



*Universidad Nacional del Nordeste*

*FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS*

## **TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

Evaluación de un nuevo fungicida a base de *Bacillus subtilis* en el control de mancha negra de los cítricos.

**MODALIDAD:** Tesina

**ALUMNO:** Moreno Germán Nicolás

**ASESOR:** Ing. Agr. Víctor A. Rodríguez

2017

Índice	Páginas
<b>Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>4-8</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>9-10</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>11</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>11-17</b>
<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>18-19-20</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>21</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>22-23</b>

## I. RESUMEN

El crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cítricos depende de las propiedades físicas y químicas del suelo, como así también de un buen manejo frente a condiciones adversas como ser plagas, malezas y enfermedades, que puedan afectar su funcionamiento normal. Existe información dispar sobre resultados encontrados respecto al manejo y control de ciertas enfermedades que perjudican a los cultivos citrícolas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de un nuevo fungicida biológico a base de *Bacillus subtilis*, aplicado solo y en combinación con Trifloxistrobin y Oxicloruro de Cobre, en el control de mancha negra de los cítricos. Se trabajó en el establecimiento citrícola del Sr. Juan Karlem, ubicado en el departamento de Bella Vista, provincia de Corrientes, Argentina, sobre variedades de naranjo dulce (*Citrus sinensis*), injertadas sobre Lima Rangpur (*Citrus limonia*). Se utilizó el diseño experimental basado en bloques al azar, compuesto de 7 tratamientos con 4 repeticiones cada uno, comenzando las aplicaciones en forma secuencial en el mes de agosto del año 2015 hasta marzo del 2016. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el análisis de Varianza y Test de Duncan. De los resultados obtenidos se determinó que: todos los tratamientos superaron significativamente a los testigos, tanto en Incidencia como en Severidad, y el de mayor eficacia fue el tratamiento Nº 5 con aplicaciones de Trifloxistrobin (Flint) en noviembre y enero y Oxicloruro de cobre y *Bacillus subtilis* (Serenade ASO de Bayer) en los meses restantes.

## II. INTRODUCCIÓN

Los agrios tienen su origen en Asia oriental, concretamente en la zona que abarca desde la vertiente meridional del Himalaya hasta China meridional, Indochina, Tailandia, Malasia e Indonesia. Hoy en día, su cultivo se extiende por la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales comprendidas entre los paralelos 44°N y 41°S. A partir de su dispersión desde el centro de origen, los cítricos fueron llevados al norte de África y sudeste de Europa. Posteriormente fueron traídos a América por los europeos. Desde estas áreas comienzan a difundirse por todo el Caribe y el océano pacífico hacia México, Perú, Chile, Argentina, Brasil y Uruguay (20).

### 2.1 Situación citrícola mundial

Los cítricos se cultivan en más de un centenar de países de climas tropical y subtropical, en una superficie de unas 7,63 millones de hectáreas, y alcanzan una producción próxima a los 100 millones de toneladas (13).

China es el primer productor de frutas cítricas frescas con un estimado de 29,5 millones de toneladas; le sigue Brasil y Estados Unidos con una estimación de 17,7 millones de toneladas y 9,2 millones de toneladas, respectivamente en segundo y tercer lugar. Argentina ocuparía el octavo lugar detrás de México, España, Turquía e Italia. Entre los principales productos la naranja representa el 55% de la producción, seguido por la mandarina, con 28,3%, limón, con 13,2% y pomelo, con 13,5% (14).

Los países del hemisferio norte son los mayores productores y consumidores de cítricos, entre el 70% y 80% de la producción mundial; el resto proviene de los países del hemisferio sur principalmente Brasil, Argentina y Sudáfrica (12).

### 2.2 Situación citrícola en Argentina

La República Argentina es el octavo productor mundial de cítricos y primer productor mundial de limón. La producción total de cítricos en Argentina es de 2,8 millones de toneladas (7).

Las plantaciones abarcan 150.000 hectáreas, con una producción total de alrededor de 3.000.000 de toneladas anuales. La principal producción corresponde al limón (47%), seguido por la naranja (29%), la mandarina (16%) y el pomelo (8%) (7).

Argentina exporta frutas cítricas frescas, jugos y aceites esenciales desde 1970. Los citrus locales se exportan a más de 70 mercados, siendo las plazas más relevantes Rusia, España, Italia y Paraguay. Más de la mitad de los envíos externos son limones. Los cítricos dulces, en cambio, se destinan mayormente al mercado interno (7).

En consecuencia, la posición geográfica de Argentina le ha permitido convertirse en un proveedor de frutas cítricas frescas y confiables de diferentes regiones, ya que cuenta con un Sistema Nacional de Trazabilidad, SITC, que permite a la autoridad nacional fitosanitaria, al productor y al exportador, conocer los tratamientos que se le brinda a cada fruta desde la planta hasta el puerto de destino, lo que brinda al importador un alto grado de seguridad respecto al producto que recibe en cuanto a sanidad e inocuidad del mismo (7).

La producción citrícola se localiza en dos grandes regiones del país con condiciones aptas, que permiten producciones óptimas para el impulso de las economías locales: el noroeste argentino (NOA) que produce el 64%, y el noreste argentino (NEA) con el 36% de la producción nacional de cítricos (7).

Dentro del NOA Tucumán lidera la producción de limones (73,3% de la producción nacional), y Salta es la mayor productora de pomelo (35% de la producción) (7).

El NEA, en tanto, se especializa en la producción de naranjas con el 72,1% de la producción nacional, y mandarinas con un valor de 90,8% (7).

### **2.3 Producción citrícola de Corrientes**

La citricultura correntina se ubica en dos regiones: el noroeste o del Litoral del Paraná y el sudeste. La primera abarca los Departamentos de Bella Vista, Saladas, Concepción, Mburucuyá, General Paz, San Miguel, Ituzaingó, San Roque y Lavalle, los cuales poseen el 30,5% de la superficie de explotación. Mientras que la segunda región comprende el Departamento de Monte Caseros que representa el 63,2% del área cultivada. La superficie estimada para la citricultura correntina es de unas 28.000 hectáreas lográndose una producción de 600.000 toneladas por año, de las cuales el 58% corresponde a naranja y el 25% a mandarina. En lo que hace a la estructura del sector citrícola, Corrientes cuenta con 1.200 productores; 6 industrias de jugos concentrados; 3 empresas de empaque dedicadas al mercado externo y 43 que se dedican al mercado interno. Los mercados internacionales son cada vez más exigentes al momento de importar. Es por ello que debe haber un buen estado nutricional y sobre todo una buena sanidad en las frutas frescas, para que no exista ningún impedimento al momento de exportar (11).

### **2.4 Enfermedades citrícolas**

Los cítricos son plantas perennes y durante toda su vida útil se ven afectados por numerosas enfermedades que afectan a la producción y calidad de sus frutos como ser Cancrosis, Sarna, Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC), HUANGLONGBING (HLB), Melanosis, Gomosis, Antracnosis y la Mancha Negra de los Cítricos (MNC). Actualmente una enfermedad de gran importancia a nivel mundial es la Mancha Negra o Black Spot, la cual es ocasionada por el hongo *Guignardia citricarpa* Kiely. Es una enfermedad fúngica que afecta la calidad comercial de los frutos cítricos en el campo y durante el transporte. Provoca lesiones en la cáscara a nivel de flavedo, y en ataques severos puede ocasionar la caída prematura de frutos (6).

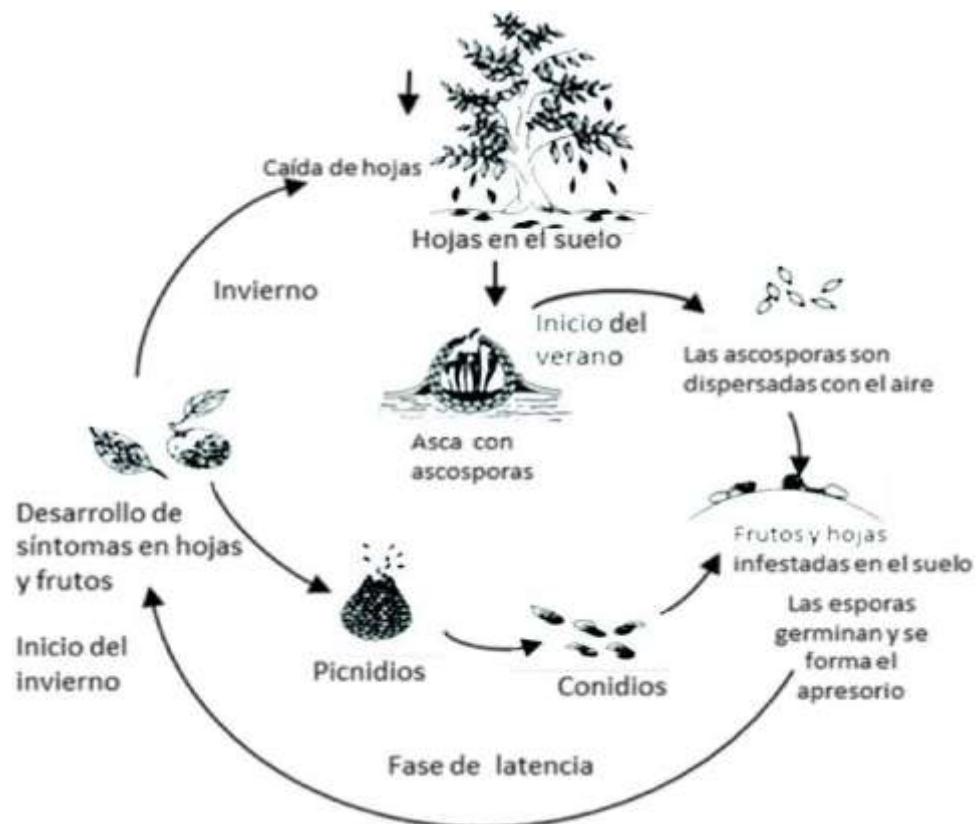
### **2.5 Mancha Negra de los cítricos**

La MNC fue descripta por primera vez en Australia en el año 1895 por Benson su descubridor, quien hizo público su hallazgo sin saber el agente causal. Recién en 1948 en New South Wales (Nueva Gales del Sur), Kiely descubrió el estado sexual o perfecto del hongo y lo denominó *Guignardia citricarpa* Kiely, cuyo estado asexual es *Phyllosticta citricarpa* (16).

En Argentina fue mencionada por primera vez en 1928 por Marchionato, apareciendo en Misiones (1968-1969), y luego en Corrientes (19).

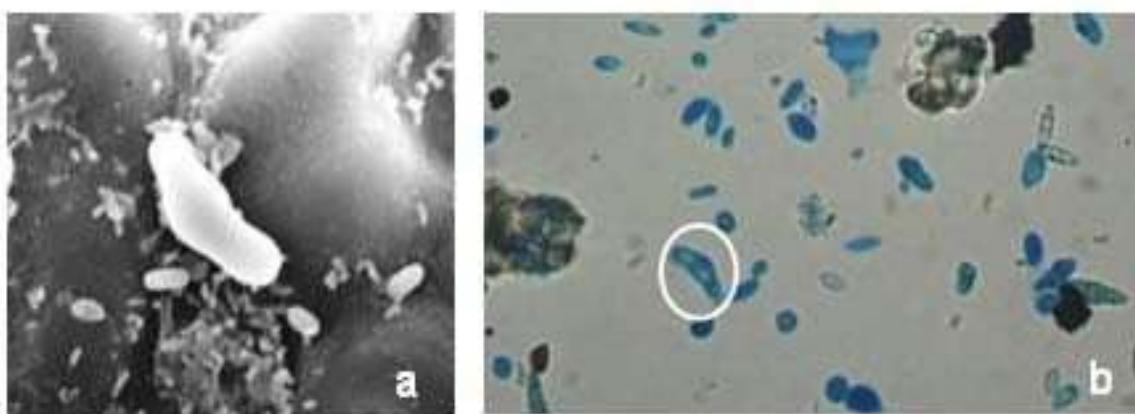
La Mancha Negra ataca a todas las variedades comerciales de cítricos, donde los limoneros son los más susceptibles, es así que cuando la enfermedad aparece por primera vez en una zona, generalmente lo hace en limón (16).

El patógeno presenta dos tipos de reproducción, uno de tipo sexual representado por los ascocarpos, en los que se forman las ascosporas de *G. citricarpa* y un estado asexual representado por las picnidios de *P. citricarpa* (16).



**Figura N° 1:** ciclo biológico de *Guignardia citricarpa* Kiely (9).

La principal fuente de inoculo es la hojarasca ubicada debajo de las plantas. Inmerso en el tejido de estas hojas se ubican los cuerpos fructíferos que llevan en su interior los ascos con ascosporas, que maduran bajo condiciones de alta humedad relativa y temperatura entre 25° y 30° C. Luego de una lluvia se inicia la fructificación sexual del hongo, originándose la liberación al ambiente de numerosas esporas, las que son diseminadas por el viento y depositadas en tejidos susceptibles como ramas jóvenes, hojas tiernas, brotes y frutos recién cuajados. Las ascosporas germinan sobre la superficie del hospedero y producen apresorios que le permiten al hongo penetrar a través de la cutícula y alojarse bajo la epidermis. La forma asexual del hongo puede formarse sobre ciertas lesiones en los tejidos vivos y en hojas muertas, desarrollando picnidios en cuyo interior, sobre conidióforos, se asientan los conidios. Estas estructuras que no sobreviven mucho tiempo, no son transportadas por el aire, sino por el agua, lo que significa que el transporte es a corta distancia. De esta manera son las ascosporas transportadas por aire a distancias mayores las verdaderas diseminadoras de la enfermedad (15).



**Figura 2: (a) Imagen de ascosporas obtenida a través de un microscopio electrónico de barrido. (b) Imagen obtenida de un disco de captura con un microscopio compuesto con la ascospora marcado. ([www.ejbiotechnology.cl](http://www.ejbiotechnology.cl))**

Los síntomas característicos son:

- **Mancha típica, mancha dura o “Hard spot”:** es el síntoma típico de esta enfermedad. Son lesiones circulares, normalmente de 2 a 5 mm de diámetro pudiendo llegar a 10 mm, tienen un margen, que puede ser sobre-elevado o no, de color castaño a negro que se diferencia claramente del centro de la lesión, el cual es de color grisáceo o castaño más claro y levemente deprimido. A menudo, se puede observar un halo rodeando a cada lesión de color amarillo, cuando el fruto está verde, y verde cuando el fruto colorea. Algunas lesiones muestran, sobre el centro de las mismas, puntuaciones negras que corresponden a las fructificaciones asexuales (picnidios de *Phyllosticta citricarpa*) (6).
- **Mancha pecosa o “freckle spot”:** aparece cuando el fruto ha cambiado su color. Son puntuaciones deprimidas, de color rojizo, que van aumentando su tamaño a medida que avanza la madurez del fruto e incluso pueden llegar a aparecer en las frutas ya cosechadas (6).
- **Mancha virulenta o “virulent spot”:** es observada en frutos maduros, sobre todo en plantaciones viejas, con ataques severos, o afectadas con virus. Son lesiones al principio circulares y luego irregulares, deprimidas, de color rojo ladrillo a castaño rojizo (6).
- **Falsa melanosis o “speckled blotch”:** lesiones circulares, pequeñas, de color castaño a negro, rodeadas de puntuaciones menores. Suelen presentar un halo verdoso. A menudo se distribuyen en forma agrupada del lado expuesto al sol. Se las observa desde frutos recién cuajados hasta frutos maduros. Son suaves al tacto y no se desprenden del tejido. No desarrolla picnidios (6).



**Figura Nº 3:** síntomas de mancha negra (fotografía tomada durante el ensayo).

La MNC ocasiona daños económicos a la producción citrícola al afectar la calidad externa de los frutos impidiendo su exportación. El mayor inconveniente es que se trata de una enfermedad cuarentenaria de rápida difusión; debiéndose realizar los controles adecuados en los momentos de mayor sensibilidad del huésped y cuando las condiciones ambientales sean desfavorables para su desarrollo (6).

### III. ANTECEDENTES

En Sudáfrica el Caldo Bordelés se uso en forma casi exclusiva en un programa de tres pulverizaciones a intervalos de 6 meses, hasta que Kotze demostró que el Oxido Cuproso y el Oxicloruro de Cobre daban mejores resultados en el control de la enfermedad (MNC) (16).

En 1968 Kellerman utilizó Benomil con muy buenos resultados, posteriormente se realizaron nuevas investigaciones para reducir el número de aplicaciones y dosis, hasta que en 1971 se logró reemplazar el programa convencional del tratamiento protector por una sola aplicación de Benomil más aceite. Esta mezcla no mata al hongo solo limita su actividad logrando en cierta medida el control de la enfermedad (15).

En el año 1983, BASF inició un proyecto de investigación para evaluar productos naturales orgánicos, como vías potenciales de nuevos pesticidas sistémicos. Se han aislado sustancias activas del hongo *Strobilurus tenacellus*, que crece sobre los estróbilos de ejemplares del género *Pinus sp.* denominadas Estrobilurinas, que ejercen un fuerte control sobre *G. citricarpa*, es así que hoy en día se siguen usando para el control del patógeno (2).

Canteros (2003); tomando como base las observaciones, estudios y ensayos realizados en la zona sobre MNC, recomienda en naranja pulverizar con Cobre más aceite en octubre, noviembre y diciembre, y con Benomil más aceite en la segunda quincena de Enero para prevenir la aparición de razas resistentes al Benomil (3).

El Pyraclostrobin ensayado por Fonseca (2003), en el departamento de San Roque Corrientes, se comportó favorablemente en el control de *G. citricarpa* aún en pequeñas dosis. Esta droga utilizada sola resulta efectiva en el control de la MNC, además cuando es aplicada en diciembre y combinada con otros principios activos como el Mancozeb y Carbendazin, se consiguieron los porcentajes mayores de fruta de grado cero, siendo suficiente una sola aplicación dentro del calendario para obtener resultados satisfactorios (10).

Un fungicida del grupo de las Estrobilurinas derivado de sustancias naturales (Metilo de Cresoxin), fue probado solo y en combinaciones con otros productos químicos por Abrahán en el colonia Pando, departamento de San Roque Corrientes (2004). Los tratamientos obtuvieron un alto porcentaje de control, entre 82,2 y 94,6 % contra el 69% arrojado por el testigo (1).

En General Paz Corrientes, Rodríguez et al. (2010), evaluaron la efectividad del Pyraclostrobin en comparación con otros fungicidas para el control de la mancha negra de los cítricos, en lotes comerciales de naranjo "Valencia late". Se probaron diferentes combinaciones de dosis, frecuencias y momentos de aplicación de Pyraclostrobin 25%, Mancozeb 80% y Benomyl 50%. La mayor eficiencia de control de MNC (95.5 % frutos grado 0), se obtuvo con 30 mL de Pyraclostrobin aplicado en tres momentos (octubre, noviembre y enero). Debido al riesgo de aparición de resistencia a las Estrobilurinas por tres aplicaciones por campaña, sería recomendable su uso en dos aplicaciones tardías (noviembre y enero), que permitieron obtener entre 75 y 88% de frutos sin síntomas (21).

Chabbal (año 2010), realizó su tesis final en la localidad de Bella Vista, en la cual se evaluó el comportamiento de un nuevo producto dentro de éste grupo químico Picoxystrobin, no obteniendo diferencias con las Estrobilurinas más utilizadas en la región (Pyraclostrobin y Trifloxystrobin); en naranja y limón a las dosis probadas (4).

Raúl Carcaño, en la localidad de Santa Rosa provincia de Corrientes (2011/2012), evaluó el comportamiento de diversas formulaciones de fungicidas a base de *Bacillus subtilis*, aplicados en diferentes dosis, solos y en combinación con Pyraclostrobin; obteniéndose resultados significativos en el control de la MNC (23).

Una nueva Estrobiurina perteneciente a la familia de las fenil-acetaminda, fue probada por Zamer, 2013, sobre Naranja valencia para el control de la MNC, realizando aplicaciones tardías noviembre-enero, y el resto de los meses con Cobre, con esta combinación logró controlar la enfermedad en un 60-68%. En este mismo ensayo fue evaluado el Pyraclostrobin combinado con Cobre y aplicado también en los mismos meses, obteniendo un mejor control que la droga mencionada anteriormente. De acuerdo a los datos estadísticos superó el 70% de control, lo cual se considera aceptable (24).

La historia de las Estrobiurinas tiene sus orígenes al observar la ocurrencia natural de un compuesto con acción fungicida en madera podrida por el hongo *Strobilurus tenacellus* (Basidiomicete). El hongo crece en los estróbilos de *Pinus silvestris*, su modo de acción bioquímica se basa en la inhibición de la respiración mitocondrial por el bloqueo del transporte de electrones, lo que determina que la célula no pueda obtener energía para sus procesos vitales, con lo cual el hongo detiene su crecimiento y muere. Estas fueron lanzadas oficialmente al mercado recién en 1996. En ese mismo año Bazzi y Rodríguez (1996) probaron por primera vez en Corrientes un producto perteneciente a este grupo, con aplicaciones de diciembre y enero obteniendo resultados promisorios. A su vez en Brasil un grupo de investigadores de la Universidad de São Pablo, en el año 2010, desarrollaron un hongo transgénico que asume un aspecto fluorescente al ser sometido a la luz ultravioleta para poder facilitar el estudio de esta enfermedad. El organismo modificado genéticamente fue el hongo *Guignardia citricarpa*, al cual se le introdujo el gen que lo hace fluorescente (8).

### **3.1 Características de *Bacillus subtilis*:**

Es una bacteria gram positiva, la cual produce endosporas que son resistentes a factores físicos perjudiciales como la temperatura, la desecación, la radiación, los ácidos y desinfectantes químicos. Muchos bacilos producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y donadores de electrones. Esta bacteria es conocida por ser antagonista de muchos hongos patógenos vegetales. Este antagonismo es logrado a través de diversos mecanismos que incluyen la competencia por nutrientes, exclusión del sitio; colonización de la bacteria en el patógeno y/o la liberación de componentes celulares durante el crecimiento en orden de eliminar o reducir los competidores en su medio ambiente inmediato. El proceso de liberación del contenido celular se cree que ha evolucionado, así el organismo protege su nicho inhibiendo el crecimiento de los competidores y utilizando la misma fuente nutricional (17).

González y Fragoso (2002), señalaron que dicha bacteria no es potencialmente patógena, no produce endotoxinas y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las iturinas. Esta bacteria es utilizada industrialmente como insecticida y fungicida (17).

#### IV. OBJETIVO

El objetivo de esta experiencia fue evaluar la eficiencia de un nuevo fungicida biológico a base de *Bacillus subtilis*, aplicado en diferentes secuencias y su comparación con otros fungicidas de uso masivo en la región, en el control de mancha negra en frutos de Naranjo dulce.

#### V. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del Ensayo: Establecimiento del Sr. Juan Karlem, Departamento de Bella Vista, Provincia de Corrientes.

Especie: Naranjo dulce, *Citrus sinensis* L.

Portainjerto: Lima de Rangpur.

Densidad de plantación: 408 plantas por hectárea (7 por 3,5).

Edad de plantas: 25 años de implantadas.

Agente causal: *Guignardia citricarpa* Kielly.

Diseño experimental: Bloques al azar, compuestos de 7 tratamientos.

Parcela experimental: 1 planta, con sus respectivas borduras.

Repeticiones: Cuatro (4).

La aplicación de los tratamientos se realizó con una motomochila atomizadora de espalda, como puede apreciarse en la figura N° 4.



**Figura N° 4:** Fotografía tomada al momento de realizar las aplicaciones a campo.

**Productos a utilizar:**

**1) Fungicida orgánico a base de *Bacillus subtilis*.** Concentración 1.34% SC 4L/ha.

Nombre químico: Serenade ASO de Bayer.

Grupo químico: biofungicida.

Principio activo: *Bacillus subtilis*.

Modo de acción: biofungicida preventivo de amplio espectro.

**2) Trifloxistrobin 0.01%.**

Grupo químico: estrobirulina

Nombre comercial: Flint de Bayer.

Uso: fungicida mesostémico de las familia de las estrobirulinas. La sustancia activa es altamente lipofílica y rápidamente penetra en profundidad al interior de las hojas y frutos.

Modo de acción: inhibe la respiración mitocondrial como resultado de un bloqueo de transportes de electrones de la ubihidroquinona hacia el citocromo C. Como consecuencia se produce una reducción de energía en forma de ATP.

**3) Oxicloruro de Cobre al 0.3%.**

Clasificación química: fungicida inorgánico.

Modo de acción: de contacto, preventivo. El ión cúprico reacciona con enzimas del patógeno provocándole desnaturalización de proteínas.

**4) Aceite emulsivo de verano.**

Clasificación química: Hidrocarburo.

Uso: como coadyuvante, además ejerce un efecto potenciador del fungicida.

Todos los tratamientos llevarán aceite emulsivo como adherente al 2 %.

Para llevar a cabo las aplicaciones se utilizará un pulverizador hidroneumático de espalda.

**Tratamientos:**

**Tabla Nº 1:** En la tabla pueden apreciarse el testigo y los diferentes tratamientos con fungicidas empleados en el ensayo en los distintos meses de aplicaciones.

Tratamiento	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Marzo
1 (testigo)	-	-	-	-	-	-	-
2	Oxicloruro de Cu 0.3%	Oxicloruro de Cu 0.3%	Oxicloruro de Cu 0.3%	Oxicloruro de Cu 0.3%	Oxicloruro de Cu 0.3%	Oxicloruro de Cu 0.3%	Oxicloruro de Cu 0.3%
3	Oxicloruro de Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40 cc	Oxicloruro de Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40 cc	Oxicloruro de Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40 cc	Oxicloruro de Cu 0.3%
4	Oxicloruro de Cu 0.3%	Oxicloruro de Cu 0.3%	Oxicloruro de Cu 0.3%	Trifloxistrobin 0.01%	Oxicloruro de Cu 0.3%	Trifloxistrobin 0.01%	Oxicloruro de Cu 0.3%
5	Oxicloruro de Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40 cc	Oxicloruro de Cu 0.3%	Trifloxistrobin 0.01%	Bacillus subtilis 40 cc	Trifloxistrobin 0.01%	Oxicloruro de Cu 0.3%
6	Oxicloruro de Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40 cc	Bacillus subtilis 40 cc	Trifloxistrobin 0.01%	Bacillus subtilis 40 cc	Trifloxistrobin 0.01%	Bacillus subtilis 40 cc
7	Oxicloruro de Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40 cc					

El tratamiento testigo no se pulverizó en ningún momento de la experiencia.

En todas las aplicaciones se utilizó aceite emulsivo en concentración del 0.2%.

**Dosis de probadas:**

*Bacillus subtilis*: 4.0 L. ha<sup>-1</sup>

Trifloxistrobin: 0.01%

Oxicloruro de cobre: 0.3% en todos los casos.

**APLICACIONES:**

**1er. Aplicación:** 2 de agosto de 2015.

Hora: 12.00.

Temperatura 22°C.

Humedad atmosférica: 50%.

Pulverizadora: Motomochila de espalda.

Volumen por planta: 2.0 L por planta.

Estado fisiológico: 45% pimpollos florales, 45% flores y 10% frutos sin pétalos.

**2da. Aplicación:** 25 de septiembre de 2015.

Hora: 10.00.

Temperatura 18°C.

Humedad atmosférica: 65%.

Pulverizadora: Motomochila de espalda.

Volumen por planta: 2.3 L por planta.

Estado fisiológico: Flores: 100% frutos con pétalos caídos con promedio de 0.5 cm diámetro.

**3er. Aplicación:** 15 de octubre de 2015.

Hora: 10,00 hs.

Temperatura: 21°C.

Humedad atmosférica: 60%.

Máquina pulverizadora: Motomochila de espalda.

Volumen de solución: 2,0 L. por planta.

Estado fisiológico: Frutos 0,5 a 1,0 cm. de diámetro.

**4ta. Aplicación:** 18 de noviembre de 2015.

Hora: 12.00 hs. Temperatura: 28°C.

Humedad atmosférica: 55%.

Humedad de suelo: Muy buena.

Máquina pulverizadora: Motomochila de espalda.

Volumen de solución: 2.25 L. por planta.

Estado fisiológico: aproximadamente 30 días de caída de pétalos.

Tamaño de frutos: 2.5 a 3.0 cm. de diámetro.

**5ta. Aplicación:** 15 de diciembre de 2015.

Hora: 15.00 hs.

Temperatura: 27°C.

Humedad atmosférica: 60%.

Humedad de suelo: Muy buena.

Máquina pulverizadora: Motomochila de espalda.

Volumen de solución: 2.25 L. por planta.

Estado fisiológico: aproximadamente 60 días de caída de pétalos.

Tamaño de frutos: 3.5 a 4.0 cm. de diámetro.

**6ta. Aplicación:** 14 de enero de 2016.

Hora: 07.30 hs. Temperatura: 24°C.

Humedad atmosférica: 65%.

Humedad de suelo: Buena.

Máquina pulverizadora: Motomochila de espalda.

Volumen de solución: 2.25 L. por planta.

Estado fisiológico: aproximadamente 90 días de caída de pétalos.

Tamaño de frutos: 4.5 a 5.0 cm. de diámetro.

**7ta. Aplicación:** 11 de marzo de 2016.

Hora: 09.15 hs.

Temperatura: 22°C.

Humedad atmosférica: 70%.

Humedad de suelo: Buena.

Máquina pulverizadora: Motomochila de espalda.

Volumen de solución: 2.3 L. por planta.

Estado fisiológico: aproximadamente 150 días de caída de pétalos.

Tamaño de frutos: 5.5 a 6.0 cm. de diámetro.

### **METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN:**

Las determinaciones se efectuaron sobre 40 frutos por planta (parcela), los que fueron tomados al azar, de los cuatro puntos cardinales. Se determinó Incidencia (Frecuencia) de la enfermedad, expresado en porcentaje y Severidad de la misma mediante la siguiente Escala:

Grado 0: Sin daños.

Grado 1: 1 a 15% superficie de cáscara con pústulas (síntomas) de la enfermedad.

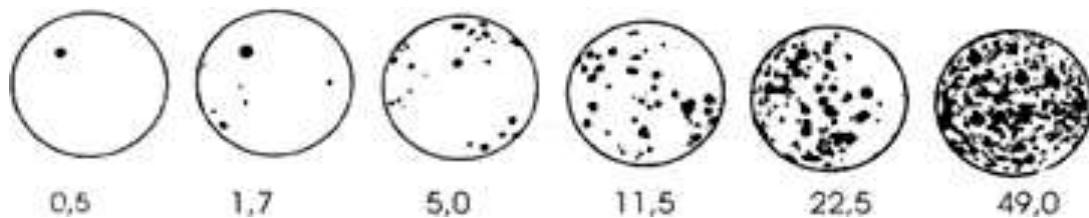
Grado 2: 16 a 30% superficie de cáscara con pústulas (síntomas) de la enfermedad.

Grado 3: 31 a 45% superficie de cáscara con pústulas (síntomas) de la enfermedad.

Grado 4: + de 46% superficie de cáscara con pústulas (síntomas) de la enfermedad.

Escala desarrollada por Spósito *et al* (2004) modificada por Mazza- Rodríguez (22).

Escala de Spósito	Escala modificada por Mazza- Rodríguez
-	Grado 0: sin síntomas
0.5% a 5%	Grado 1: hasta un 15% de síntomas
5% a 11.5%	Grado 2: del 16 al 30% de síntomas
11.5% a 22.5%	Grado 3: del 31 al 45% de síntomas
22.5% a 49%	Grado 4: + del 45% de síntomas



**Figura Nº 5:** escala diagramática. Spósito *et al* (2004) (22).

**Incidencia:** porcentaje de frutos con síntomas.

**Severidad:** superficie o área de tejido vegetal dañado de un fruto.



**Figura Nº 6:** escala de evaluación de síntomas utilizada en el presente trabajo. De izquierda a derecha: GRADO 0, GRADO 1, GRADO 2, GRADO 3, GRADO 4. (Escala Mazza- Rodríguez).

Luego se utilizó la fórmula:

#### **Severidad**

$$\text{IS: } \frac{0 \times \text{N}^{\circ}\text{Frutos G.0} + 1 \times \text{N}^{\circ}\text{Frutos G.1} + 2 \times \text{N}^{\circ}\text{Frutos G.2} + 3 \times \text{N}^{\circ}\text{Frutos G.3} + 4 \times \text{N}^{\circ}\text{Frutos G.4}}{40}$$

**IS:** índice de severidad; **N:** numero de frutos evaluados; **G:** grado de la escala

#### **EVALUACIÓN:**

Se realizó el día 25 de Junio de 2016.

Con los resultados obtenidos se efectuó el análisis de Varianza y Test de Duncan.

Tabla Nº 2: Precipitaciones producidas durante el ensayo. (Datos tomados en INTA Bella Vista, 5 km del ensayo).

<b>Mes</b>	<b>Año</b>	<b>Precipitaciones (mm)</b>
Julio	2015	12
Agosto	2015	146
Septiembre	2015	5
Octubre	2015	216
Noviembre	2015	228
Diciembre	2015	366
Enero	2016	121
Febrero	2016	76
Marzo	2016	89
Abrial	2016	298

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la siguiente tabla se describen los diferentes productos utilizados y momento de aplicación de cada uno. Se presenta además los valores de incidencia e índice de severidad.

TABLA N° 3: Bella Vista. Evaluación de frutos infectados por mancha negra. Promedio de 4 repeticiones. Test de Duncan. Nivel 0.05.

Tratam.	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Dbre.	Enero	Marzo	Incidencia	Severidad
1	Testigo	Testigo	Testigo	Testigo	Testigo	Testigo	Testigo	73.7 d	1.04 d
2	O. Cu 0.3%	O. Cu 0.3%	O. Cu 0.3%	O. Cu 0.3%	O. Cu 0.3%	O. Cu 0.3%	O. Cu 0.3%	43.1 bc	0.48 bc
3	O. Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40cc	O. Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40cc	O. Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40cc	O. Cu 0.3%	35.6 bc	0.44 abc
4	O. Cu 0.3%	O. Cu 0.3%	O. Cu 0.3%	Trifloxistrobin 0.01%	O. Cu 0.3%	Trifloxistrobin 0.01%	O. Cu 0.3%	28.7 ab	0.32 ab
5	O. Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40cc	O. Cu 0.3%	Trifloxistrobin 0.01%	Bacillus subtilis 40cc	Trifloxistrobin 0.01%	O. Cu 0.3%	19.4 a	0.21 a
6	O. Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40cc	Bacillus subtilis 40cc	Trifloxistrobin 0.01%	Bacillus subtilis 40cc	Trifloxistrobin 0.01%	Bacillus Subtilis 40cc	28.7 ab	0.32 ab
7	O. Cu 0.3%	Bacillus subtilis 40cc	51.2 c	0.60 c					
C.V.								25.0	32.0

**Letras iguales: Sin diferencias estadísticas significativas.**

En la tabla N°3, se puede observar que el tratamiento testigo presentó una incidencia del 73,7% y un índice de severidad del 1,04, por lo que se puede deducir que se trató de un lote con un alto ataque de *Guignardia citricarpa*. Esta situación pudo haberse dado por las condiciones climáticas predisponentes para el inoculo del patógeno, ya que se presentó un año cálido y húmedo, dando así un ambiente propicio para la diseminación de esporas y posterior infección del hongo.

Conforme a las evaluaciones realizadas se puede apreciar en la tabla correspondiente, que todos los tratamientos con aplicaciones superaron en el control de manera significativa con respecto al testigo, tanto en incidencia, con valores que oscilaron entre un máximo de 51.2% y un mínimo de 19.4%, como en severidad, cuyos índices variaron entre 0.60 y 0.21 respectivamente.

En Incidencia, desde el punto de vista estadístico, los tratamientos más eficientes fueron el 5; 4 y 6 con 19.4% y 28.7% para los dos últimos que no alcanzaron a diferenciarse del 3 y 2 y éstos no lo hicieron del 7.

Es importante poner de relieve al tratamiento N° 5 con aplicaciones de Trifloxistrobin en noviembre y enero y oxicloruro de cobre y *Bacillus subtilis* alternándose durante los meses restantes, con el que se obtuvo, por lo menos en esta experiencia, algo más del 80% de frutas libres de síntomas de la enfermedad. Esto puede atribuirse a la

combinación de tres fungicidas con principios activos distintos, aplicados durante todo el periodo de mayor susceptibilidad al patógeno.

En los tratamientos Nº 4 (con aplicaciones de oxicloruro de cobre y Trifloxistrobin) y Nº 6 (con aplicaciones de oxicloruro de cobre, *Bacillus subtilis* y Trifloxistrobin) se obtuvieron buenos resultados, alcanzando una incidencia del 28.7% y un índice de severidad del 0.32. Si bien la eficacia de control que ejercen, es algo menor que la del tratamiento Nº 5, se puede recomendar ambos tratamientos y recalcar la importancia en la rotación de principios activos, reduciendo así las posibilidades de una eventual resistencia al oxicloruro de cobre y a las estrobirulinas, ya que estos productos son utilizados de forma masiva y generalizada en la actividad citrícola regional.

No se debería dejar de destacar al tratamiento 3, solamente con aplicaciones alternadas de oxicloruro de cobre y *Bacillus subtilis* con el que alcanzó casi un 65% de frutas sin síntomas del patógeno, control que podría considerarse como aceptable, principalmente si se consideran las copiosas lluvias producidas desde octubre hasta enero (ver tabla Nº 2), período de mayor esporulación del hongo informado por investigadores en Sudáfrica y Argentina (16). Dummel *et al.* (2012) en Misiones Argentina, establecieron que las mejores condiciones para la liberación de ascosporas de *Guignardia* se dan a partir de septiembre hasta abril, con picos de octubre a enero coincidiendo con la época de mayor precipitación y temperatura, concordando así con lo establecido en Sudáfrica (5; 16)

El tratamiento Nº2, con aplicación de oxicloruro de cobre durante toda la experiencia, presentó una incidencia del 43.1%. Si lo comparamos con el tratamiento Nº3, que alcanzó una incidencia del 35.6%, se puede observar que existe una diferencia del 7.50%. Si bien el tratamiento número 3 supera al tratamiento número 2 no lo hace de manera significativa de acuerdo con el test de Duncan. Es evidente que el oxicloruro de cobre, sin el complemento del fungicida biológico, ejerce un menor control de la enfermedad que se podría considerar como insuficiente.

Con respecto al tratamiento Nº 7 (con aplicaciones de oxicloruro de cobre en agosto y luego *Bacillus subtilis*) se puede apreciar que hubo un menor control del patógeno alcanzando una incidencia del 51,2% y severidad del 0,60. A modo de crítica, este tratamiento deja muy expuesta a la planta ante un eventual ataque de mancha negra y cancrrosis, principalmente en plantaciones más jóvenes, ya que en el período de mayor virulencia del agente causal se realizan aplicaciones de manera continua del boifungicida a base de *Bacillus subtilis*, dejando a la planta sin la protección del oxicloruro de cobre. Lo conveniente serían aplicaciones alternadas de ambos fungicidas para el control de la enfermedad, como sería el caso del tratamiento 3, principalmente en lotes con escasa presión de cancrrosis y mancha negra.

Se puede concluir que el uso complementario de diferentes fungicidas, con distintos principios activos, aplicados en épocas adecuadas realiza un control más eficiente de la enfermedad en cuestión.

Carcaño (2012), en el mismo establecimiento, también evaluó la eficiencia de un fungicida a base de *Bacillus subtilis*, el control que se obtuvo de la enfermedad en este trabajo fue muy bueno, encontrando bajos valores de incidencia (6.7%) e índice de severidad (0.07) (23).

Mambrin (2015), en Bella Vista Corrientes, trabajó con *Bacillus subtilis* y Trifloxistrobin para el control de sarna de los cítricos (*Elsinöe* sp.), obteniendo muy buenos controles de dicha enfermedad (18).

En Severidad, el análisis resulta similar a lo realizado para Incidencia, el de mejor comportamiento estadístico resultó el tratamiento Nº 5 con un índice de 0.21, aunque no se diferenció significativamente de los tratamientos 4; 6 y 3.

## **VII. CONCLUSIONES**

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta experiencia, se puede concluir que:

- Todos los tratamientos con aplicaciones superaron significativamente al testigo en cuanto a incidencia y severidad de la enfermedad.
- En incidencia, desde el punto de vista estadístico, los tratamientos más eficientes en el control de *Guignardia citricarpa* fueron el Nº 5; 4 y 6, y para severidad además de éstos, se adiciona el tratamiento Nº 3.
- El fungicida biológico evaluado se complementó muy bien con los productos fúngicos convencionales empleados en la experiencia.
- El manejo de fungicidas con diferentes principios activos logró controlar la enfermedad de manera satisfactoria.

### VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abrahán, René. 2004. Comportamiento de un nuevo fungicida del grupo de las Estrobiurinas en el control de *Guignardia citricarpa*, aplicado en diferentes momentos y comparando con otros productos utilizados en la zona. Trabajo final de graduación.
2. BASF – Aktiengeselis Chft. 2000. Centro agrícola de BASF. Limburgerhof Alemania.
3. Canteros, B.I. 2003. Manejo del moteado negro de los cítricos. Hoja de divulgación nº 11. E.E INTA, Bella Vista Corrientes. Argentina.
4. Chabbal, M., Bertuzzi, S. Avanza, M., Yfran, M., Giménez, L., Rodríguez, V., 2010.comportamiento de una nueva estrobiurina en el control de mancha negra en frutos de limón Eureka. XXIII Reunion de Comunicaciones Científicas y Técnicas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE. 01/08/2012.
5. Delia M. Dummel, Juan P. Agostini y Ricardo Moschini. Modelo predictivo para la liberación de ascosporas de *Guignardia citricarpa* utilizando datos climatológicos. XIIº Congreso Internacional de Cítricos Valencia/España (2012).
6. EEAOC. Programa citrus. Enfermedades (2012).
7. Federación argentina del citrus. Los cítricos nuestra fruta. <http://www.federcitrus.org/fruta.asp>
8. Federación de citrus de Entre Ríos (FeCIER). Brasil: usan transgénicos para estudiar la mancha negra de los cítricos (2010).
9. Ficha técnica: Mancha negra de los cítricos *Guignardia citricarpa* Kiely. Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria LANREF. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Alimentación (SAGARPA). Estados Unidos Mexicanos (2010).
10. Fonseca, A.R. 2003. Comportamiento de una nueva Estrobiurina (Pyraclostrobin), y de sus mezclas con diferentes fungicidas en el control de *Guignardia citricarpa* (MNC). Trabajo final de graduación.
11. Frutas cítricas (limón, mandarina y naranja); Corriente, Entre Ríos y Tucumán. <http://www.cofecyt.mincyt.gov.ar> .
12. <http://www.agrobit.com/>. Producción de Cítricos.
13. <http://www.magrama.gob.es/>. Las variedades de cítricos.
14. <http://www.minagri.gob.ar/>. Dirección de mercados agrícolas. Área mercado de frutas.
15. Kellerman, C.R. La Grange, J.R and Irving. 1980- Report on research work by preharvest pathologist 1976-1979. South African Cooperative Citrus Exchange.

16. Kotze, J.M. 1981. Epiphytology and Control of Black spot in South Africa. *Plant Disease* pp. 65, 945-960.
17. Lisboa Minguzzi, M., 2003. Efecividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris *Botritis cinerea* en *Vid vinífera*. Memoria de título. Universidad de Talca. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de agronomía. Pags. 20-21.
18. Mambrin, Augusto Gabriel (2015). Trabajo final de graduación. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE.
19. Mika, R; Fabiani, A; Barroca, L. y Anderson, C. 1996. Manual para productores de naranjas de la Región del Rio Uruguay. Secretaria de Agricultura, Pesca y Alimentación. INTA. Argentina.
20. Palacios, J. 2005. "Citricultura". Editorial Hemisferio Sur, Tucumán-Argentina.
21. Rodríguez V. A; María Mercedes Avanza; Silvia Matilde Mazza; Laura Itatí Giménez (Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Facultad de Ciencias Agrarias (FCA). 2010. efecto del Pyraclostrobin en el control de mancha negra de los cítricos.
22. Spósito, MB. Amorim, L. Belasque Junior, J. Bassanezi, R.B. & Aquino, R. Elaboracao e validacao de escala diagramática para validacao da severidade da mancha preta em frutos cítricos. *Fitopatología Brasileira* 29:081-085. 2004.
23. Tesis de Raúl Antonio Carcaño (2012). Trabajo final de graduación. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE.
24. Zamer, 2013. Comportamiento de una nueva Estrobilurina para el control de la MNC. Trabajo final.