaron diferencias significativas en ninguna de las zonas de las plantas de tomate (Gráfico 3 para la zona superior y Gráfico 4 para la zona inferior).

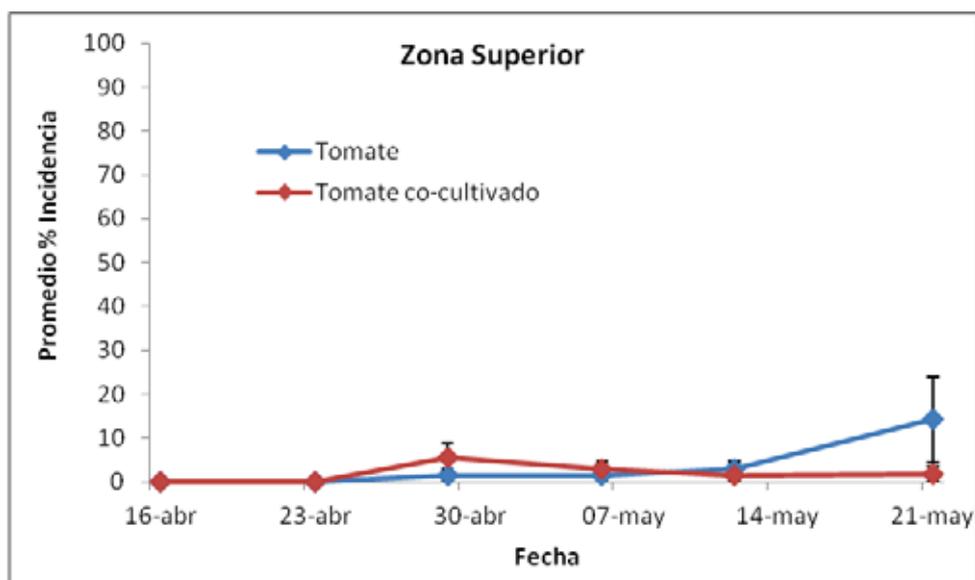


Gráfico 3: Promedio del porcentaje de incidencia de ninfas sobre los folíolos de la zona superior de las plantas en cada fecha de evaluación (ANOVA Planta $p=0.392$, Tiempo $p=0.07$).

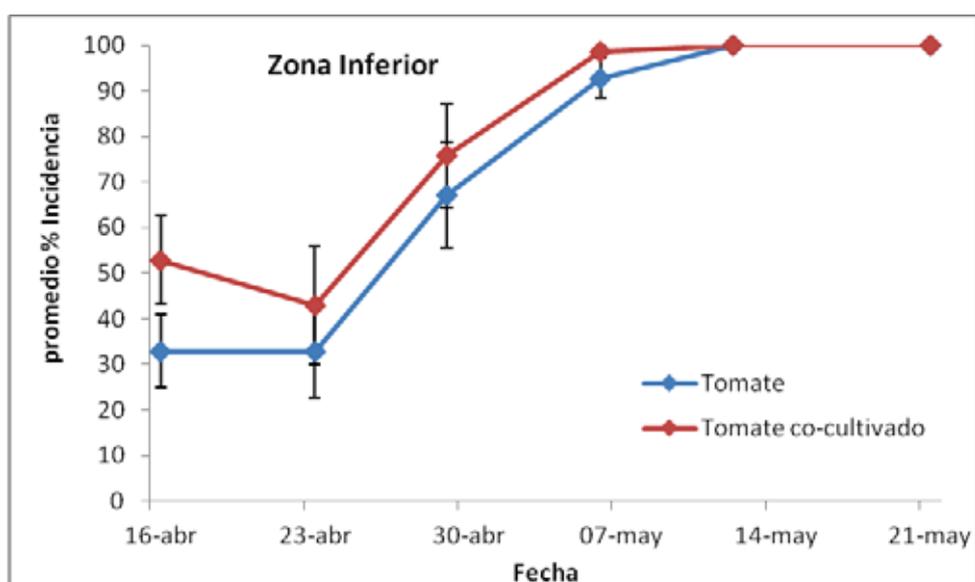


Gráfico 4: Promedio del porcentaje de incidencia de ninfas sobre los folíolos en la zona inferior de las plantas en cada fecha de evaluación (ANOVA Planta $p=0.107$, Tiempo $p<0.001$).

También se observó una mayor incidencia de ninfas en los folíolos de la zona inferior que en la zona superior para ambas plantas, llegando incluso al 100 % de incidencia hacia el final del ensayo. Esta observación nos estaría indicando que las hembras preferirían oviponer en la zona inferior de las plantas.

En el caso de la severidad, no hubo diferencias significativas para la zona superior (Gráfico 5) pero si para la zona inferior, donde se detectaron diferencias significativas en la severidad entre el tomate que había sido cultivado solo y el tomate co-cultivado junto a *S. commersonii* (Gráfico 6); siendo esta mayor para el tomate co-cultivado durante las primeras evaluaciones.

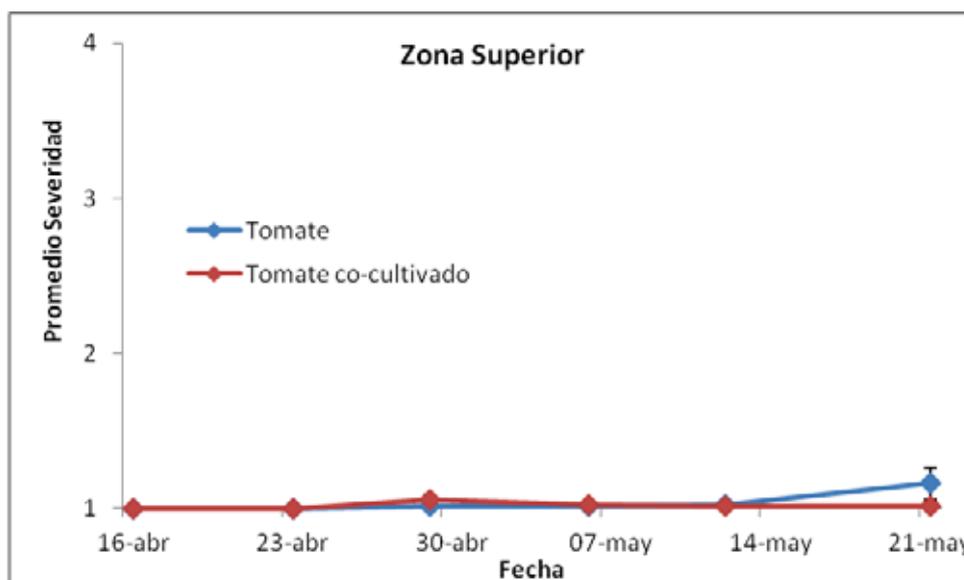


Gráfico 5: Promedio de la severidad de la presencia de ninfas sobre los folíolos de la zona superior de ambas plantas en cada fecha de evaluación (MLGG Planta $p = 0.804$, Tiempo $p = 0.995$).

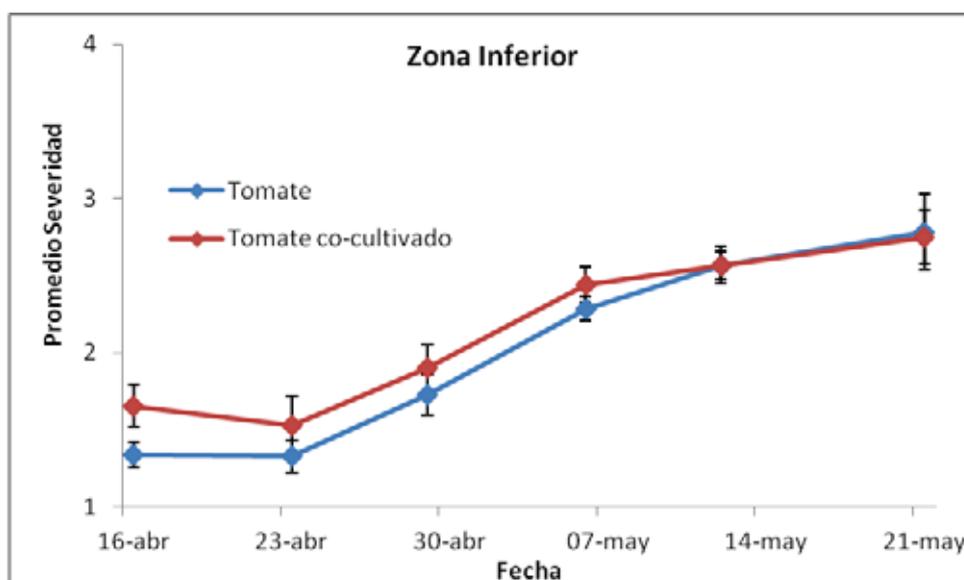


Gráfico 6: Promedio de la severidad de la presencia de ninfas sobre los folíolos de la zona inferior de ambas plantas en cada fecha de evaluación (MLGG Planta $p = 0.029$, Tiempo $p < 0.001$).

Nuevamente se observó que la severidad fue mayor en la zona inferior de la planta, lo que se correlaciona con las observaciones previas de incidencia y presencia de adultos.

También se hicieron comparaciones de las tres variables (Nº Adultos, % Incidencia y Severidad) entre *S. commersonii* y el tomate co-cultivado con *S. commersonii*. Se tomaron en cuenta los datos obtenidos para la zona inferior de las plantas de tomate, la cual coincide por tamaño y altura de copa con la planta de *S. commersonii*. Además fue en esta zona donde se encontraron los mayores valores de las variables medidas. Dado que la superficie de un folíolo de *S. commersonii* es menor que la de un folíolo de tomate, para poder comparar los valores de las variables, las mismas se expresan por centímetro cuadrado (cm²) de folíolo.

No se encontraron diferencias significativas en el número de adultos presentes en ambas plantas (Gráfico 7).

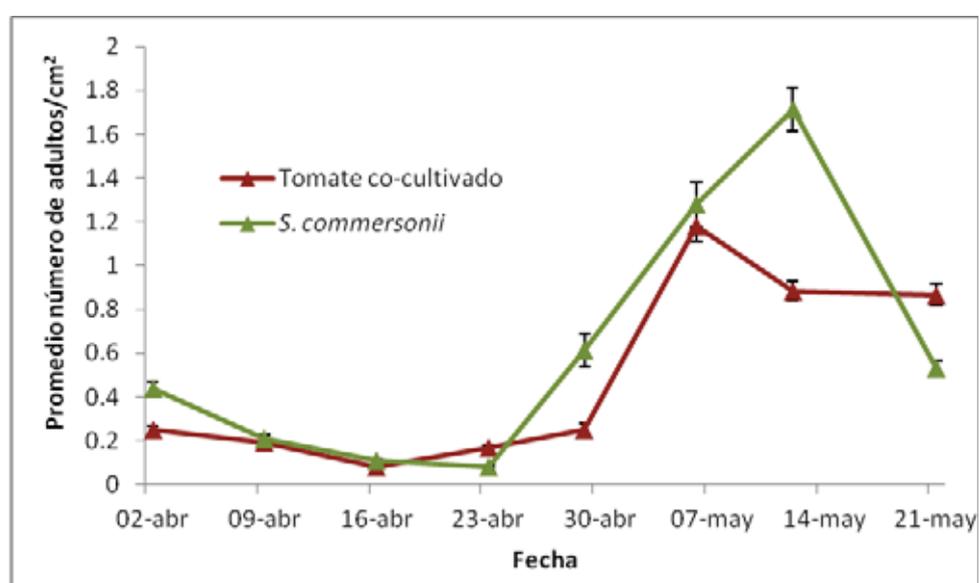


Gráfico 7: Promedio del número de adultos presentes en la zona inferior de las plantas de tomate y en *S. commersonii*, expresados por cm² de hoja de cada especie (ANOVA Planta p=0.084, Tiempo p<0.001).

Sin embargo, a pesar de que las poblaciones de adultos fueron similares, la evaluación de incidencia mostró un porcentaje mayor en las plantas de tomate y con diferencias significativas (Gráfico 8).

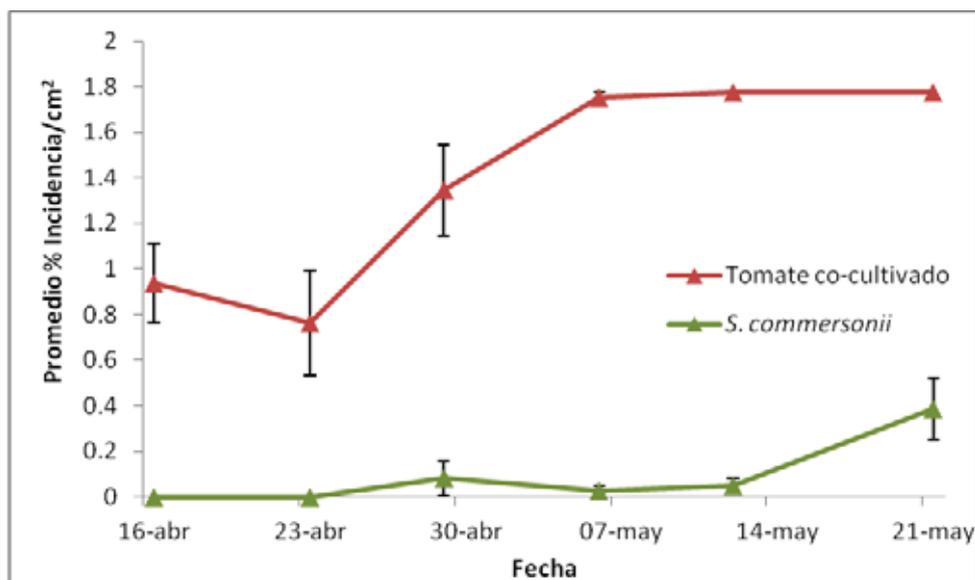


Gráfico 8: Promedio del porcentaje de incidencia de ninfas en la parte inferior de las plantas de tomate y en *S. commersonii*, expresados por cm² de hoja de cada especie (ANOVA Planta p<0.001, Tiempo p<0.001)

La misma tendencia se observó para el caso de la severidad y también con diferencias significativas estadísticamente (Gráfico 9).

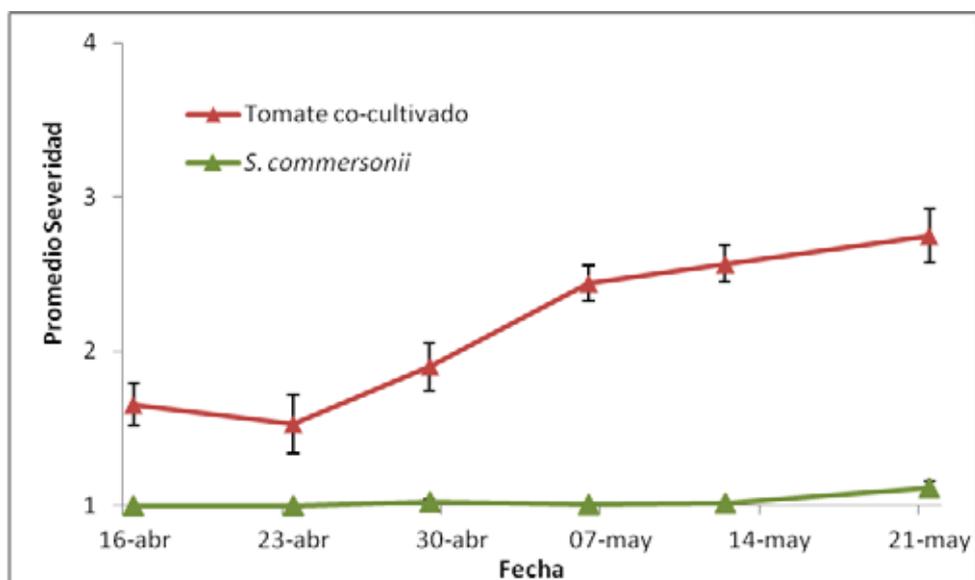


Gráfico 9: Promedio de la severidad de la presencia de ninfas sobre los folíolos de la zona inferior de tomate y *S. commersonii* en cada fecha de evaluación (MLGG Planta p< 0.001, Tiempo p<0.001).

Conclusiones

Se observó una distribución diferencial de las moscas en la planta de tomate, siendo la zona inferior la preferida por las mismas para establecerse y oviponer.

Se puede afirmar que las plantas de tomate no se vieron beneficiadas al ser cultivadas junto con plantas de *S. commersonii*. En esta experiencia el uso del “intercropping” con *S.*

commersonii no fue una buena herramienta para el manejo de mosca blanca en el cultivo del tomate.

Por otro lado, en este trabajo se observó que las plantas de *S. commersonii* presentaban una menor presencia de ninfas de la plaga que las de tomate. Esta deterrencia de oviposición podría deberse a compuestos fijos presentes en la planta como por ejemplo al tipo de glicoalcaloides o a su concentración; también a los tricomas (simples o glandulares) presentes en las hojas, a su tipo o densidad.

Referencias

Vandermeer J (1989) The Ecology of Intercropping. Cambridge: Cambridge University Press

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE MOSCA BLANCA EN TOMATE.

Umpiérrez, M.L.¹, Rossini, C.¹, Paullier, J.²

¹ Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo-Uruguay.

² INIA Las Brujas, Canelones-Uruguay.

mail de correspondencia: crossini@fq.edu.uy

Palabras clave: aceites esenciales, tomate, mosca blanca, plaguicida botánico

Introducción

Una alternativa posible al uso de los agroquímicos convencionales son los plaguicidas botánicos. Dentro de los plaguicidas botánicos se encuentran los aceites esenciales (AE), mezclas complejas de compuestos volátiles de las plantas, considerados como una alternativa de interés por su efectividad y baja persistencia en el ambiente, que los hace menos tóxicos para organismos no diana.

Los AE se han utilizado desde la antigüedad y muchos de ellos han sido ampliamente estudiados. Existen reportes de actividad insecticida y anti-fúngica de AE provenientes de diversas familias botánicas, entre ellas la Asteraceae la cual es una familia muy interesante de considerar.

De esta familia se eligieron dos especies para comenzar con esta línea de trabajo: *Artemisia absinthium* y *Eupatorium buniifolium*.

A. absinthium, cuyo nombre común es ajeno, es una especie introducida en el país y cosmopolita, con actividad anti-alimentaria contra lepidópteros y hemípteros y actividad insecticida frente a plagas de silos. También posee actividad anti-fúngica reportada y su composición química ha sido muy estudiada, existiendo reportes de existencia de varios quimiotipos (variación de los metabolitos secundarios dentro de la misma especie botánica independientemente de las condiciones de crecimiento) distintos de ajeno con diferente composición química de sus AE y diferente actividad biológica que incluyen los tipos puros ricos en (*Z*)-epoxi-ocimeno, acetato de sabinilo y β -tujona; y los mixtos que contienen mezclas de estos terpenos y también (*Z*)-epoxi-ocimeno y acetato de crisantemilo (Figura 1) (Chialva et al., 1983).

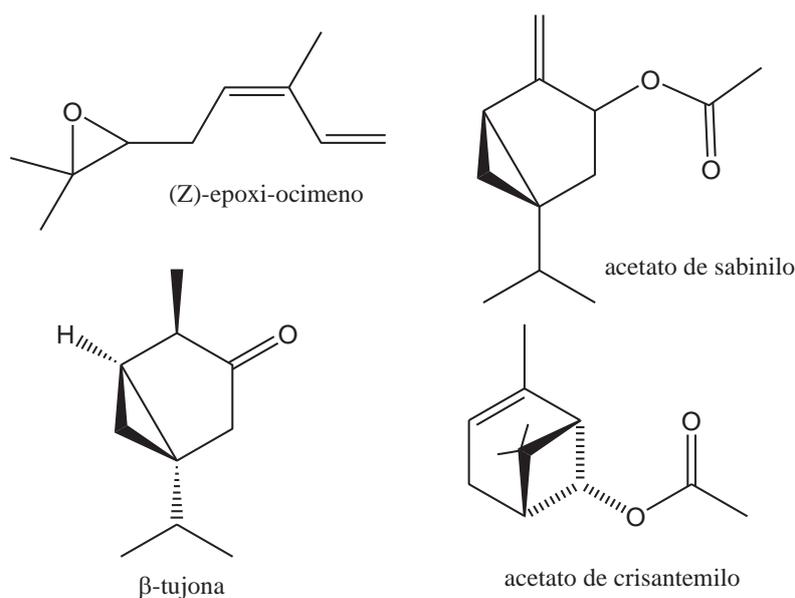


Figura 1: Estructuras de los compuestos químicos que diferencian los quimiotipos de *A. absinthium*.

E. buniifolium comúnmente conocida como chirca, es una planta nativa, considerada maleza, que no tiene valor comercial, pero presenta algunas actividades anti-insecto descritas y de interés, como inhibición de asentamiento de áfidos, repelencia de mosquitos y actividad acaricida. Su composición ha sido estudiada y reportada por el Laboratorio de Ecología Química y coincide con la reportada previamente por Lorenzo et al. (2005) en Uruguay. Sin embargo es diferente de la composición reportada en Argentina (Ruffinengo et al. 2005), lo que sugeriría que para esta especie también podrían existir quimiotipos.

Como se mencionó, se ha trabajado en la identificación de los compuestos que constituyen los AE y se ha demostrado la actividad de los mismos frente a la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* en bioensayos de laboratorio.

Objetivo Evaluar la actividad de los aceites esenciales (AE) frente a mosca blanca en plantas de tomate a nivel de macrotúneles experimentales.

Metodología

Obtención de los AE de ajeno *A. absinthium* y de chirca *E. buniifolium*

Se instaló un cuadro de plantas de ajeno en INIA Las Brujas de manera de asegurarse de trabajar siempre con un mismo quimiotipo. Las plantas fueron obtenidas por propagación vegetativa en el Laboratorio de Biotecnología de INIA. Dicha multiplicación estuvo a cargo de la Ing. Agr. Alicia Castillo. Se partió de un material vegetal perteneciente al Laboratorio de Ecología Química (LEQ) de Facultad de Química, cuya actividad insecticida y anti-fúngica había sido previamente caracterizada.

Debido a que las plantas del cuadro de ajeno se encontraban pequeñas y no se obtuvo una cantidad suficiente de AE para los ensayos, en su lugar se utilizó un AE de ajeno proveniente de España, enviado por el Ing. Agr. Jesús Burillo del Instituto de Ciencias Agrarias, CSIC de Madrid. Este producto, a pesar de no pertenecer al mismo quimiotipo que el ajeno local, sirvió para ir ajustando las dosis y las demás condiciones del ensayo.

Para el caso de circa el material vegetal provino de colectas a campo realizadas en la zona de la Estación Experimental. La extracción del AE de circa se realizó a partir de material vegetal entero y oreado mediante destilación por arrastre con vapor de agua utilizando destilador de tipo alambique de INIA en las instalaciones de la Estación Experimental. El AE obtenido fue secado con sulfato de magnesio anhidro y almacenado en heladera (aprox. 4 °C) en frascos de vidrio color ámbar. Los AE obtenidos en las diferentes destilaciones fueron unificados (generando un batch) para los estudios de actividad.

Evaluación de la efectividad de los AE frente a mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum*

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

a) Establecimiento de la cría de mosca blanca en INIA Las Brujas para la infestación controlada de los macrotúneles. La colonia se inició a partir de hojas de tomate infestadas con los estadios juveniles de mosca, que fueron colectadas en cultivos de tomate de las cercanías. Las hojas fueron colocadas sobre plantas de tomate sanas mantenidas en un invernáculo de vidrio con condiciones controladas. Esta cría se utilizó también para el trabajo con *S. commersonii*.

b) En INIA LB se armaron macrotúneles experimentales de 35 m² para el cultivo de tomate de otoño 2014, con dos canteros de 20 plantas en cada uno.

c) 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 evaluó la incidencia inicial antes de aplicar los tratamientos.

d) Tratamientos:

- Control negativo, testigo agua-Tween 20 (98:2)
- AE de circa en agua-Tween 20 (98:2)
- AE de ajeno en agua-Tween 20 (98:2)
- Control positivo, testigo tratado con insecticida (Acetamiprid)

La aplicación de los tratamientos se realizó con máquina mochila a motor asperjando a punto de goteo. Los AE se aplicaron a una concentración de 1.5 % para la primera aplicación incrementando a 3 % en las dos aplicaciones siguientes.

e) Evaluaciones del ensayo: se realizaron inspecciones visuales semanales de cada macrotúnel durante el periodo de ensayo.

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.

f) Frecuencia de aplicación de los tratamientos: se realizaron tres aplicaciones de acuerdo a la evolución de los niveles de mosca.

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, 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 (2 %) se comparó contra el control negativo, 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 (al final del ensayo).

Los datos se analizaron estadísticamente a través del Modelo Lineal General Univariante utilizando el paquete estadístico SPSS Statistics 17.0.

Resultados

Inocuidad de los AE sobre plantas de tomate

La inocuidad de los AE se evaluó estudiando los efectos fitotóxicos en las hojas y producción de frutos, a través del registro de la necrosis de las hojas y el rendimiento de la cosecha.

No se observó necrosis de las hojas de tomate en ningún momento del ensayo, incluso cuando la dosis de los AE se duplicó (3 %).

Para evaluar el rendimiento de la cosecha se registró el peso y número de frutos cosechados (Tabla 1).

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	Peso (Kg)	Nº frutos
Chirca	11.62	81
Ajenjo	8.94	56
Testigo	11.55	79
Control químico	13.46	84

Como se observa en la Tabla 1, para el AE de chirca el rendimiento fue similar a los controles. En el caso del ajeno se cosechó un menor número de frutos aunque del mismo peso que los demás.

Efectividad de los AE en el control de mosca blanca

En cuanto al porcentaje de incidencia de ninfas, no se observaron diferencias para ninguno de los tratamientos tanto si se los compara con el testigo como con el control químico (Gráfico 1).

O sea que para esta variable los AE se comportaron de igual manera que el insecticida utilizado comúnmente para controlar este insecto.

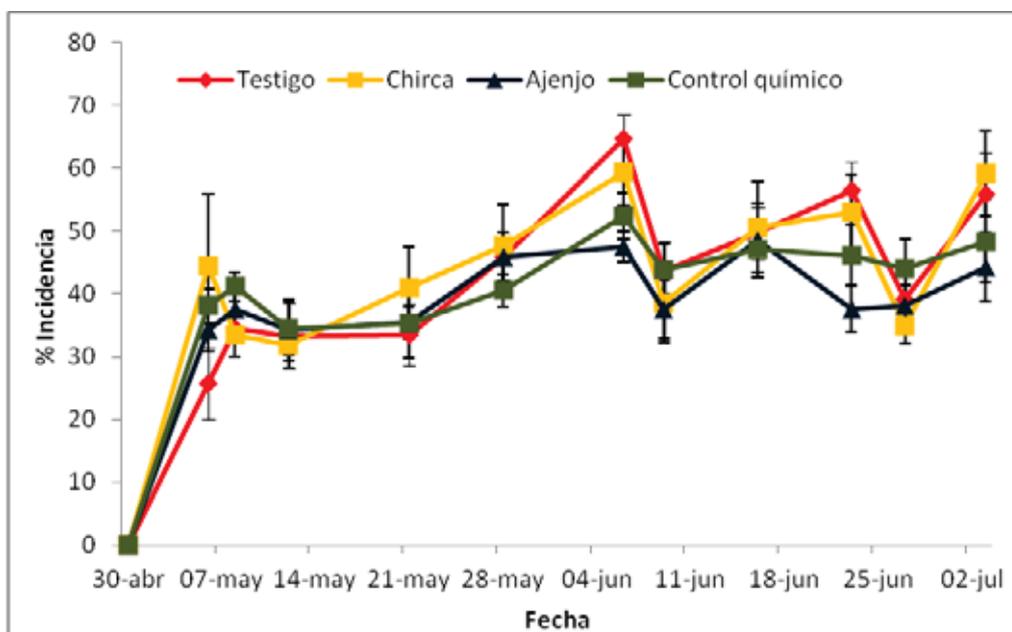


Gráfico 1: Promedio del porcentaje de Incidencia de ninfas durante todo el ensayo para cada tratamiento.

Tampoco se observaron diferencias en la severidad observada para ninguno de los tratamientos (Gráfico 2).

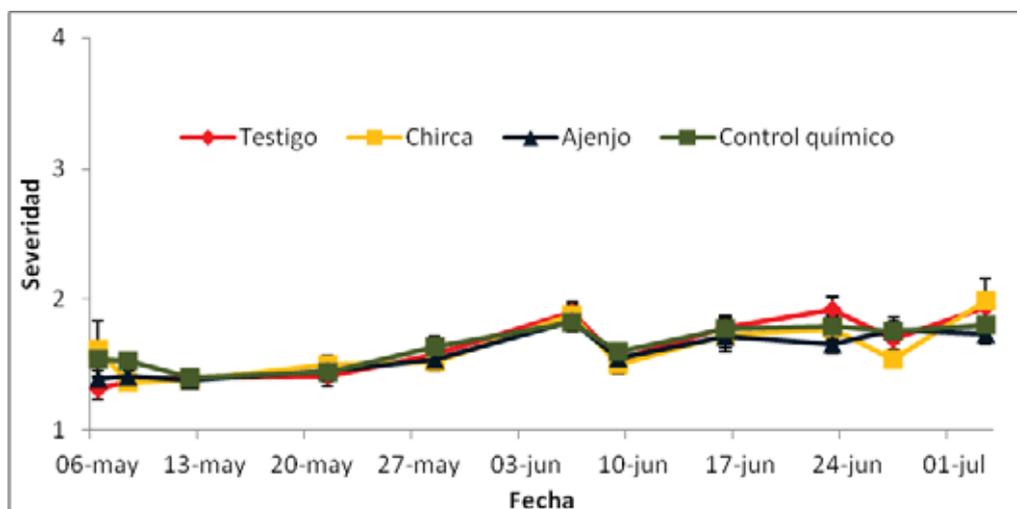


Gráfico 2: Promedio de la severidad de la presencia de ninfas en los folíolos de tomate para cada tratamiento a lo largo de todo el ensayo.

Como se observa en los gráficos 1 y 2, una vez que la población de moscas se estableció, la incidencia y severidad de la presencia de ninfas no varió sustancialmente en todo el ensayo para todos los tratamientos.

En cuanto a la población de adultos la misma sufrió variaciones mayores a lo largo de todo el ensayo para todos los tratamientos tal como se observa en el Gráfico 3. En ese mismo gráfico se muestran con flechas los momentos de aplicación de los tratamientos y la evaluación inmediatamente posterior.

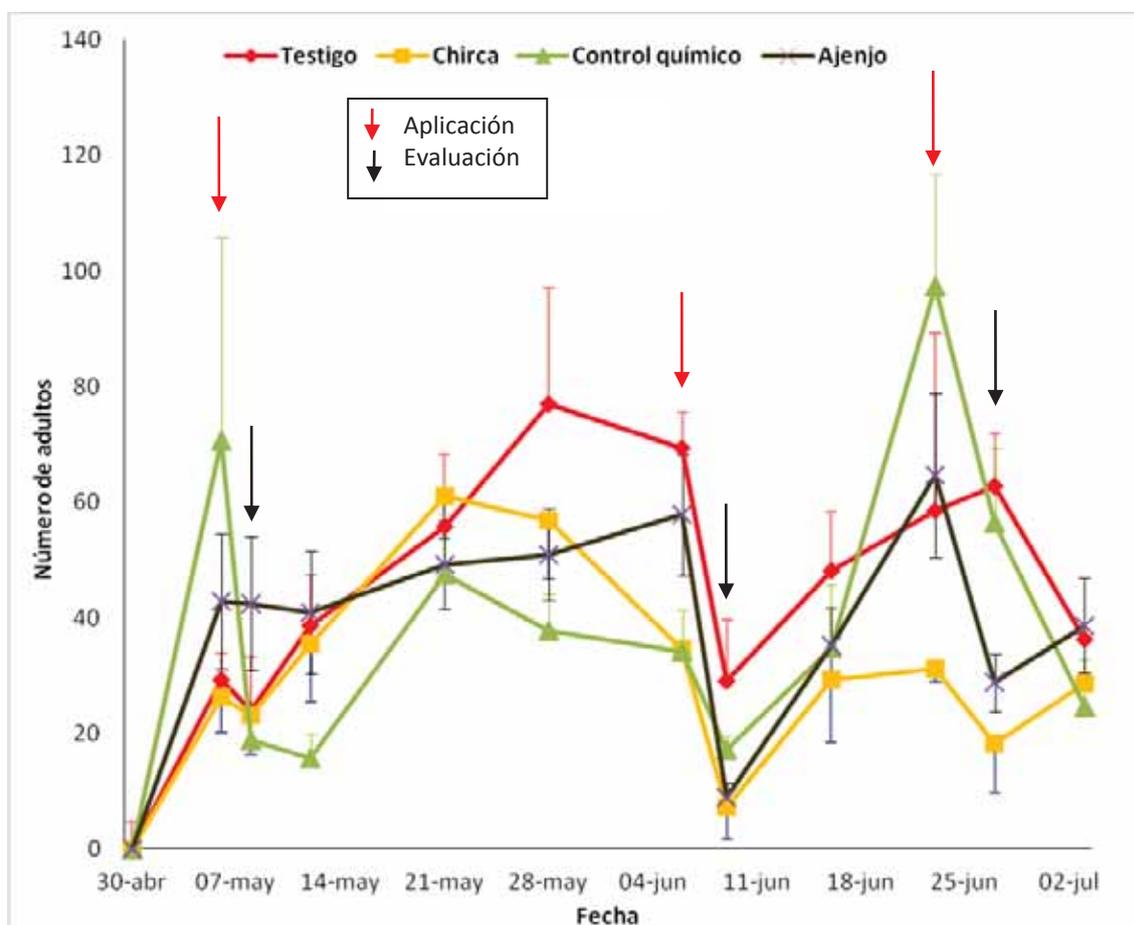


Gráfico 3: Variación de la población de adultos de mosca blanca durante el ensayo para cada tratamiento. Con las flechas se marcan los momentos de aplicación de los productos y evaluación inmediatamente posterior.

Para poder visualizar mejor el efecto provocado por la aplicación de los productos se calcula y grafica el descenso poblacional, esto es, la diferencia entre el número de adultos antes y después de la aplicación (Gráfico 4). Las barras altas corresponden a descensos grandes en las poblaciones, las barras más bajas serán descensos más pequeños. También puede ocurrir que no haya un descenso poblacional o que incluso la población aumente, en ese caso veremos barras “invertidas” (con el componente y negativo).

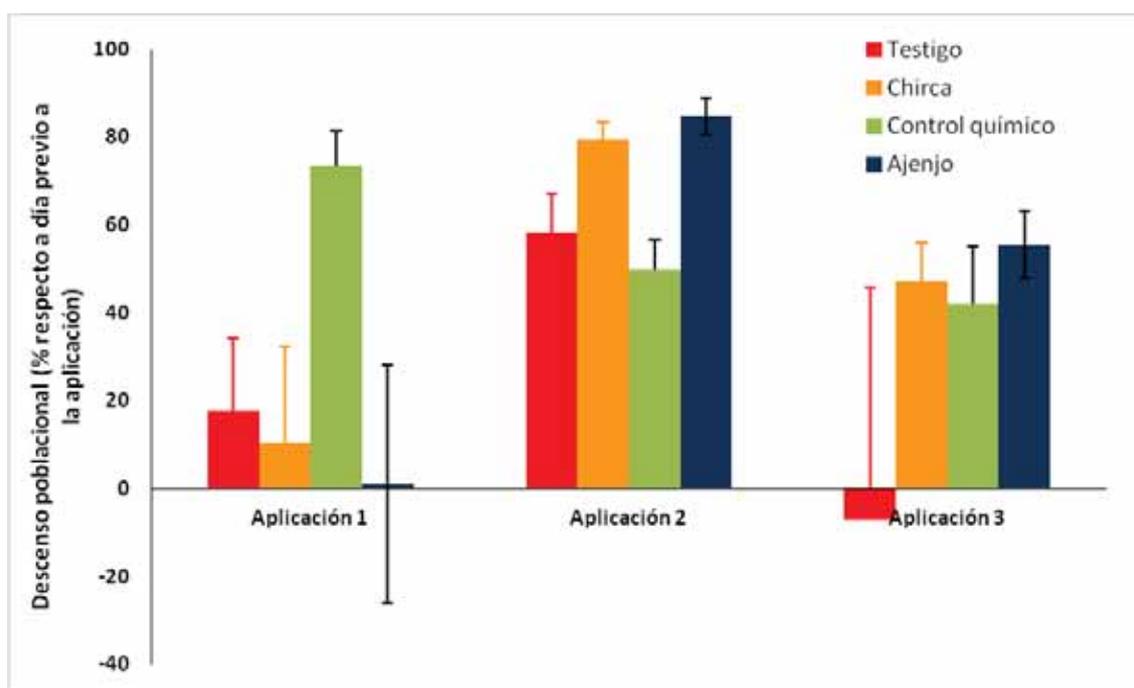


Gráfico 4: Descenso de la población de adultos de mosca blanca para cada tratamiento luego de las aplicaciones de los productos.

Podemos observar que en la 1er aplicación los AE no provocaron un descenso en la población de adultos. O sea que a una concentración de 1.5 % los AE parecerían no ser efectivos para el control de dicho insecto.

Sin embargo, cuando la dosis de los AE se aumenta a un 3 % se logra un efecto comparable al control químico.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta primera temporada de trabajo no son concluyentes. Se continuará trabajando, ajustando momentos de aplicación de los AE y concentraciones aplicadas de los mismos.

A pesar de esto, podemos decir que las dosis de los AE aplicadas no provocaron necrosis de las hojas de las plantas de tomate, por lo que los mismos podrían ser utilizados sin perjuicio de la planta.

Por otro lado, podríamos decir que la dosis de 1.5 % no sería efectiva para controlar las poblaciones de adultos de mosca blanca y se necesitaría aplicar mayores dosis.

Referencias

- Chialva F, Liddle P, Doglia G. 1983. *Chemotaxonomy of wormwood (Artemisia absinthum L.). I. Composition of the essential oil of several chemotypes* **European Food Research and Technology**, 176: 363-6.
- Lorenzo D, Paz D, Davies P, Villamil J, Vila R, Cañigüeral S, Dellacassa E. 2005. *Application of multidimensional gas chromatography to the enantioselective characterisation of the essential oil of Eupatorium buniifolium Hooker et Arnott* **Phytochemical Analysis**, 16: 39-44.
- Ruffinengo S, Eguaras M, Floris I, Faverin C, Bailac P, Ponzi M. 2005. *LD50 and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on Varroa destructor* **Journal of Economic Entomology**, 98: 651-655.

CONTRIBUCIÓN AL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS DE LA HORTICULTURA. LÍNEAS DE TRABAJO

Basso César^{1*}, Buenahora José², Bao Leticia¹, Lorenzo María¹, Caraballo María¹, Ziminov Mónica¹, Grille Gabriela¹, Méndez Luciana¹

¹ Facultad de Agronomía, Universidad de la República. ² INIA Salto Grande.

* Facultad de Agronomía, Av. Garzón 780, 12900 Montevideo, Uruguay. E-mail: cbasso@adinet.com.uy

Palabras clave: *Ambyseius swirskii*, *Orius insidiosus*, *Bemisia tabaci*, *Frankliniella occidentalis*, Aphididae.

Introducción

La horticultura en Uruguay es un sector estratégico por su incidencia en la alimentación de la población, el número de personas involucradas directa e indirectamente y el afincamiento de familias en el entorno de las ciudades. La viabilidad de las explotaciones depende cada vez más de que se alcance un desarrollo sustentable, tanto en su dimensión económica, social como ambiental. Dentro del sistema de producción, la tendencia mundial es controlar las plagas con el menor uso de insecticidas químicos, y la mayor aplicación y respeto por los agentes de control biológico.

En ese marco, en Uruguay desde el año 2011 se lleva cabo un programa dirigido a implementar un manejo sanitario del cultivo de morrón bajo invernadero para el control de las dos plagas más importantes: la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera, Aleyrodidae) y el trips occidental de las flores *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera, Thripidae). El programa se basa en la utilización de dos depredadores, el ácaro *Ambyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari, Phytoseiidae) y la chinche *Orius insidiosus* Say (Hemiptera, Anthocoridae), y otras medidas compatibles para otros problemas de plagas.

Dichos depredadores son suministrados e implementados por la empresa BROMETAN, que es la responsable de su utilización en distintas regiones de Argentina, sumado a las numerosas experiencias que demuestran su eficacia a nivel internacional (Nomikou *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008; Bueno y Poletti, 2009; Cédola y Polack, 2011; van Lenteren, 2011).

Esta actividad se desarrolla exitosamente en la región hortícola de Salto y recientemente se inició en el sur del país, involucrando en total a más de 50 productores y 40 hectáreas de cultivo. De ese modo ha pasado a ser una realidad la aplicación de una técnica innovadora para el control de las plagas del cultivo de morrón en Uruguay, la cual está modificando al conjunto del paquete tecnológico disponible para este cultivo.

Los avances registrados en la materia no están exentos de dificultades y nuevos requerimientos. En ese sentido aun debe mejorarse el control de los trips en algunos momentos de año, así como evitar el incremento de los pulgones (en especial *Myzus persicae* (Sulzer), Hemiptera, Aphididae) constatado en los cultivos de morrón a nivel nacional.

Para ello se llevan adelante estudios de laboratorio y campo en el marco de un proyecto INNOVAGRO/ANII, centrado en los problemas claves no resueltos del programa de control biológico de plagas en morrón.

Líneas de trabajo

1. Estudios tendientes a incrementar la eficacia de *O. insidiosus*, y a evaluar su compatibilidad con *A. swirskii* en el control de los trips y con la aplicación de otras medidas sanitarias para el control de otras plagas.

Estudios en marcha:

- a. Control de calidad de *O. insidiosus* en partidas comerciales y poblaciones colectadas en la región hortícola de Salto.
 - b. Determinación de las variables biológicas de *O. insidiosus* en partidas comerciales y poblaciones colectadas en la región hortícola de Salto.
 - c. Conveniencia de las plantas de morrón en el establecimiento de *O. insidiosus*.
 - d. Evaluación de las interacciones al interior del complejo *A. swirskii* - *O. insidiosus* - *F. occidentalis* y sus efectos en la regulación de la plaga.
 - e. Valoración del efecto sobre *O. insidiosus* de los insecticidas utilizados en el manejo sanitario de otras plagas del morrón.
- 2 Estudio de los pulgones y sus reguladores naturales en cultivos de morrón con distintos sistemas de manejo sanitario.

Estudio en marcha:

- a. Descripción de las redes tróficas de la comunidad que regula los pulgones en el cultivo de morrón en la región hortícola de Salto y del sur del país.
- b. Identificación y cuantificación de los agentes de control natural de los pulgones.

Referencias bibliográficas

- Bueno VHP, Poletti M. 2009. Progress with biological control and IPM strategies in protected cultivation in Brazil'. *IOBC/WPRS Bulletin*, 49: 31-36.
- Carvalho AR, Bueno VHP, Santana AG, Moura N, Louzada EA. 2008. Release rates of *Orius insidiosus* to control *Frankliniella occidentalis* on protected potted gerbera'. *IOBC/WPRS Bulletin*, 32: 37-40.
- Cédola C, Polack A. 2011. Primer registro de *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) en Argentina. [En línea] *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 70: 375-378. Consultado el 29 abril de 2014. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/rsea/v70n3-4/v70n3-4a24.pdf>
- Nomikou M, Janssen A, Schraag R, Sabelis MW. 2001. Phytoseiid predators as potential biological control agents for *Bemisia tabaci*. *Experimental and Applied Acarology*, 25: 271-291.
- Silveira LCP, Bueno VHP, van Lenteren JC. 2004. *Orius insidiosus* as biological control agent of thrips in greenhouse chrysanthemums in the tropics. *Bulletin of Insectology* 57: 103-109.
- van Lenteren JC. 2011. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl*, 57: 1-20.

EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS E INSECTICIDAS EN PIMIENTOS PROTEGIDOS COMO UN APORTE AL MANEJO INTEGRADO DE ENFERMEDADES Y PLAGAS

José Buenahora¹, Leticia Rubio¹.

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA)

jbuenahora@inia.org.uy, lrubio@inia.org.uy

Introducción

El pimiento (*Capsicum Annum*), uno de los principales cultivos protegidos en la zona norte del país, ha tenido serias limitantes productivas por la presencia de ciertas plagas y enfermedades en la región. Desde el año 2014, el sector productivo comenzó a implementar un manejo integrado de plagas con énfasis en el control biológico utilizando el ácaro depredador *Amblyseius swirskii* para el control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* y la chinche *Orius insidiosus* para el control de trips. *A. swirskii* ha sido muy eficiente logrando con mucho éxito el control de la plaga objetivo, sin embargo *Orius* presenta dificultades que se están estudiando. La utilización de enemigos naturales en pimientos comerciales implica la búsqueda de un manejo más racional (complementario y selectivo) de los agroquímicos comúnmente utilizados. En este sentido, es necesario compatibilizar los productos y manejos sanitarios con los enemigos naturales empleados en los invernaderos. La Oidiopsis (*Leveillula taurica*) es actualmente uno de los principales problemas sanitarios del cultivo y requiere numerosas aplicaciones para su control. De esta manera, en el contexto del MIP, nos hemos propuesto como objetivo: evaluar la efectividad de productos químicos y biológicos 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

El ensayo se desarrolló en INIA, se utilizó un cultivo 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* al comienzo de la temporada. 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 mismas fueron realizadas en función de la evaluación semanal de control de la enfermedad. Se registraron las condiciones ambientales 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 del programa estadístico SAS.

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

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

Experimento 1. Evaluación de distintos productos para el control de oidio, octubre 2014.

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.

Tratamiento	Principio activo	Dosis (100lts)
1- Testigo, sin aplicación		
2- Baktillis	Bacillus subtilis 2.5x10 ⁹ cfu/ml	500cc
3- Rally	Myclobutanil 261g/l	55g
4- Extracto de Neem	Azadiractina 1,5g/l	300cc
5- Extracto de Neem	Azadiractina 0,3 g/l	300cc
6- Tixan	Alginato de cobre 15%, extractos de fermentación 85%	300cc

Tabla 1.2. Esquema de aplicaciones.

Tratamientos	09/10/2014	16/10/2014	23/10/2014
1 Testigo			
2 Baktillis	x	x	x
3 Rally	x	x	x
4 E. neem 1500	x	x	x
5 E. neem 300	x	x	x
6 Tixan	x		x

Resultados

Todos los tratamientos controlaron la Oidiopsis con respecto al testigo. El tratamiento 6 (Tixan) fue el más eficiente, disminuyendo el nivel de severidad de 4 a 1 luego de la primera aplicación (Cuadro 1.1). Los extractos de neem fueron eficientes luego de 3 aplicaciones, siendo más efectivo el extracto de mayor concentración. El tratamiento con *Bacillus subtilis* necesito 3 aplicaciones distanciadas semanalmente para lograr un control aceptable de la enfermedad (escala 2).

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

Tratamiento	Fecha de evaluación			
	08/10/14 (*)	16/10/14	23/10/14	30/10/14
1- Testigo	4,3 a	4,6 a	5,0 a	4,0 a
2- Baktillis	4,3 a	3,6 ab	3,6 b	2,0 b
3- Rally	4,4 a	3,0 bc	2,3 cd	1,0 cd
4- E. neem 1500ppm	4,0 a	2,6 c	2,6 bcd	0,8 cd
5- E. neem 300ppm	4,0 a	2,5 c	3,3 bc	1,5 bc
6- Tixan	4,3 a	1,0 d	2,0 d	0,6 d

(*) nivel de oidiopsis 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)

La mayoría de los tratamientos no afectaron significativamente la población del *A. siwrkii* (Cuadro 1.2). El tratamiento con Rally (myclobutanil) fue muy selectivo para el depredador. El extracto de neem 300 ppm y Tixan, mostraron al final del experimento, ser poco nocivos para el enemigo natural. En ambos tratamientos, luego de la aplicación hay un efecto depresivo de corta duración, luego la población se recupera.

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

Tratamientos	Fecha de evaluación				
	9-oct	13-oct	16-oct	23-oct	30-oct
Testigo	¹ 0,8 a	² 1,1 ab	¹ 1,5 a	² 1,5 a	¹ 1,8 ab
Baktillis	1,0 a	0,8 ab	1,1 a	0,8 b	1,0 bc
Rally	0,9 a	1,4 a	1,5 a	1,2 ab	1,6 abc
E. neem 1500 ppm	0,9 a	0,8 ab	1,3 a	1,0 ab	0,9 c
E. neem 300 ppm	0,6 a	0,7 b	1,1 a	1,6 a	2,0 a
Tixan	0,8 a	0,9 ab	1,3 a	1,5 a	1,6 abc

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

¹Medias en las columnas con diferente letra son significativamente diferentes al 0,05 (Tukey).

²Medias en las columnas con diferente letra son significativamente diferentes al 0,10 (Tukey).

Experimento 2. Evaluación de diferentes concentraciones de Extractos de neem para el control de oidio, mayo 2015.

Los tratamientos utilizados se detallan en la tabla 2.1 y el momento de las aplicaciones en la tabla 2.2.

Tabla 2.1. Tratamientos y dosis utilizadas.

Tratamiento	Principio activo	Dosis (100lts)
1- Testigo, sin aplicación		
2- E. neem 300ppm	Azadiractina 0,3g/l	300cc
3- E. neem 10000ppm	Azadiractina 10g/l	200cc
4- E. neem 3000ppm	Azadiractina 3g/l	300cc
6- E. neem 1500ppm	Azadiractina 1,5g/l	300cc

Tabla 2.2. Fecha de aplicaciones

Tratamientos	11/05/15	18/05/15	25/05/15
1- Testigo			
2- E. neem 300ppm	x	x	x
3- E. neem 10000ppm	x	x	x
4- E. neem 3000ppm	x	x	x
6- E. neem 1500ppm	x	x	x

Resultados

Las aplicaciones comenzaron con un nivel medio de oidio (escala: 2,3), pero tras la primer aplicación la enfermedad no disminuyó en ningún tratamiento, sino que aumentó (Cuadro 2.1). Las condiciones ambientales fueron muy predisponentes para el desarrollo del hongo y bajo estas circunstancias una aplicación de estos productos, a las dosis utilizadas, no fueron efectivas en ningún caso. En cambio, con dos aplicaciones, distanciadas semanalmente, los E. neem 300, 3000 y 1500ppm ejercieron el control de la enfermedad. Luego de la última aplicación (25/5/15) se observó que el E. neem 300ppm fue el tratamiento que logro mayor control, los E. neem 1500 y 3000 tuvieron un comportamiento intermedio y el E. neem 10000ppm a dosis de 200cc/100l no fue efectivo para el control del patógeno.

Cuadro 2.1. Nivel promedio de *oidiopsis* en los distintos tratamientos, según escala (**)

Tratamiento	Fecha de evaluación			
	11/05/15 (*)	18/05/15	25/05/15	01/06/15
1- Testigo	2,3a	3,5a	4,3a	5,0a
2- E. neem 300ppm	2,3a	3,3a	1,6c	1,6d
3- E. neem 10000ppm	2,5a	3,5a	3,8ab	3,6b
4- E. neem 3000ppm	2,3a	3,2a	2,6ab	2,1cd
5- E. neem 1500ppm	2,3a	2,6a	2,0bc	2,6bc

(*) nivel de oidiopsis 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)

Los datos presentados en el cuadro 2.2 permiten mencionar que a los 4 días de la aplicación fundamentalmente el E. de neem 10000 ppm tiene un efecto depresivo, de corta duración, sobre el ácaro depredador. Sin embargo en todos los casos, transcurrida una semana del tratamiento este efecto desaparece, mostrando similares poblaciones las parcelas tratadas y el testigo. Finalmente, también se debe mencionar que si bien para el control de la enfermedad sería necesario más de un tratamiento consecutivo con el E. de neem, ello es significativamente nocivo sobre las poblaciones de *A. swirskii*. Todos los tratamientos que recibieron 3 aplicaciones al 1 de junio mostraron una población significativamente menor al testigo.

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

Tratamientos	Fecha de evaluación				
	11-may *	15-may	18-may	25-may	1-jun
Testigo	1,60 a**	2,10 a	1,03 a	1,27 a	1,40 a
E. neem300 ppm	1,40 a	1,17 ab	0,97 a	0,20 b	0,30 b
E. neem10000 ppm	1,03 a	1,07 b	0,93 a	0,47 ab	0,43 b
E. neem3000 ppm	1,27 a	1,20 ab	0,53 a	0,43 ab	0,33 b
E. neem1500 ppm	1,27 a	1,17 ab	1,03 a	0,13 b	0,37 b

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

* n° de individuos móviles de *A. swirskii* presentes en el área de muestreo pre-aplicación

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

Experimento 3. Evaluación de productos y coadyuvantes para el control de oidio, octubre 2015.

Los tratamientos utilizados se detallan en la tabla 3.1 y el momento de las aplicaciones en la tabla 3.2.

Tabla 3.1. Tratamientos y dosis utilizadas.

Tratamiento	Principio activo	Dosis (100lts)
1- Testigo, sin aplicación		
2- E. neem 10000ppm	Azadiractina 10g/l	300cc
3- Bellis	Boscalid-Piraclostrobin	120g
4- Bio-D	Ácido cítrico 23.8%-Mn 2.7%- S 3.1%- Zn 4.8	700cc
5- Rally	Myclobutanil 261g/l	55g
6- Rally+Silwet	Myclobutanil 261g/l+coadyuvante	55g+20cc
7- Silwet	coadyuvante organosilícico	20cc

Tabla 3.2. Fecha de aplicaciones

Tratamientos	05/10/15	12/10/15	19/10/15
1- Testigo			
2- E. neem 10000ppm	x		x
3- Bellis	x		x
4- Bio-D	x		x
5- Rally	x		x
6- Rally+Silwet	x		x
7- Silwet	x		x

Resultados

Luego de la primer aplicación los tratamientos más eficientes para el control de oidio fueron E. neem 10000, Rally + Silwet y Silwet (Cuadro 3.1). Aunque, Bio-D y Rally también tuvieron buen control y no se diferenciaron estadísticamente de los anteriores; el coadyuvante mejoró el efecto del Rally. El Bellis, en cambio, no ejerció buen control y mantuvo el nivel de enfermedad. Luego de 15 días se aplicó nuevamente, pero ante condiciones predisponentes para el desarrollo del hongo, a la semana pos-aplicación todos los tratamientos mantuvieron un nivel de oidio medio a alto.

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

Tratamiento	Fecha de evaluación			
	05/10/15 (*)	12/10/15	19/10/15	26/10/15
1- Testigo	2.2a	3.5a	3.8a	4.5a
2- E. neem 10000ppm	2.5a	1.2c	2.5bc	2.7b
3- Bellis	2.8a	2.7ab	3.3ab	3.0b
4- Bio-D	2.8a	1.8bc	3.3ab	2.8b
5- Rally	2.2a	1.8bc	2.0c	2.7b
6- Rally+Silwet	2.5a	1.2c	2.3bc	2.2b
7- Silwet	2.5a	1.2c	2.3bc	3.2ab

(*) nivel de oidiopsis 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)

En el cuadro 3.2 se observa que a los dos días de la aplicación todos los productos ejercieron un efecto depresivo en las poblaciones del ácaro, aunque ello no fue significativo. A excepción del Bio- D, este efecto fue similar a una semana de la aplicación. Sin embargo, transcurridos 15 días, las poblaciones incrementaron y fueron similares en todas las parcelas.

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

Tratamientos	Fecha de evaluación			
	5-oct *	7-oct	12-oct	19-oct
Testigo	0,33 a**	0,80 a	1,03 a	0,83 a
E. neem10000	0,30 a	0,23 ab	0,47 ab	0,47 a
Bellis	0,17 a	0,53 ab	0,63 ab	0,83 a
Bio D	0,23 a	0,40 ab	0,33 b	0,70 a
Rally	0,30 a	0,20 ab	0,63 ab	0,90 a
Rally + Silwet	0,17 a	0,57 ab	0,73 ab	0,33 a
Silwet	0,33 a	0,50 ab	0,50 ab	0,50 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 (Tukey).

Conclusiones

- Todos los productos utilizados controlaron la Oidiopsis con diferente efectividad, por lo que constituyen distintas opciones de control para esta enfermedad en sistemas que utilizan controladores biológicos.
- Los extractos de neem, que pueden ser utilizados para el control de otras plagas en el contexto del MIP, mostraron control frente a Oidio y cierta selectividad frente al ácaro depredador.
- Tixan y el E. neem 10000ppm fueron muy efectivos para el control de oidio, aún con alto nivel de inóculo. Sin embargo, parecen afectar las poblaciones de *A. swirskii*, aunque este efecto es de corta duración y transcurrida una semana la población se recupera.
- La rotación de productos es muy importante tomando en cuenta el control del oidio y su efecto sobre el controlador biológico.

Agradecimientos: a Juan Amaral, Verónica Galván, Abel Rodríguez y Estefani Berttoni.

SEGUIMIENTO DE “PESTE NEGRA” EN MORRÓN: EXPERIMENTOS EN LA ZONA SUR DE URUGUAY. CICLO 2013-2014.

Diego Maeso¹, Jorge Paullier¹, Pablo González², Jorge Arboleya¹, Alfredo Fernández¹, Wilma Walasek¹.

¹INIA Las Brujas, Programa Producción Hortícola. Ruta 48 km 10. Rincón del Colorado. Canelones. Uruguay. dmaeso@inia.org.uy

²Unidad de Fitopatología. Facultad de Agronomía.

Palabras clave: peste negra, *Tomato spotted wilt virus*, morrón.

Introducción

La “peste negra” es una enfermedad causada por virus del género *Tospovirus* de gran importancia económica en nuestro país para los cultivos de tomate, morrón y lechuga entre otros. Es transmitida por varias especies de trips en forma persistente y posee la capacidad de infectar a un amplio rango de huéspedes ya sean cultivos o malezas. Todo eso hace que sea una enfermedad muy difícil de manejar ya que su capacidad de diseminación y reinfección en los cultivos es muy alta. Una medida muy eficaz es el cultivo de variedades resistentes cuando éstas están disponibles. En tomate la resistencia varietal (a través del gen *sw5*) funciona muy bien por el momento en Uruguay, sin embargo en morrón no ocurre lo mismo. Algunos de los cultivares comerciales de morrón cuentan con un gen de resistencia (*Tsw*) originario de *Capsicum chinense* el cual tiene algunas limitaciones en su funcionamiento. *Tsw* funciona a través de una reacción de hipersensibilidad matando tejido en el punto de ingreso del virus buscando así enlentecer el movimiento de éste dentro de la planta pero no impidiendo su multiplicación. Se ha reportado que esta fuente de resistencia solamente es efectiva contra algunos de los virus pertenecientes al género *Tospovirus* (TSWV) y no frente a otros que también existen en nuestro país (GRSV). Además se conoce que su expresión no es muy buena a temperaturas altas (superiores a 28°C) y en las etapas juveniles del cultivo. Estos factores han contribuido a que en morrón se registren grandes pérdidas por esta enfermedad aún cuando los productores empleen variedades “resistentes”.

Con el objetivo de determinar puntos críticos a considerar en el manejo de esta enfermedad en morrón en invernadero se iniciaron por parte de INIA una serie de experimentos en invernáculo en las zonas sur y norte del país. En este trabajo se presentan los avances de los experimentos de la zona sur correspondientes al ciclo 2013-2014.

Materiales y métodos

Localización: Invernaderos del Sr. Omar Fernández, Camino Paso del Medio, Canelón Chico, Canelones.

Tratamientos:

Se evaluó el efecto sobre la evolución de la enfermedad de las siguientes medidas:

- 1) Cubierta de malla anti-insecto en almácigo.
- 2) Malla anti-insecto en las paredes del invernáculo.

- 3) Cultivares con resistencia a peste negra (gen *Tsw*): Troyano F1 (Sakata Seeds, Beltrame y Cia.) y Yatasto RZ (Rijk Zwaan, Agritec); y sin resistencia: Margarita (Syngenta).

Se seleccionaron dos invernaderos uno con malla y otro sin malla perimetral anti-insectos (50 mesh). En cada uno de ellos se seleccionaron cinco sitios (cuatro esquinas y centro), en los que se plantaron grupos de cinco plantas de cada cultivar cuyos almácigos habían sido realizados con y sin cobertura anti-insectos. El resto de los invernaderos fue plantado con el cultivar usualmente utilizado por el establecimiento (Troyano).

Período de evaluación: Experimentos correspondientes a la temporada 2013-2014. Tanto el cultivo como las plantas del experimento fueron trasplantados el 14/10/2013.

Evaluaciones realizadas:

- 1) **Número de trips en trampas amarillas pegajosas:** Para ello se colocaron semanalmente durante todo el período experimental (el muestreo no se interrumpió desde la temporada 2011) trampas amarillas pegajosas (20 x 20 cm) en los cuatro puntos cardinales dentro y fuera de cada invernadero. Los trips fueron evaluados en laboratorio bajo lupa estereoscópica y clasificados en primera instancia como: "amarillos" (probablemente *Frankliniella* spp.), "marrones" (probablemente *Thrips tabaci*) y "otros". Los datos fueron corregidos en número de trips/día dividiendo la cantidad registrada entre el número de días que la trampa estuvo expuesta.
- 2) **Número de trips en flores de morrón y malezas:** Se extrajeron trips de diez flores de morrón (a partir de floración) y de las principales malezas presentes en colectas periódicas. Las flores se colocaron en heladera por unas horas y bajo lupa se extrajeron los trips existentes. Éstos se evaluaron de igual forma en laboratorio y conservados en alcohol etílico 70° para su posterior identificación.
- 3) **Porcentaje de plantas de morrón infectadas por *Tospovirus*:** Se realizó el análisis semanal de hojas de la parte apical mediante la prueba serológica DAS ELISA desde el 20/10/2013 utilizando reactivos de la compañía AGDIA Inc. (Elkhart, IN 46514, EEUU) durante todo el ciclo de cultivo. Las muestras fueron analizadas inicialmente en grupos de cinco plantas y posteriormente en forma individual en caso de detectarse infección en el grupo. Los resultados fueron expresados en porcentaje acumulado de plantas con infección.
- 4) **Porcentaje de plantas de morrón con síntomas de peste negra.** La aparición de síntomas fue registrada semanalmente en todas las plantas del experimento durante todo el ciclo del cultivo y los resultados expresados como porcentaje acumulado de plantas con síntomas de peste negra. También se evaluó la evolución de síntomas en el cultivo del productor.
- 5) **Infección de malezas por *Tospovirus*:** Se analizaron por la prueba serológica DAS ELISA plantas de malezas que presentaban síntomas atribuibles a virosis dentro y fuera de ambos invernáculos.
- 6) **Temperatura interna en invernadero con malla:** La temperatura al interior del invernadero con malla fue registrada durante todo el ciclo de evaluación con un

registrador Hygrochron I Button DS 1923 (Dallas Semiconductor Corp., Dallas Texas, EEUU).

Diseño experimental: Los datos fueron analizados estadísticamente de acuerdo a un diseño de parcelas divididas-divididas en el cual los factores eran parcela principal malla/no malla en cultivo, subparcela malla/no malla en almácigo y sub-subparcela variedad con cinco repeticiones (grupos de plantas).

Resultados y discusión

1) Número de trips en trampas amarillas pegajosas:

1.1) Número de trips en exterior/interior

En la figura 1 se muestra la evolución del número de trips totales/día en el exterior de los invernáculos durante la temporada 2013-2014, los datos son el promedio de las trampas colocadas en las cuatro paredes externas. Si bien la evolución de las capturas siguió un mismo patrón, el número de insectos capturados en las trampas afuera del invernáculo con malla durante el período setiembre 2013-mayo 2014 probablemente ocasionado por diferencias en la ubicación de los invernaderos y la vegetación espontánea en las inmediaciones.

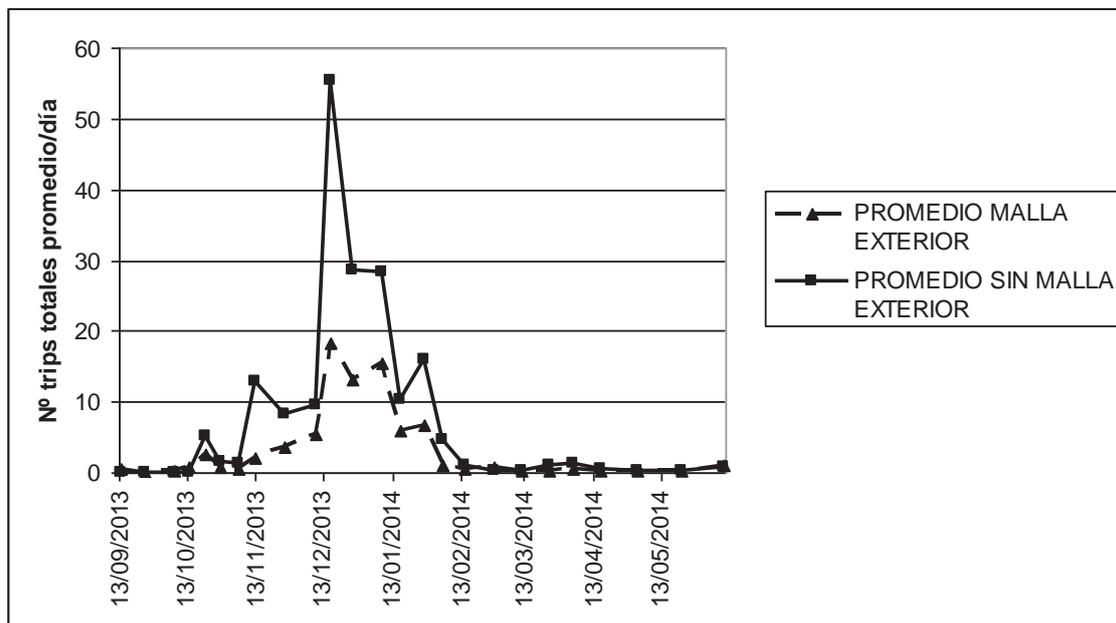


Figura 1. Número de trips totales por día en el exterior de los invernáculos (promedio malla exterior = promedio de trips capturados en las trampas colocada en el exterior del invernáculo con malla, promedio sin malla exterior = promedio de trips capturados en las trampas colocadas en el exterior del invernáculo sin malla).

En la figura 2 se muestra la evolución del número de trips totales/día en el interior de los invernáculos durante la temporada 2013-2014. Los datos son el promedio de cuatro trampas colocadas en los cuatro puntos cardinales en el interior de cada invernáculo. Se observan importantes diferencias en el número de individuos colectados siendo sensiblemente menor

en el interior del invernáculo con malla seguramente debido a la barrera física impuesta por ésta.

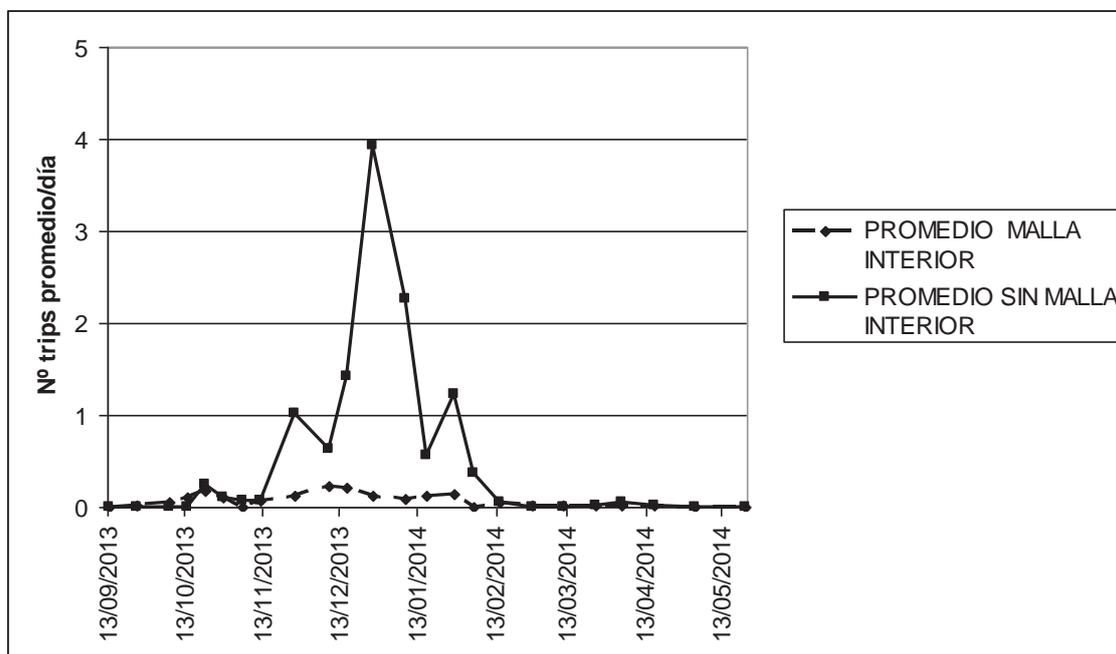


Figura 2. Número de trips totales por día en el interior de los invernáculos (promedio malla interior = promedio de trips capturados en la trampa colocada en el interior del invernáculo con malla, promedio sin malla interior = promedio de trips capturados en la trampa colocada en el interior del invernáculo sin malla).

En ambas figuras al igual que en temporadas anteriores se separan dos períodos, uno con capturas altas (noviembre-febrero) y otro con capturas bajas (a partir de marzo). Analizando el período de capturas altas (noviembre-febrero) se observa que éste comenzó primero en el exterior de los invernáculos lo cual sugiere una migración de los insectos hacia el interior de los invernáculos.

En la figura 3 se grafican las capturas combinadas de ambos invernáculos fuera y dentro para el período con menor captura. Si bien se tratan de valores relativamente bajos en comparación con los registrados en el resto del ciclo (menos de 1 trips/día), son muy importantes en el ciclo de la peste negra pues, en caso de estar infectados, esos vectores se encargarán de transmitir la enfermedad hasta la plantación del cultivo siguiente. Vemos que el número de trips capturados en el exterior es mayor que en el interior de los invernáculos indicando la importancia del manejo de la vegetación exterior como fuente de inóculo para los vectores alrededor de los invernáculos también en este período.

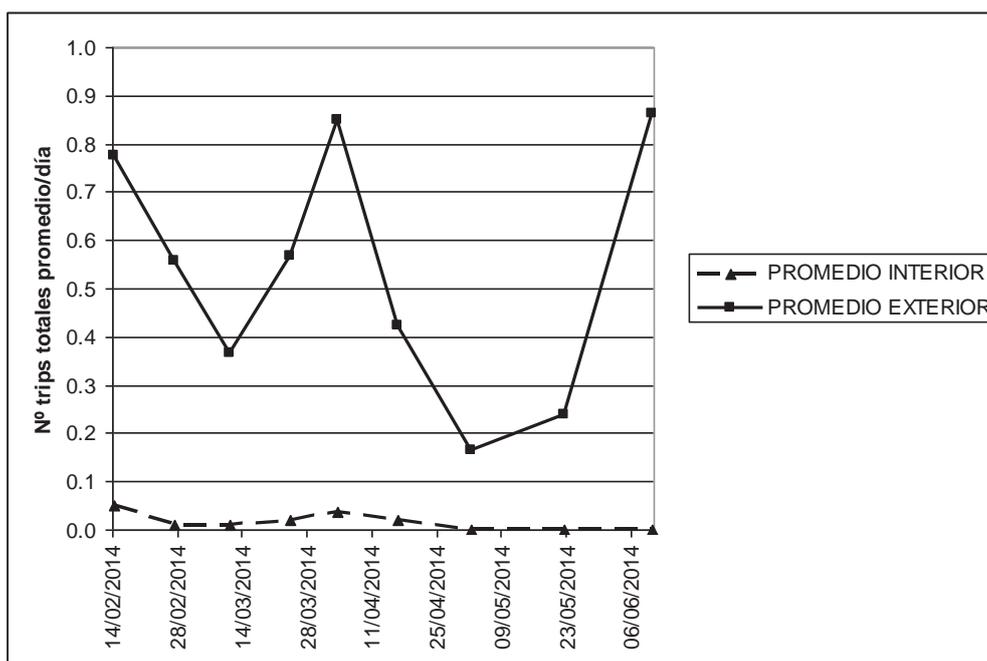


Figura 3. Evolución del número de trips/día capturados en el período febrero-junio 2014.

Como se puede observar, el número de trips en el interior de los invernaderos es inferior al encontrado en el exterior aún en el invernáculo sin malla. Esto seguramente se debe al control químico realizado sobre el cultivo, el cual, sin embargo, no fue suficiente para erradicar completamente al vector permitiendo potencialmente la transmisión de virus.

En cuanto a la diferencia en capturas entre los invernáculos con y sin malla perimetral durante todo el cultivo se registró un menor número de trips en el invernáculo con malla, esto se mantuvo durante todo el ciclo aún en el período de mayor población del vector. En las temporadas anteriores el número de trips había aumentado aún en el invernadero con malla, la diferencia encontrada en 2013-2014 puede ser atribuida al mejor manejo del aislamiento disminuyendo el ingreso accidental del vector.

1.2) Número de trips en el exterior según orientación de las trampas.

En la figura 4 se muestran las capturas de trips en el exterior del invernadero con malla según la orientación de las trampas. Como se puede apreciar, la captura de trips fue similar en todas las orientaciones.

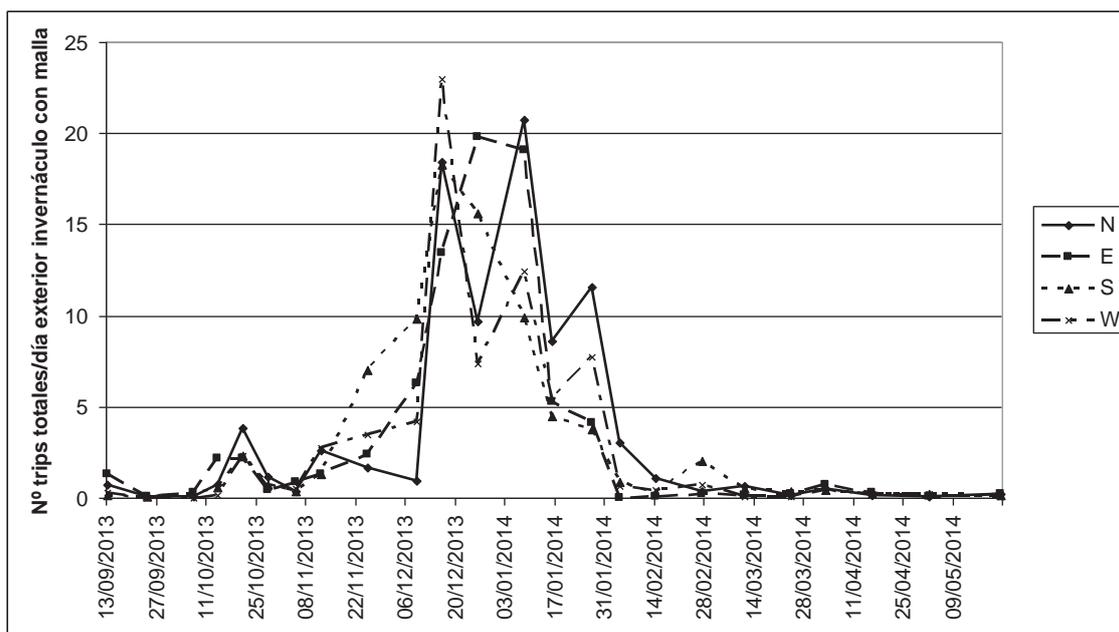


Figura 4. Número de trips totales por día en el exterior del invernáculo con malla según orientación de la trampa.

En la figura 5 se muestran los valores de trips capturados en el exterior del invernadero sin malla según la orientación de las trampas. También en este caso los valores son homogéneos.

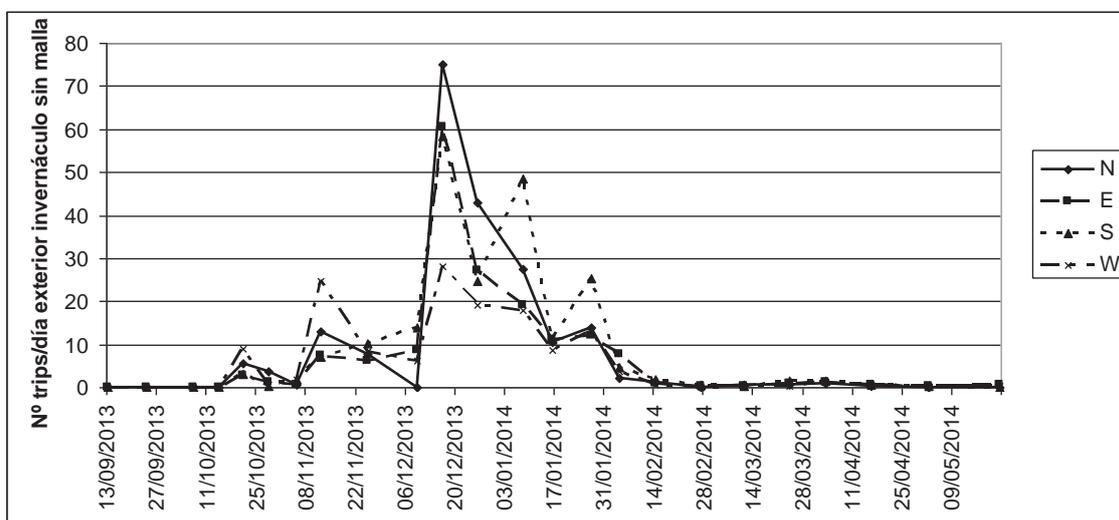


Figura 5. Número de trips totales por día en el exterior del invernáculo sin malla según orientación de la trampa.

En la figura 6 se muestra la localización relativa en el predio de los invernaderos estudiados en el periodo 2011-2014.



Figura 6. Ubicación relativa de los invernáculos bajo estudio en el establecimiento.

1.3) En el interior del invernáculo según orientación de las trampas.

En la figura 7 se muestra el número de trips/día capturados en el interior del invernadero con malla perimetral según la posición de las trampas en el cultivo. Como se observa la mayor captura se registró en las trampas colocadas en la parte sur y oeste (cercano a otros invernaderos).

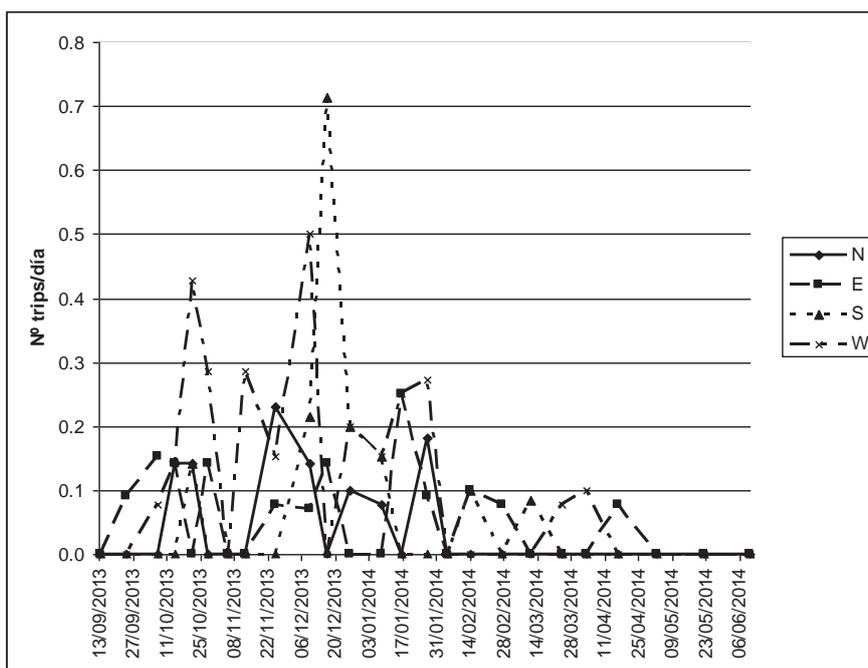


Figura 7. Número de trips totales por día en el interior del invernáculo con malla según ubicación de la trampa en el cultivo.

En la figura 8 se muestra el número de trips/día capturados en el interior del invernadero sin malla según la posición de las trampas en el cultivo. Como se observa, la mayor captura se registró en las trampas colocadas en las trampas orientadas al norte y sur (eje mayor del invernadero).

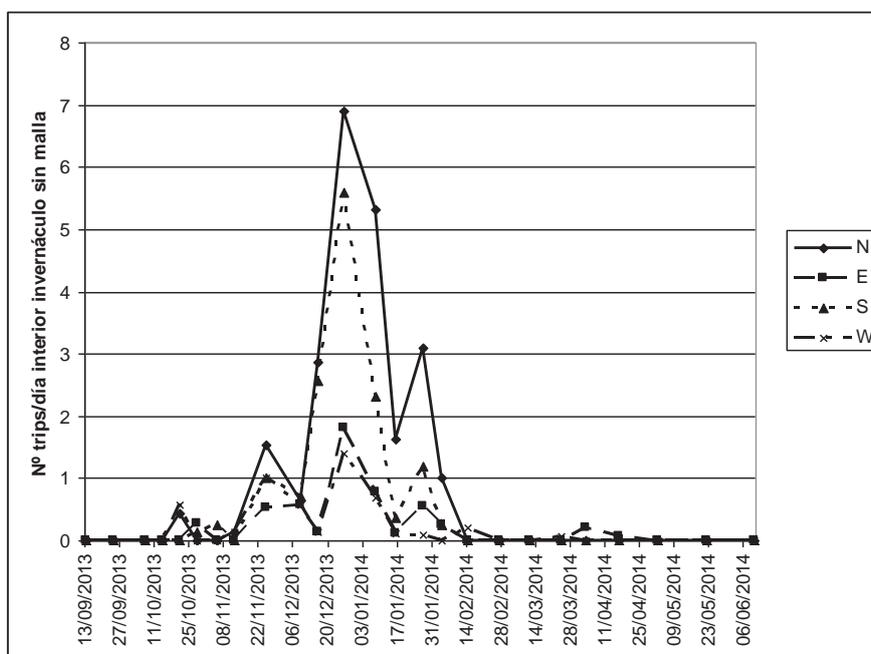


Figura 8. Número de trips totales por día en el interior del invernáculo sin malla según ubicación de la trampa en el cultivo.

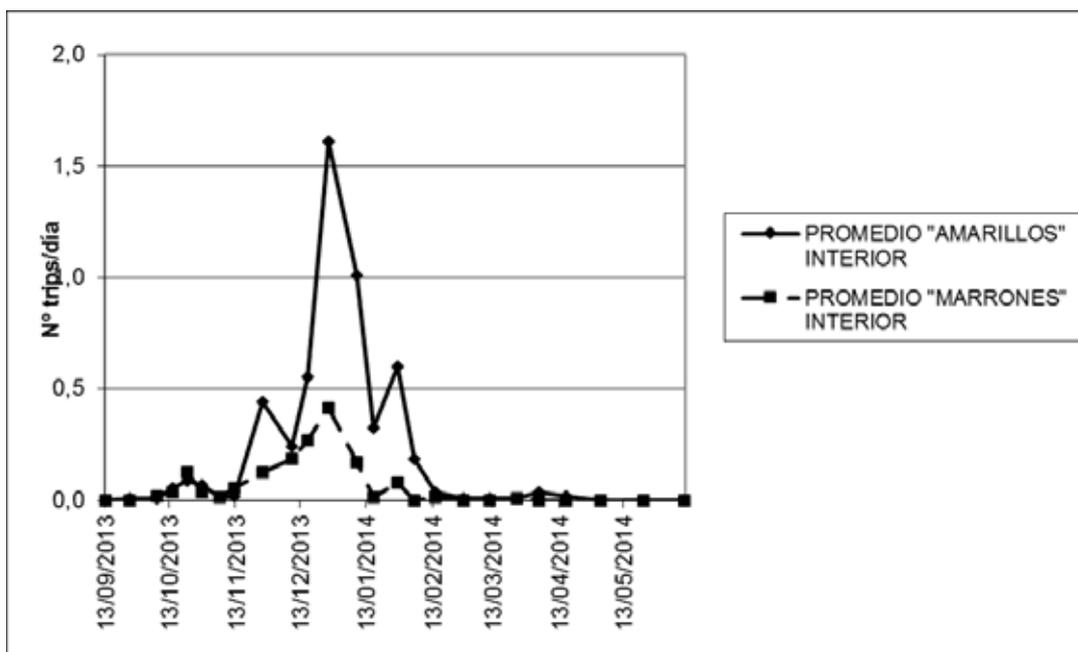


Figura 10. Número de trips/día capturados en el interior de los invernáculos según tipo de insecto.

1.5) Correlación entre datos de captura de trips.

Con los datos de los trips capturados en las diferentes trampas se realizaron cálculos de correlación para conocer si existía relación entre la **captura de insectos dentro y fuera de los invernaderos**.

Se encontró correlación estadísticamente altamente significativa entre los valores de trips/día capturados en el exterior y en el interior de ambos invernáculos:

- promedio ambos invernáculos ($R^2=0.62$, n° trips al interior = $0.04 \cdot n^\circ$ trips exterior + 0.05)
- malla ($R^2= 0.42$, n° trips al interior = $0.009 \cdot n^\circ$ trips exterior + 0.04) y
- sin malla ($R^2=0.53$, n° trips al interior = $0.05 \cdot n^\circ$ trips exterior + 0.09).

De acuerdo con este análisis dependiendo del caso entre 42-62% de la variación en los valores de captura de trips en el interior del invernadero sin malla está explicada por la variación en la captura obtenida en el exterior.

También se encontró correlación altamente significativa entre los valores de temperatura promedio (registrada en el interior del invernadero con malla) durante el período en que estuvieron expuestas las trampas y los valores de trips/día capturados, tanto en el exterior como el interior de los invernaderos en estudio.

- interior del invernadero sin malla ($R^2= 0.42$, n° trips capturados en interior de invernadero sin malla = $0.14 \cdot$ temperatura promedio período de trampeo – 2.47).
- exterior del invernadero sin malla ($R^2= 0.37$, n° trips capturados en exterior de invernadero sin malla = $1.86 \cdot$ temperatura promedio período de trampeo – 31.45).
- interior del invernadero con malla ($R^2= 0.32$, n° trips capturados en interior de invernadero sin malla = $0.01 \cdot$ temperatura promedio período de trampeo – 0.13).

- exterior del invernadero con malla ($R^2= 0.43$, n° trips capturados en exterior de invernadero con malla = $0.79 * \text{temperatura promedio período de trampeo} - 13.27$).

En la figura 11 se grafican los valores de captura de trips/día en el exterior e interior de los invernaderos y la temperatura promedio del período. Como se puede apreciar, al igual que en temporadas anteriores, la mayor captura se registró cuando la temperatura promedio del período al interior del invernáculo fue mayor o igual a 25°C (diciembre-febrero).

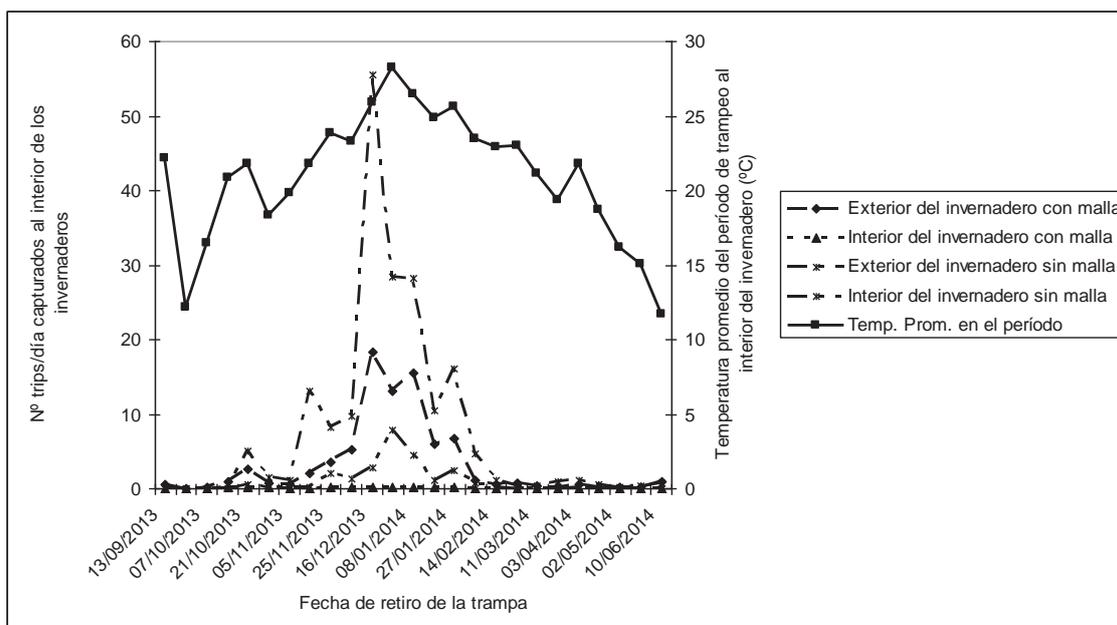


Figura 11. Evolución del número de trips/día en trampas amarillas en el interior de invernáculos con y sin malla y de la temperatura media en el período dentro del invernáculo con malla.

2) Número de trips en flores de morrón y malezas:

2.1) Número de trips en flores de morrón:

En la figura 12 se muestra el número de trips en flores de morrón (promedio de 10 flores) durante el período de estudio en comparación con lo observado en trampa pegajosa.

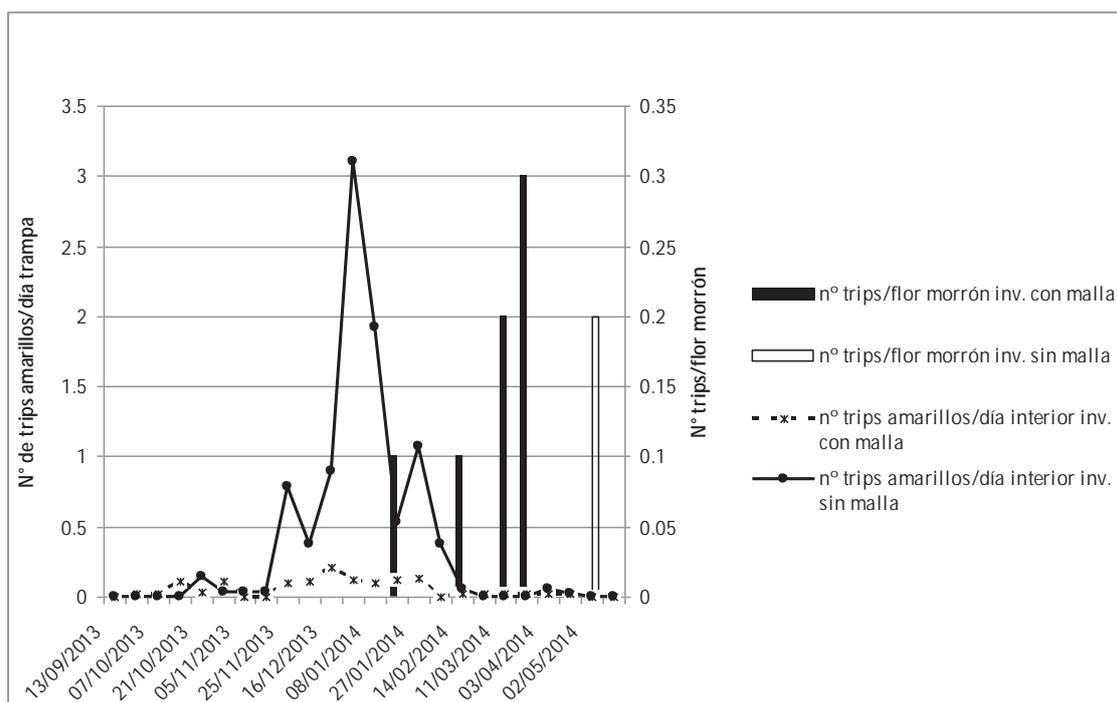


Figura 12. Número de trips totales/día en trampas pegajosas y en flores de morrón (promedio de 10 flores) en el interior de los invernáculos en estudio.

En esta temporada se registraron muy pocos trips en flores de morrón y principalmente en un período posterior a los picos poblacionales en trampas pegajosas.

2.2) Número de trips en flores de malezas:

En el cuadro 1 se muestran los valores de número de trips/flor colectados en flores de malezas en valores absolutos y en porcentaje.

Cuadro 1. Porcentaje del total de trips por flor colectados durante el período.

Maleza	Suma de n° trips/planta acumulados en la temporada	N° trips/10 flores promedio	% total acumulado durante el cultivo 2013-2014	% total trips/10 flores promedio
Trébol rojo	7.10	0.76	25	13
Correhuela	4.40	1.23	15	21
Cerraja	2.80	0.29	10	5
Revienta caballos	2.30	0.58	8	10
Verdolaga	0.20	0.07	1	1
<i>S. ptycanthum</i>	0.00	0.00	0	0
Gambarrusa	2.10	1.97	7	33
Trébol blanco	9.50	1.00	33	17

Al igual que en temporadas anteriores se colectó el mayor número de trips en flores de trébol blanco, trébol rojo, correhuela, cerraja, revienta caballos, gambarrusa, y verdolaga en ese

orden. La casi totalidad de los trips encontrados en flores de malezas se registró en el exterior de los invernaderos. Solamente se encontraron dos trips en 10 flores de cerraja en el interior del invernáculo sin malla 13/2/2014.

En la figura 13 se muestra la variación en la cantidad de trips por diez flores en las diferentes malezas fuera de los invernáculos. Al igual que en la captura en trampas, se registró un pico de individuos en el período diciembre-febrero, a pesar que algunas malezas presentaron trips luego de ese período (trébol rojo, blanco y cerraja).

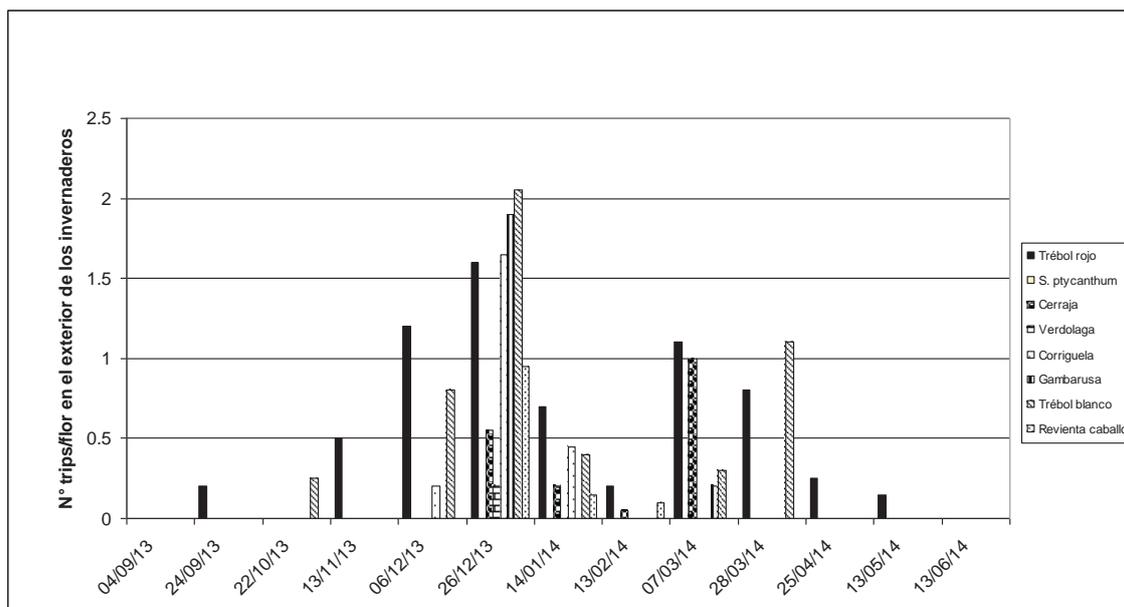


Figura 13. Evolución del número de trips por flor en malezas en el exterior de los invernaderos en estudio.

3) Porcentaje de plantas de morrón infectadas por *Tospovirus*:

En la figura 14 se puede observar la evolución del porcentaje del total de plantas infectadas por *Tospovirus* en el invernadero sin malla, que fue en el único que se detectaron infecciones, y del número de trips/día en trampas amarillas. En esta temporada el porcentaje de plantas infectadas fue muy bajo (inferior al 2%). Como se puede ver el incremento de plantas infectadas se registró luego de la ocurrencia de picos en la captura de trips.

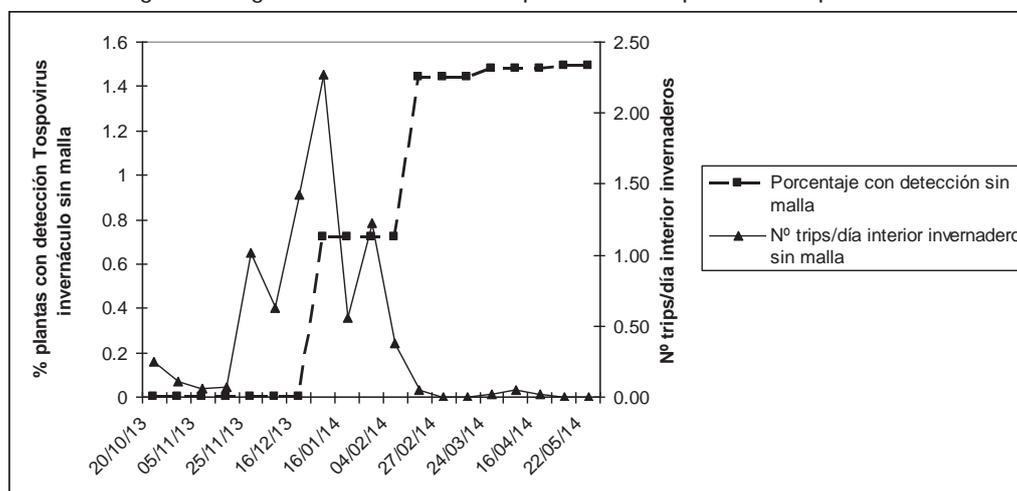


Figura 14. Porcentaje de plantas infectadas con *Tospovirus* en el invernáculo sin malla anti-insectos relacionado con la captura de trips/día en trampas amarillas.

En la figura 15 se muestra la evolución del porcentaje de plantas infectadas por *Tospovirus* discriminado según si el almácigo se realizó con o sin cobertura de malla anti-insecto. Se puede observar que la infección se determinó primero en plantas provenientes de almácigos sin cobertura de malla anti-insecto. Si se considera que solamente en el invernáculo sin malla perimetral se determinaron plantas infectadas se puede suponer que éstas inicialmente vinieron del almácigo sin protección y se registró una infección secundaria en el invernáculo sin malla.

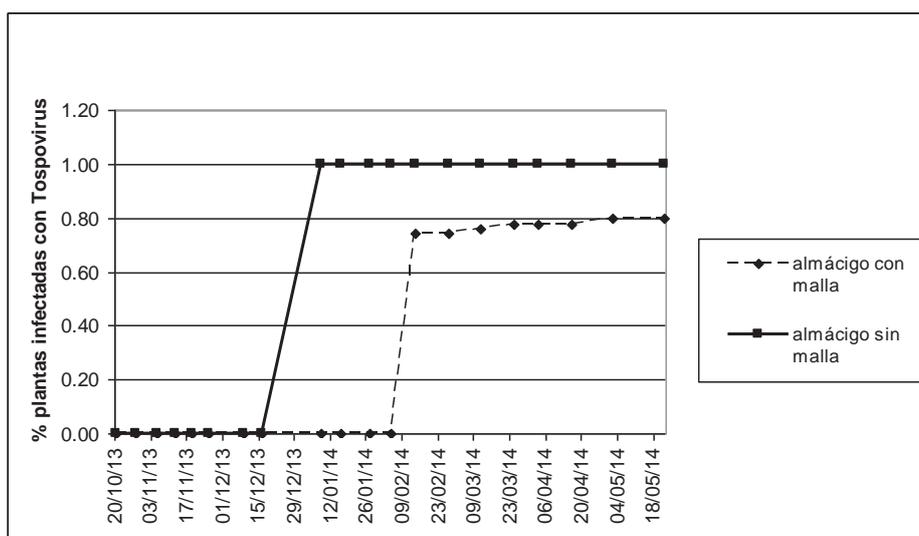


Figura 15. Porcentaje de plantas infectadas con *Tospovirus* según si su almácigo fue realizado o no bajo malla anti-insectos.

Dado el bajo número de plantas en las que se detectó la infección de virus no se pueden realizar observaciones en cuanto a si hubo una infección diferencial entre las variedades evaluadas esta temporada.

3) Porcentaje de plantas de morrón con síntomas de peste negra.

En la figura 16 se muestra la evolución del porcentaje total de plantas con síntomas junto al porcentaje de plantas infectadas (determinadas por prueba ELISA) y al número de trips/día en el interior de los invernaderos.

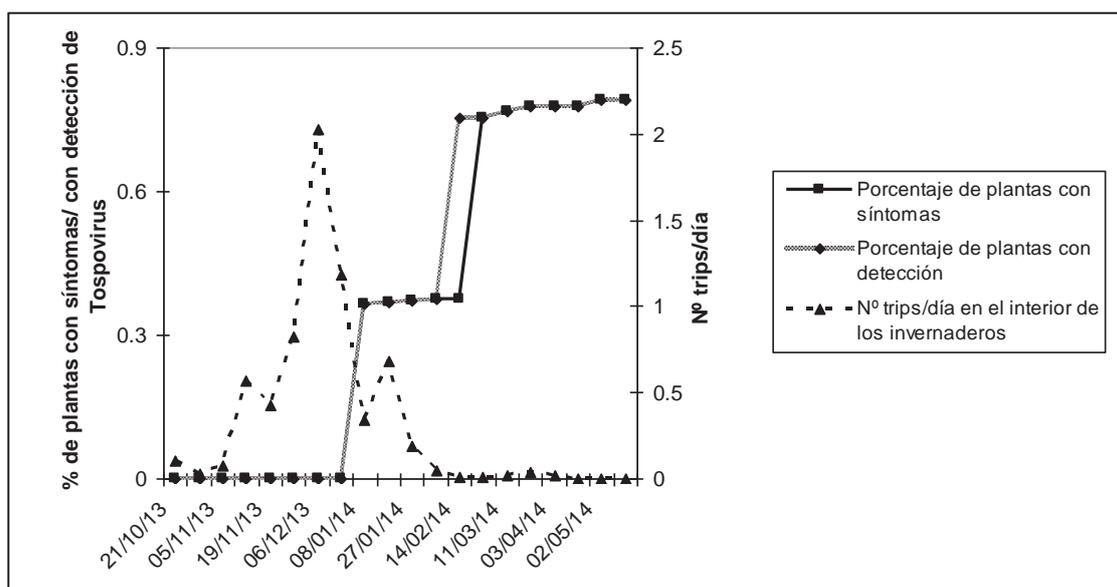


Figura 16. Evolución del porcentaje total de plantas con síntomas comparado con la evolución del porcentaje de plantas infectadas y del número de trips/día en el interior de los invernaderos.

Durante la temporada 2013-2014 no se registraron síntomas en las plantas del productor que rodeaban al experimento en ninguno de los invernaderos.

4) Infección de malezas por *Tospovirus*:

Durante el período 21/10/13 - 10/6/14 se analizaron mediante DAS-ELISA 270 plantas de malezas colectadas adentro y fuera de ambos invernaderos. En un principio se buscaron seleccionar aquellas con síntomas atribuibles a la infección con virus (mosaico, clorosis, variegado, deformación foliar, lesiones necróticas, etc.) pero ante su escasez también se colectaron plantas asintomáticas (80% de la colecta).

De ellas en solamente tres plantas de malezas asintomáticas se detectaron *Tospovirus* (1%). La detección se dio en cerraña (con malla afuera 28/10/13) y corrihuela (con malla interior 25/11/13, con malla afuera 16/12/13).

Cabe destacar que la detección de *Tospovirus* en malezas se registró previamente a la detección en el cultivo y en lugares diferentes. En el cultivo se registró dentro del invernáculo sin malla y en malezas fuera de los invernáculos y dentro del invernáculo con malla. Este aspecto resalta también la importancia epidemiológica de las malezas tanto como fuente de inóculo de virus como de trips además de las plantas de cultivo infectadas.

Comentarios finales de las tres temporadas estudiadas

- Las tres temporadas estudiadas presentaron características muy diferentes en cuanto a la enfermedad.
- La temporada 2011-2012 se caracterizó por:

- Una infección muy temprana ya en el cultivo del productor previo a la instalación del ensayo la cual aumentó rápidamente llegando a afectar a la totalidad de las plantas del invernadero tanto del experimento como del productor.
 - Un alto número de trips tanto en trampas como en flores de morrón y de malezas.
 - Evolución rápida de la infección por *Tospovirus* en el cultivo alcanzando a la totalidad de las plantas que se tradujo en la presencia de fuertes síntomas de peste negra.
 - Presencia de malezas infectadas por *Tospovirus* que además albergaban en sus flores al vector durante y luego del cultivo.
- Las temporadas 2012-2013 y 2013-2014 en cambio se caracterizaron por:
 - Bajo número de plantas de morrón enfermas.
 - Infección derivada de plantas producidas en almácigos sin cobertura anti-insectos.
 - En 2013-2014 la enfermedad se registró únicamente en el invernáculo sin malla.
 - Bajo número de trips en trampa y en flores de morrón y malezas.
 - Bajo porcentaje de plantas de morrón infectadas por *Tospovirus* que no aumentó durante el ciclo.
 - Poca presencia de malezas en general entre las cuales fue difícil encontrar plantas con síntomas atribuibles a la infección viral y a su vez con detección de *Tospovirus* sumado a que éstas presentaban pocos trips en sus flores.
- Como conclusión final luego de tres años de trabajo se resaltan los siguientes puntos críticos a considerar en el manejo de peste negra en morrón en invernáculo:
 - Evitar infección de plantas durante el almácigo. Para ello es recomendable realizar los mismos bajo cobertura anti-insectos.
 - Evitar la existencia dentro y fuera del invernadero de aquellas malezas en cuyas flores habite el vector y/o que sean huéspedes de la enfermedad fundamentalmente antes y en las primeras semanas después del trasplante. Promover vegetación entre los invernaderos que no tenga esas características y que a la vez impida su desarrollo, por ejemplo gramíneas. En este trabajo se detectaron algunas malezas dentro de las principales que ocurrían en este establecimiento a las que se deberá prestar más atención.
 - Utilizar malla perimetral anti-insecto en el invernadero pero cuidando mucho el ingreso de insectos desde el exterior a través de la puerta de ingreso, ventilación cenital, etc.
 - La resistencia varietal suministrada por el gen *tsw* por sí sola no garantiza un buen control de la enfermedad por lo que deberá ser necesariamente complementada con otras medidas.

EVALUACIÓN DE PRODUCTOS APLICADOS AL FOLLAJE PARA EL CONTROL DE MANCHA BACTERIANA DEL TOMATE. TEMPORADA 2013-2014.

Diego Maeso¹ y Alfredo Fernández¹.

¹ INIA Las Brujas. Ruta 48 Km 10 Rincón del Colorado. Canelones. Uruguay.
dmaeso@inia.org.uy

Palabras clave: mancha bacteriana, *Xanthomonas* spp., control.

Introducción

La mancha bacteriana del tomate causada por *Xanthomonas* spp. es una de las enfermedades más importantes del cultivo a campo provocando pérdida de área foliar, muerte de flores, manchado de fruto y, cuando el ataque es muy severo, la muerte de la planta. Para su control normalmente se realizan múltiples aplicaciones de productos a base de cobre, muchas veces en forma semanal, solos o en mezcla con otros fungicidas o antibióticos. Recientemente se han desarrollado productos que por diferentes modos de acción, generalmente mediante inducción de mecanismos de resistencia de la planta, se los recomienda para el control de enfermedades bacterianas, entre ellas la mancha bacteriana del tomate. Estos productos fueron evaluados en las temporadas pasadas, algunos de ellos con buen desempeño siendo éste el último año de una serie de experimentos para ese fin.

Metodología

Localización: Campo experimental, INIA Las Brujas.

Fechas de almácigo: 22/10/13

Fecha de trasplante: 22/11/13

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

Diseño experimental: Bloques al azar con tres repeticiones.

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

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

Varietal: Loica.

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

Tratamientos: Aplicaciones semanales a partir del 23/12/2013 de:

Nombre Comercial	Principio Activo	Dosis/100 l	Modo de acción
1. Bion 500 WG	Acibenzolar S methyl	5 g	Inductor de resistencia
2. Biorend Cobre	Quitosano y Sulfato de Cobre Penta hidratado más una base quelatante orgánica	250 cc	Inductor de resistencia
3. Biorend	Quitosano	500 cc	Inductor de resistencia
4. Fanavid 85	Oxicloruro de cobre	300 g	Bactericida
5. Afital Cobre	Anhídrido fosfórico (P ₂ O ₅): 25 % Cobre (Cu): 5%	250 cc	Inductor de resistencia
6. Sporekill	Cloruro de didecil dimetil amonio	100 cc	Desinfectante de contacto
7. Cobre estable	Complejo activo cupro amoniacal	500 cc	Fungicida, bactericida, bioestimulante
8. Testigo sin tratar.			

El control de enfermedades a hongos se realizó siguiendo el sistema de pronóstico Tomcast utilizando únicamente clorotalonil. El control de insectos, ácaros, etc. fue el mismo para todos los tratamientos y se realizó en forma independiente a los tratamientos.

Evaluaciones:

De daños a follaje: Se realizaron diez evaluaciones de daños a follaje por mancha bacteriana en 2014 a partir del 5/2 (fecha de comienzo de la enfermedad) usando una estimación visual del porcentaje de área foliar afectada por planta en 10 plantas del surco central de cada parcela.

De rendimientos: Se evaluó el peso, el número de frutos y el número de frutos afectados por enfermedades por parcela en seis cosechas (17 y 25/2, y 13/3/2014).

Resultados

Evaluaciones de daños al follaje:

Los primeros ataques de mancha bacteriana se observaron a comienzos de febrero.

En el cuadro 1 se muestran los resultados de algunas evaluaciones de daños al follaje por mancha bacteriana por planta.

En la figura 2 se muestra la evolución de los daños al follaje en porcentaje de área foliar afectada durante la temporada.

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

Tratamiento	24/2	6/3
1. Bion 500 WG	22 a	35 a
2. Biorend Cobre	37 ab	58 abc
3. Biorend	62 c	67 bc
4. Fanavid 85	29 ab	63 bc
5. Afital Cobre	38 ab	66 bc
6. Sporekill	25 a	41 ab
7. Cobre estable	33 ab	73 c
8. Testigo sin tratar	55 bc	71 c
Coef. de variación (%)	20	17

¹ Promedio del área foliar afectada por la enfermedad por planta (%). Valores corregidos por arcsen√% para efectuar análisis estadístico.

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

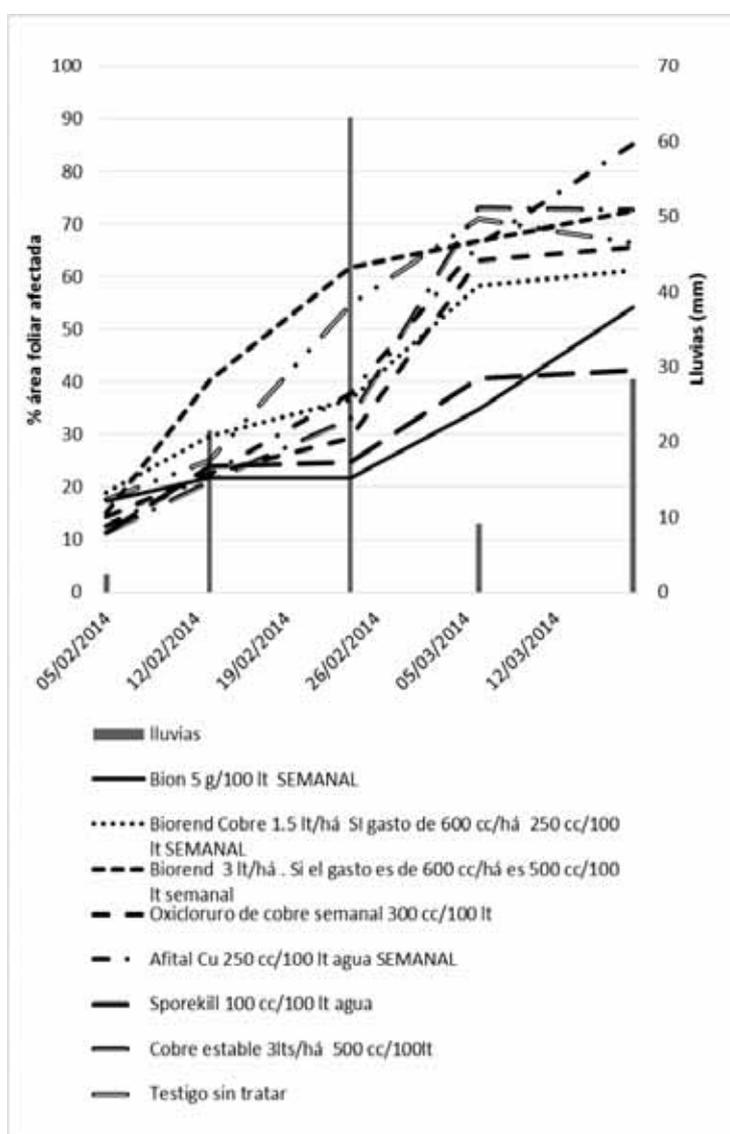


Figura 1. Evolución de la severidad de mancha bacteriana durante la temporada (porcentaje de área foliar afectada).

Rendimientos:

En el cuadro 2 se muestran la variación en los rendimientos frente al testigo sin tratar y el porcentaje de frutos adjudicados a mancha bacteriana.

Cuadro 2. Variación en rendimiento y porcentaje de frutos descartados por mancha bacteriana.

Tratamiento	% de variación frente al rendimiento en peso del testigo sin tratar (%)	Porcentaje de frutos descartados por mancha bacteriana
1. Bion 500 WG	-48	20 d
2. Biorend Cobre	9	8 abc
3. Biorend	-3	8 abc
4. Fanavid 85	21	4 a
5. Afital Cobre	31	8 abc
6. Sporekill	7	10 bc
7. Cobre estable	11	5 ab
8. Testigo sin tratar	0	14 cd
Coef. de variación (%)	---	20

¹ Las medias seguidas por la misma letra no difieren estadísticamente por la prueba Duncan al 1%.

Comentarios

- Los menores valores de área foliar afectada se observaron en los tratamientos a base de Bion, Biorend Cobre y Sporekill.
- El menor porcentaje acumulado de frutos afectados por mancha bacteriana se observó en los tratamientos a base de Biorend cobre, Biorend, Fanavid, Afital y Cobre estable.
- No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los rendimientos obtenidos hasta marzo 2014.
- Los tratamientos a base de Bion y Biorend presentaron disminución en porcentaje de los rendimientos frente al testigo sin tratar.

Conclusiones de tres temporadas:

- Si bien en la serie de ensayos de tres temporadas hubo algunas variaciones en los tratamientos utilizados podemos concluir que en general los tratamientos que recibieron aplicaciones foliares con Bion, hidróxido de cobre y Biorend cobre fueron los que presentaron menor área foliar afectada con mancha bacteriana.
- Los tratamientos en que se aplicó Bion provocaron disminución en los rendimientos frente al testigo sin tratar.

CONTROL DE LA MANCHA BACTERIANA DEL TOMATE (*XANTHOMONAS* SPP.) EN CULTIVO A CAMPO PARA INDUSTRIA MEDIANTE APLICACIONES FOLIARES. 2014-2015.

Diego Maeso¹, Alfredo Fernández¹, Wilma Walasek¹

¹INIA Las Brujas, Programa Nacional de Producción Hortícola, Sección Protección Vegetal. Ruta 48 km 10. Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay. dmaeso@inia.org.uy

Palabras clave: mancha bacteriana, tomate, *Xanthomonas* spp., control.

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).

Algunos autores han estudiado los efectos ad de este agente en 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 CO₂ (R&D sprayers, EEUU). Gasto por hectárea varió de 700 a 1500 l durante la temporada.

Cultivo: Tomate de industria, variedad Repique. Distancia de plantación 1,6 x 0,30 m. Fecha de trasplante 21/10/2014.

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	Quitósano y Sulfato de Cobre Penta hidratado + base quelatante orgánica	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			

Las aplicaciones preventivas comenzaron el 28/11/2014. Los tratamientos semanales recibieron nueve aplicaciones, y el tratamiento 5 adicionalmente seis de Sporekill luego de lluvias. La última aplicación de todos los tratamientos fue realizada el día 27/1/15.

Diseño experimental:

Bloques al azar con cuatro repeticiones. 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.



Figura 2. Detalle de una parcela.

Inoculación:

El experimento fue inoculado el 9/1/2015 mediante la aspersión foliar de una solución de *Xanthomonas* spp. (aislada de manchas foliares de tomate) con una concentración aproximada de 1×10^8 ufc/ml en horas de la tarde, recibiendo posteriormente dos horas de riego por aspersión.

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).

Parámetros evaluados:

Evolución de la enfermedad.

A la semana de la inoculación se evaluó semanalmente el porcentaje de área foliar afectada por la enfermedad (severidad) de cada una de ellas de las 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).

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).

Tratamiento	16/01	27/01	02/02	ADCPE
Nacillus 300 g/100 l	8 NS ²	56 b ¹	79 b	770 b
Baktillis 300 g/100 l	6	51 b	80 b	719 b
Hidrocup 300 g/100l	3	12 a	27 a	200 a
Sporan 1000 cc/100 l	4	47 b	66 b	625 b
Biorend Cu 150 cc/100 l complementado con Sporekill luego de lluvias	8	39 ab	78 b	619 b
Bion 5 g/100 l	6	40 ab	69 b	588 b
Testigo sin tratar	12	60 b	77 b	820 b

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

² NS = sin diferencias estadísticamente significativas en el análisis de variancia.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las evaluaciones del 27/1 y 2/2 y en el ADCPE. Los menores valores de severidad del 27/1 se encontraron en las parcelas tratadas con HidroCup, Biorend Cobre complementado con Sporekill y Bion, mientras que en la evaluación del 2/2 y en el ADCPE únicamente el tratamiento con HidroCup se diferenció del testigo sin tratar.

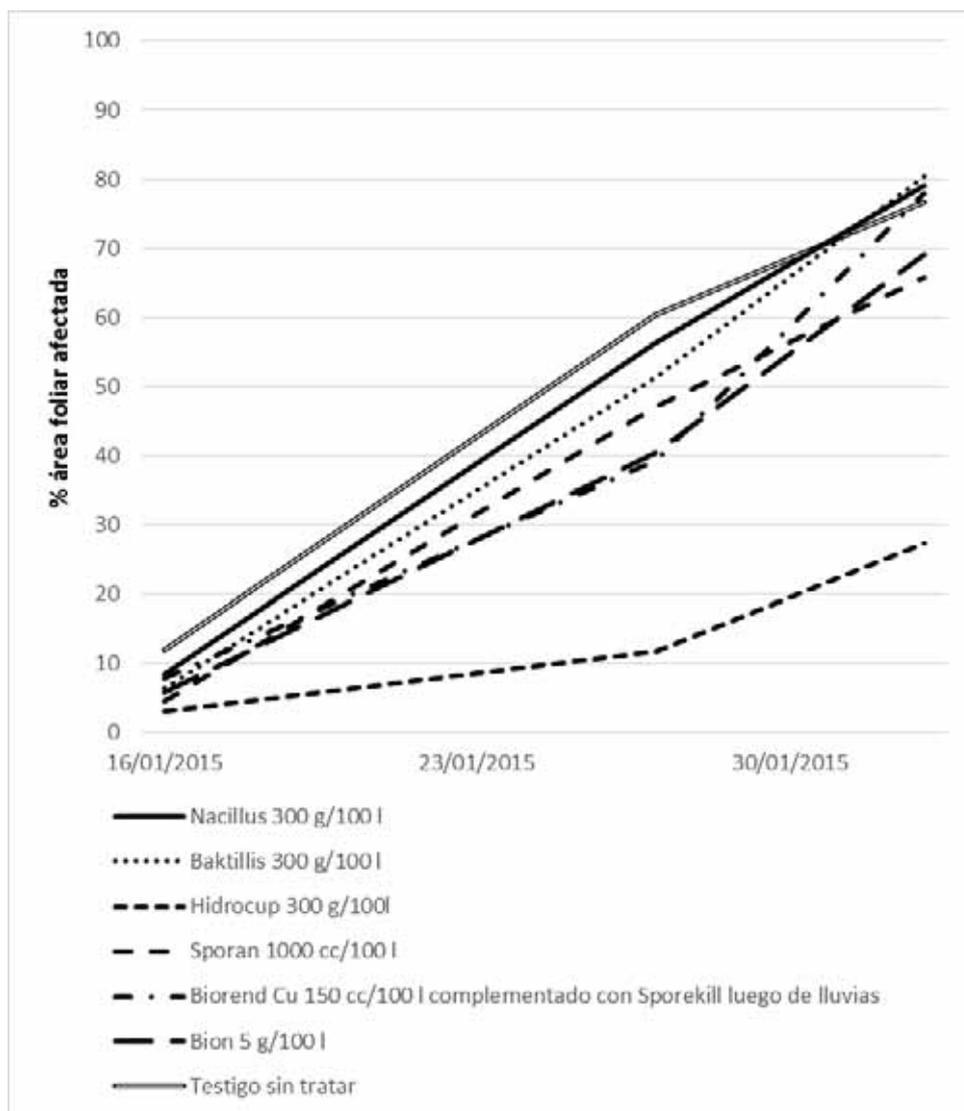


Figura 3. Evolución de la severidad (en porcentaje) de área foliar afectada con mancha bacteriana.



Figura 4. Síntomas de mancha bacteriana en hoja, flores y frutos durante el ensayo.



Figura 5. Síntomas en algunas parcelas al 2/2/2015. Arriba de izquierda a derecha: HidroCup, Baktillis, Testigo sin tratar. Debajo de izquierda a derecha: Biorend Cobre + Sporekill, Nacillus y Bion.

Discusión

Salvo el tratamiento con hidróxido de cobre ninguno de los tratamientos presentó un control aceptable de la enfermedad y por ello el cultivo debió ser abandonado tempranamente a comienzos de febrero. Probablemente esto se debió a la alta susceptibilidad del cultivar utilizado (Repique) y a la alta presión generada por la inoculación artificial realizada. Únicamente en el tratamiento con hidróxido de cobre se logró mantener área foliar verde y podría haber sido continuado.

Conclusiones

Bajo condiciones extremas muy favorables para el desarrollo de ataques de mancha bacteriana únicamente el tratamiento a base de hidróxido de cobre aplicado semanalmente mantuvo a la enfermedad en niveles que permitieron continuar con el cultivo. En el resto de las opciones la pérdida de área foliar fue casi total.

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.

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. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Phys.*