

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

TEMPORADA 2015-2016

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

Introducción

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

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

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

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

Objetivos

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

Materiales y Métodos

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



Figura 1. Vista panorámica del ensayo.

Forma de aplicación: Foliar mediante pulverizadora de mochila con CO₂ (R&D sprayers, EEUU). Gasto por hectárea varió de 600 a 1500 l/há durante la temporada.

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

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

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

Tratamientos:

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

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el ensayo.

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

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

Inoculación:

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



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

Parámetros evaluados:

Evolución de la enfermedad

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

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

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

Resultados

Incidencia

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

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

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

¹ dpi: días pos inoculación

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

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

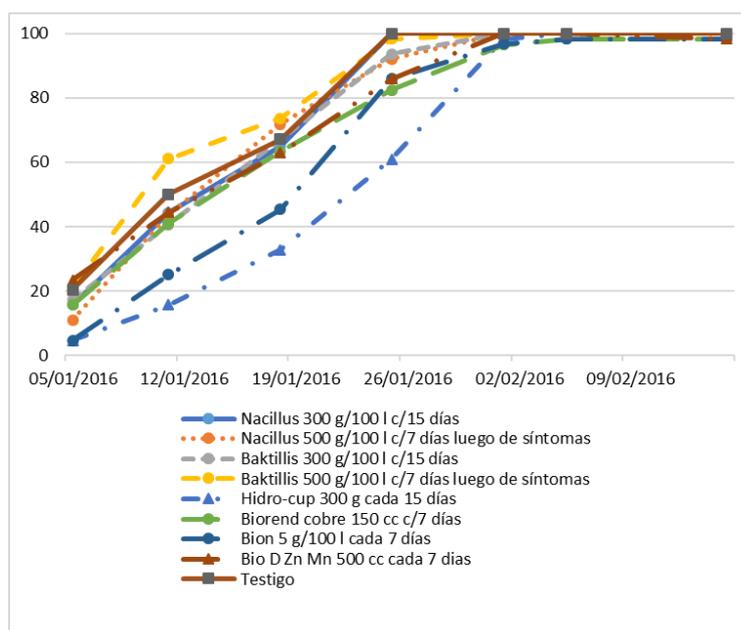


Figura 4. Evolución de la incidencia (porcentaje de plantas enfermas) de cancro bacteriano en los distintos tratamientos.

Severidad

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

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

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

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

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

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

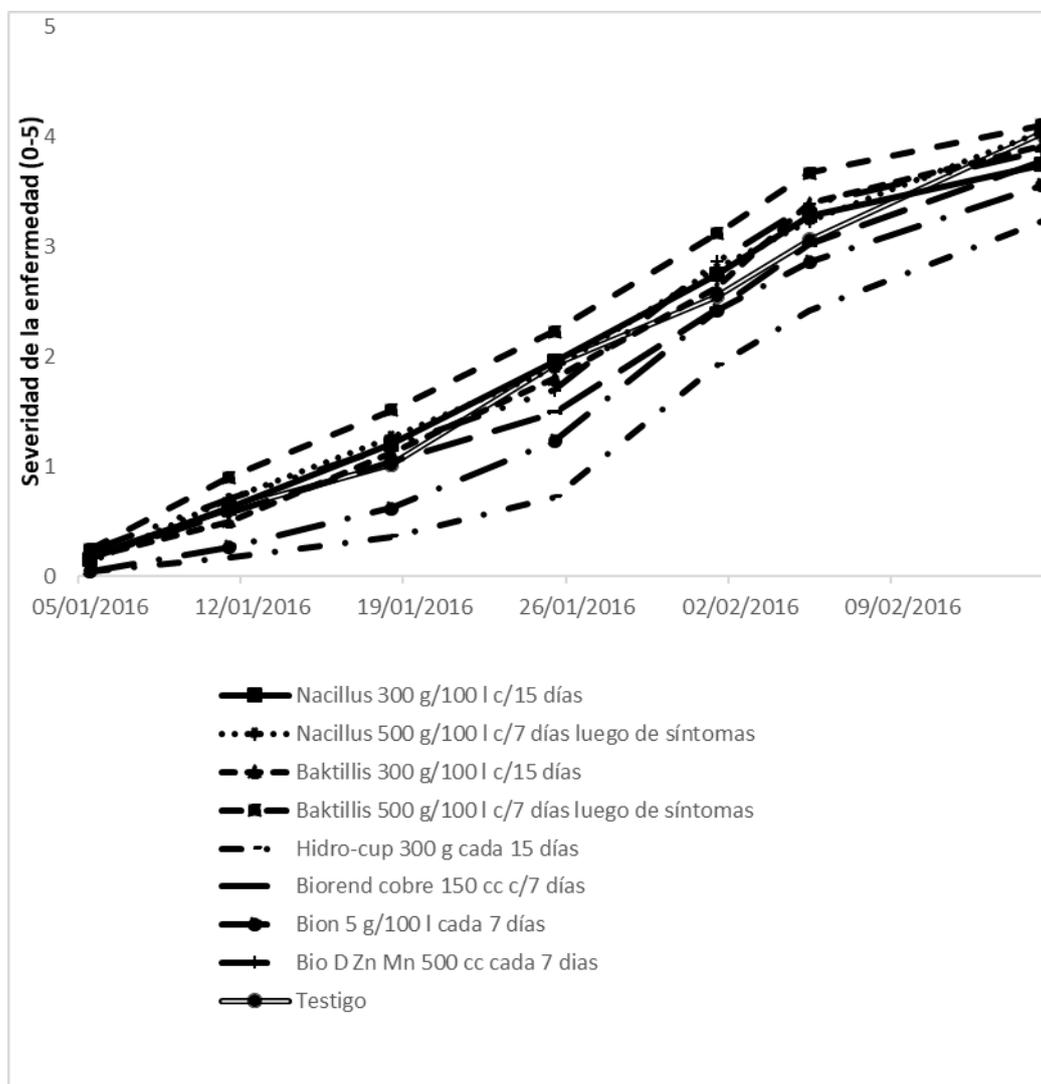




Figura 6. Síntomas en algunas parcelas al 1/2/2016. Arriba de izquierda a derecha: Testigo sin tratar, Hidro Cup, Bion. Debajo de izquierda a derecha: Bio D, Baktillis 300 g/100 l y 500 g/100 l.

Estado del sistema vascular

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

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

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

^{NS} no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

Discusión

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

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

Conclusiones

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

Bibliografía

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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