

avance

agroindustrial

Septiembre de 2004

Vol 25 N° 3

ISSN 0326 - 1131

ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGROINDUSTRIAL "OBISPO COLOMBRES"

PRESIDENTE:

Ing. Agr. José Manuel Avellaneda

VICEPRESIDENTE:

Ing. Agr. Ignacio José Lobo Viaña

DIRECTORES:

Sr. Joaquín Daniel Gargiulo
Ing. Agr. Ernesto Rubén Saade
Ing. Agr. Luis Gonzalo Vallejo
Ing. Mec. Juan Carlos Paz
C.P.N. Pedro César Omodeo
Ing. Agr. Jorge de Zuasnábar
Ing. Qco. Alejandro Poviña

DIRECTOR TÉCNICO:

Dr. Leonardo Daniel Ploper

DIRECTORES ASISTENTES

Investigación y Tecnología Agrop.
Ing. Agr. Jorge Scandaliaris
Investigación y Tecnología Indust.
Ing. Qco. Gerónimo Cárdenas
Disciplinas Especiales
Lic. Eduardo Willink
Administración y Servicios
C.P.N. Julio Esper

EDITOR RESPONSABLE:

Dr. Leonardo Daniel Ploper

COMISIÓN PUBLICACIONES Y DIFUSIÓN:

Ing. Qco. Gerónimo Cárdenas
Ing. Agr. Jorge Scandaliaris
Ing. Agr. Amanda Blanco
Ing. Agr. Ernesto Chavanne
Ing. Agr. Miguel A. Ahmed
Lic. Eduardo Willink
Ing. Agr. María Inés Cuenya

PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN:

DG Silvio Salmoiraghi

IMPRESIÓN:

El Gráfico

www.eeaoc.org.ar

E-mail: biblioteca@eeaoc.org.ar

Tel./Fax: (0381) 427-6561 y Rot.

Registro de la propiedad intelectual N° 126.235

C.C. N° 9-Las Talitas-C.P. 4101-Tucumán-Argentina

Edición trimestral tirada: 1.000 ejemplares

Se autoriza la reproducción parcial o total citando la fuente.

Se agradece el envío de la publicación en que se incluya nuestro material.

EN ESTE NUMERO...

□ Editorial.....	3
□ Aniversario de la EEAOC. 95 años de investigación y servicios	4
□ Noticiero agroindustrial	9
□ Evaluación de diferentes alternativas de manejo en semilleros de caña de azúcar de alta calidad	14
□ Mejora en la capacidad productiva de los cañaverales de la Provincia de Tucumán revelada a través de imágenes satelitales. Zafra 2004	17
□ Síntomas de "moteado" en frutos y hojas de limonero en Tucumán causados por <i>Guignardia mangiferae</i>	21
□ Corrección de la acidez de los suelos en quintas de limoneros mediante aplicaciones de dolomita	27
□ Spinosad: una nueva alternativa para el control químico del minador de la hoja de los cítricos	32
□ Resultados del IV Taller de Híbridos de Maíz	34
□ Prospectiva de costos y márgenes brutos para la campaña de soja 2004/05	38
□ Posibilidad de utilización de motores oleohidráulicos en fábricas de azúcar de caña ..	41
□ El tiempo y los cultivos en el periodo julio – setiembre 2004	45



FOTO DE TAPA

Diversos momentos del Acto por el 95º Aniversario de la Estación Experimental Agroindustrial "Obispo Colombres" (EEAOC).

Síntomas de "moteado" en frutos y hojas de limonero en Tucumán causados por *Guignardia mangiferae*

G. M. Fogliata*, N. V. Canton**, M. L. Muñoz***, L. D. Ploper****, M. E. Farias*****, G. Vellice*****, M. Salgado*****, M. Ontivero***** y A. Castagnaro*****

Introducción

Los frutos y las hojas de limonero de la provincia de Tucumán suelen presentar una sintomatología conocida como "moteado". Esta consiste en lesiones circulares de color castaño oscuro a negro, con diámetro menor a 2 mm que pueden estar a nivel o bien ser levemente deprimidas (Figuras 1 y 2).

Desde que se detectó este síntoma en Tucumán se lo asoció con el hongo *Guignardia citricarpa* Kiely (*Phyllosticta citricarpa* McAlpine), **agente causal de la mancha negra de los cítricos**. Se determinó que, por las características del síntoma, podría corresponder a la "falsa melanosis" o "speckled blotch", uno de los cuatro síntomas de esta enfermedad (Foguet *et al.*, 1985). Asimismo, al realizar siembras de trozos de cáscara de limón (Fogliata *et al.*, 2002) y de hojas de limonero (Foguet *et al.*, 1985) con síntomas de moteado en medio de cultivo agar papa glucosado (APG) al 2% (técnica de diagnóstico convencional) se obtenían colonias de *Guignardia* con características morfológicas y culturales similares a las de *G. citricarpa*.

Dos especies de *Guignardia*

Hasta el año 2002 se conocía la existencia de 2 especies de *Guignardia* presentes en los cítricos, una de ellas causante de la enfermedad denominada mancha negra de los cítricos (*G. citricarpa*) y la otra endofítica (*Guignardia* sp.). Con respecto a esta última especie se conocía que estaba presente en hojas y frutos cítricos sin síntomas y en otras especies vegetales (McOnie, 1964).

La diferenciación de estas dos especies de *Guignardia* mediante técnicas convencionales resultaba poco consistente debido a las características morfológicas y culturales similares de ambos hongos.

En el año 2002, un grupo de investigadores de Holanda, Sudáfrica, EE.UU. y Brasil desarrolló un método para diferenciar estas 2 especies mediante estudios del ácido nucleico (ADN) del hongo (técnicas moleculares) (Baayen *et al.*, 2002). Esto permitió concluir que *Guignar-*

dia sp., presente en cítricos sin síntomas y además en frutos cítricos con puntuaciones menores a 2 mm de diámetro, se trataba de una especie diferente, *Guignardia mangiferae* A.J. Roy (*Phyllosticta capitalensis*) (P. Hennings) Van Der Aa. Esta especie fue citada en cítricos y en numerosas plantas no cítricas cultivadas y silvestres de la Unión Europea y los EE.UU. Su distribución geográfica es mucho más amplia que la especie *G. citricarpa*, incluyendo importantes áreas cítricas tales como Florida, España, Sicilia e Israel.

En el año 2003, investigadores de Holanda y EE.UU. (integrantes del grupo de investigadores mencionado anteriormente) lograron desarrollar y validar un método que permitió diferenciar las dos especies de *Guignardia* (Bonants *et al.*, 2003). Este método está basado en estudios de ADN mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction - PCR). Se trata de un método de alta solidez y eficacia que utiliza cebadores que reconocen regiones específicas del ADN genómico ribosomal de cada una de estas dos especies.

Diferencias en las restricciones cuarentenarias

La Unión Europea y los EE.UU. consideran a *G. citricarpa* un riesgo sanitario para su citricultura, por lo tanto el ingreso de fruta desde áreas con presencia de este patógeno afectando los cítricos es sometido a legislaciones fitosanitarias. Estas restricciones cuarentenarias no se aplican a *G. mangiferae*, puesto que este hongo está presente en los mencionados países.

Estudios realizados en la EEAOC

A partir del conocimiento de las técnicas para diferenciar ambas especies de *Guignardia*, se efectuaron estudios en la Estación Experimental Agroindustrial "Obispo Colombres" (EEAOC) destinados a establecer la identidad de la especie de *Guignardia* que se aislaba del síntoma del moteado en hojas y frutos de limonero en Tucumán.

A continuación se describen los estudios llevados

*Ing. Agr., **Lic. Cs. Biol., ***Téc. Univ. Fitosan., ****Ing. Agr. Ph.D., Sección Fitopatología, EEAOC; *****Lic. Cs. Biol. Dra., PROIMI; *****Lic. Cs. Biol., *****Bioq., *****Ing. Agr. Dr., Sección Biotecnología, EEAOC.

a cabo en la EEAO, en los que también se analizaron aislamientos obtenidos de síntomas de mancha negra de los cítricos, de motas en hojas de mango (Figura 3), y otros obtenidos de tejido sano de limonero y mango.

a) Pruebas convencionales de diagnóstico

Para detectar los microorganismos asociados a los síntomas observados, se realizaron siembras en APG al 2% de trozos de tejido con síntomas de moteado y con síntomas similares a los de mancha negra de los cítricos (mancha típica, mancha pecosa y mancha virulenta), así como de tejido sano. Además se realizaron siembras a partir de trozos de hojas de limonero con moteado y de hojas de mango, sanas y con presencia de motas.

Como resultado de las siembras y aislamientos se obtuvieron colonias de *Guignardia* spp. a partir de todos los tejidos vegetales sembrados en APG. La eficacia de este método para obtener colonias de *Guignardia* spp. varió de 1,4 a 27,6% según el síntoma y el órgano afectado (Tabla 1).

La identificación del género se realizó mediante estudios en microscopio óptico de las características morfológicas de las esporas sexuales (ascosporas) y asexuales (picnidiosporas) formadas (Figuras 4 y 5).

A partir de las colonias identificadas como pertenecientes al género *Guignardia* se realizaron cultivos monospóricos con el fin de crear un cepario para realizar estudios posteriores destinados a diferenciar especies dentro del género *Guignardia*. Hasta el presente se dispone de noventa cepas puras de *Guignardia* spp.

b) Diferenciación de especies mediante estudios moleculares

A partir de Octubre de 2003, en la Sección Fitopatología de la EEAO, se inició el ajuste de las técnicas moleculares incluidas dentro de los protocolos de diagnóstico que tiene la "European Plant Protection Organization" (EPPO) para plagas reguladas, con el objeto de determinar la especie de todas las cepas del género *Guignardia* contenidas en el cepario.

La primer etapa consistió en realizar la extracción de ADN siguiendo el protocolo de Reader & Broda (1985).

En la segunda etapa se ajustó la técnica molecular de diferenciación de especies.

Se realizó la amplificación mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR de 36 cepas

de *Guignardia* spp. utilizando los cebadores específicos para *G. citricarpa* (GCF3 y GCR7) y para *G. mangiferae* (GCF2 y GCR4) obtenidos de la región de ITS del ADN genómico ribosomal. La presencia de bandas específicas se visualizó en geles de agarosa. Las bandas de 490 pares de bases (pb) correspondieron a *G. citricarpa* y las bandas de 210 pb a *G. mangiferae*, tal cual lo mencionado en la literatura (Bonants *et al.*, 2003).

Las bandas de ADN amplificadas de algunas cepas se muestran en las Figuras 6 y 7.

Los resultados de esta técnica permitieron identificar 34 cepas:

Como *Guignardia mangiferae* (27 cepas)

- 20 cepas aisladas de **moteado de frutos de limonero** (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M18, M19, M21 y MA1).
- 1 cepa aislada de **moteado de hoja de limonero** (Mh1).
- 3 cepas aisladas de **tejido sano de frutos de limonero** (S3, S4, S6).
- 2 cepas aisladas de **mancha pecosa de frutos de limonero** (P3 y P6).
- 1 cepa aislada de **tejido sano de hoja de mango** (SG2).

Como *Guignardia citricarpa* (7 cepas)

- 2 cepa aislada de **mancha típica de frutos de limonero** (T13, T16).
- 3 cepas aisladas de **picnidios de mancha típica de frutos de limonero** (PT1, PT2 y 3B).
- 1 cepa aislada de **mancha pecosa de fruto de limonero** con presencia de manchas típicas (P11).
- 1 cepa aislada de **mancha virulenta de fruto de limonero** (V4).

Las muestras de ADN extraídas de las cepas V1 y V2 (aisladas de frutos de limonero con mancha virulenta) no amplificaron con ninguno de los cebadores.

c) Diferenciación de especies en medio de cultivo agar harina de avena (oatmeal agar - OA)

Se realizaron repiques de las cepas de *Guignardia* en cajas de Petri con agar harina de avena, con el objeto de detectar diferencias en las características culturales de las colonias y en la velocidad de crecimiento. Se siguió la metodología indicada por Baayen *et al.* (2002).

Tabla 1. Porcentaje de colonias de *Guignardia* spp. obtenidas en las siembras de trozos de tejido vegetal realizadas en APG al 2%.

Tipo de Síntoma	Frutos de limonero					Hojas de limonero	Hojas de mango
	M. típica y picnidios de m. típica	Mancha pecosa	Mancha virulenta	Moteado	Tejido sano	Moteado	Tejido sano y con motas
% de colonias de <i>Guignardia</i> spp.	6,4%	25,0%	2,0%	6,4%	1,4%	27,6%	14,0%



Figura 1. Moteado en fruto de limonero.



Figura 2. Moteado en hoja de limonero.



Figura 3. Motas negras en hoja de mango.

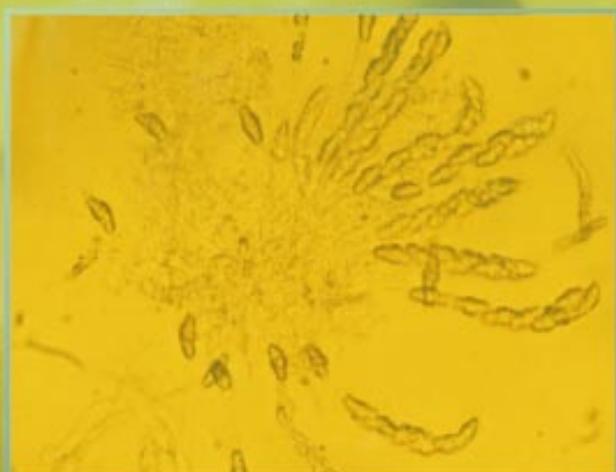


Figura 4. Ascosporas de *Guignardia* sp. observadas en microscopio óptico.



Figura 5. Picnidiosporas de *Phyllosticta* sp. observadas en microscopio óptico.

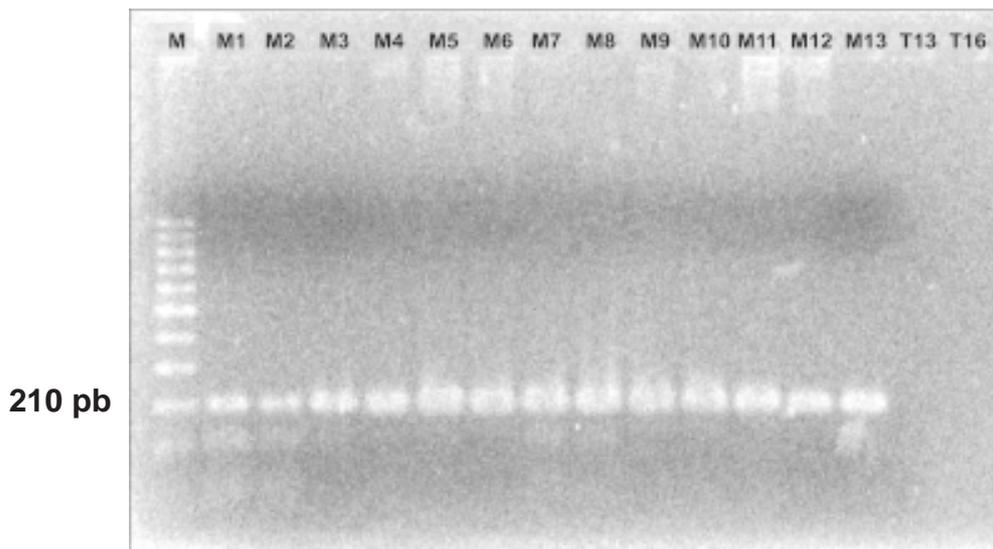


Figura 6. Bandas de amplificación de ADN en gel de agarosa con el par de cebadores específicos de *G. mangiferae* (GCF2 y GCR4), donde M corresponde al marcador de peso molecular, M1 a M13 a las cepas aisladas de "moteado" en frutos de limonero, y T13 y T16 a las aisladas de mancha típica en frutos de limonero.

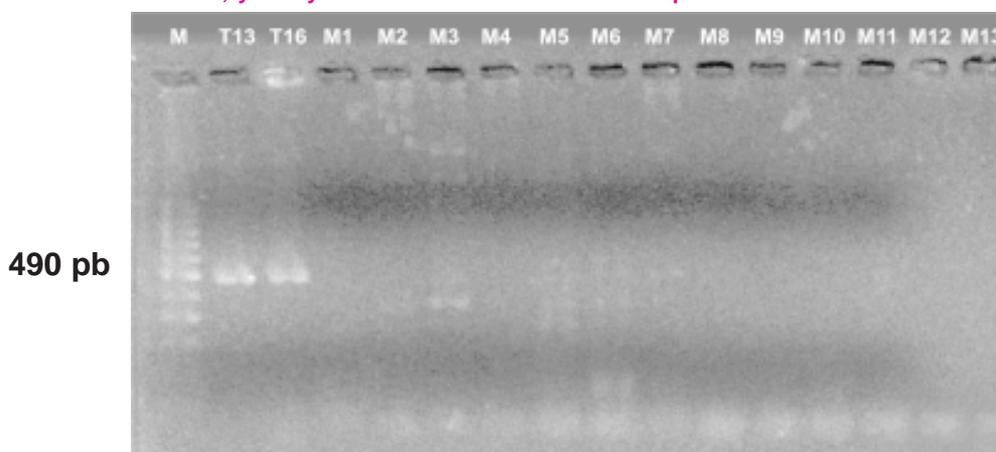


Figura 7. Bandas de amplificación de ADN en gel de agarosa con el par de cebadores específicos de *G. citricarpa* (GCF3 y GCR7), donde M corresponde al marcador de peso molecular, T13 y T16 a las cepas aisladas de mancha típica en frutos de limonero, y M1 a M13 a las aisladas de "moteado" en frutos de limonero.

Para la diferenciación de especies se considera la presencia o ausencia de una pigmentación amarilla alrededor de la colonia, y la velocidad de crecimiento de las colonias, luego de un periodo de incubación de 7 días en oscuridad a 22°C.

Los resultados de la aplicación de esta técnica en los laboratorios de la EEAOC coincidieron con los resultados de las pruebas moleculares y también con las referencias de la literatura.

Las 7 cepas identificadas como *G. citricarpa* mediante PCR, y las 2 cepas cuyos ADN no amplificaron, mostraron pigmentación amarilla alrededor de la colonia y tuvieron crecimiento lento (Figura 8).

La pigmentación amarilla estuvo ausente en las cepas identificadas como *G. mangiferae*, y la velocidad de crecimiento fue 2,5 veces mayor que las que mostraron pigmentación.

d) Pruebas de patogenicidad

Para determinar la patogenicidad de una cepa identificada como *G. mangiferae* se realizaron inoculaciones en plántulas *in vitro* del portainjerto citrange Troyer *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. (Figura 9). Se trabajó con una suspensión de esporas (concentración 10⁵ esporas/ml) en agua destilada estéril. El testigo fue inoculado con agua destilada estéril. La incubación se realizó a 26°C y luz permanente. Se realizaron observaciones cada 48 h.

Las plántulas del portainjerto reprodujeron síntomas de moteado en hojas y talluelos a tres meses de ser inoculadas con la suspensión de esporas, demostrando la patogenicidad de las cepas (Figuras 10 y 11).

Los frutos inoculados no manifestaron síntomas.

Las plántulas inoculadas con agua destilada estéril (testigos) no mostraron síntomas.



Figura 8. Colonias de *Gulgnardia* spp. en medio de cultivo OA: a) Colonia de crecimiento lento con presencia de pigmentación amarilla alrededor de la misma: *G. citricarpa*; y b) Colonia de crecimiento rápido con ausencia de pigmentación: *G. mangiferae*.



Figura 9. Plántulas *in vitro* de citrange Troyer utilizadas para realizar pruebas de patogenicidad con una cepa de *G. mangiferae*.



Figura 10. Moteado en talluelo de citrange Troyer observado a tres meses de ser inoculado con esporas de *G. mangiferae*.



Figura 11. Moteado en hoja de citrange Troyer observado a tres meses de ser inoculados con esporas de *G. mangiferae*.

Consideraciones finales

- La aplicación de la técnica molecular de Bonants *et al.* (2003) (la cual está incluida como uno de los métodos de identificación de *Guignardia citricarpa* dentro de los protocolos de diagnóstico que tiene la "European Plant Protection Organization" para plagas reguladas), y las siembras en agar harina de avena permitieron establecer la identidad de las cepas de *Guignardia* spp. evaluadas:
 - Todas las cepas evaluadas provenientes de frutos y hojas de limonero con síntomas de moteado fueron identificadas como *Guignardia mangiferae*.
 - Las cepas provenientes de tejido sano de frutos de limonero y hojas de mango fueron identificadas como *Guignardia mangiferae*.
 - Las cepas provenientes de mancha virulenta, mancha típica y de picnidios de mancha típica que se evaluaron fueron identificadas como *Guignardia citricarpa*.
 - Las cepas aisladas de mancha pecosa en frutos de limonero mostraron variabilidad en los resultados, por lo que se intensificará su estudio.
- Las características culturales y la velocidad de crecimiento de las colonias en APG no permitieron diferenciar especies dentro del género *Guignardia*.
- La cepa de *Guignardia mangiferae* utilizada para inocular plantines sanos del portainjerto citrange Troyer resultó patogénica puesto que reprodujo síntomas de moteado en hojas y tallos.
- Los resultados de la diferenciación de especies utilizando el medio de cultivo agar harina de avena (OA) coincidieron con los obtenidos mediante PCR.

Agradecimientos

Estos estudios fueron realizados con fondos de AFINOA.

Las primeras pruebas moleculares fueron llevadas a cabo en laboratorios del instituto PROIMI a través de una pasantía realizada por la Ing. Gabriela Fogliata y la Lic. Norma Canton bajo la dirección de la Dra. M. Eugenia Farías.

Las plántulas *in vitro* de citrange Troyer utilizadas para las pruebas de patogenicidad fueron cedidas por la Sección Fruticultura de la EEAOC.

Bibliografía citada

- Baayen, R. P., P. J. M. Bonants, G. Verkley, G. C. Carroll, M. van der Aa H. A. de Weerd, I. R. van Brouwershaven, G. C. Schutte, W. Maccheroni, C. Glienke de Blanco and J. L. Azevedo. 2002.** Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology* 92: 464 - 477.
- Bonants, P. J. M., G. C. Carroll, M. de Weerd, I. R. van Brouwershaven and R. P. Baayen. 2003.** Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*. *European Journal of Plant Pathology* 109:503-513.
- Fogliata, G. M., N. V. Canton, L. D. Ploper y O. Baino. 2002.** Descripción e identificación de los síntomas de mancha negra y de enfermedades con síntomas similares. *Avance Agroindustrial* (2) 23:20-24.
- Foguet, J. L., N. V. de Ramallo y G. J. Torres Leal. 1985.** Presencia de mancha negra de los cítricos en Tucumán. *Avance Agroindustrial* 22:9-10
- McOnie, K.C. 1964.** The latent occurrence in citrus and other hosts of a *Guignardia* easily confused with *Guignardia citricarpa*, the citrus black spot pathogen. *Phytopathology* 54:40-43.
- Reader, U. and P. Broda. 1985.** Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1:17-20.

Bibliografía recomendada

- Kotzé, J. M. 1988.** Black spot. Páginas 23-25 en: J. Whiteside, S. Garnsey and L. Timmer. *Compendium of Citrus Diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- McOnie, K.C. 1964.** Speckled blotch of citrus induced by the citrus black spot pathogen, *Guignardia citricarpa*. *Phytopathology* 54:1488-1489.

Convenio AAPRESID-EEAOC

Entre los días 10 y 13 de Agosto se realizó en Rosario, Santa Fé el XII Congreso Nacional de AAPRESID. Durante el Acto de Apertura de este congreso se produjo la firma del Convenio AAPRESID-EEAOC, de la cual participaron el Ing. Jorge Romagnoli (Presidente de AAPRESID), el Ing. José Manuel Avellaneda (Presidente del H. Directorio de la EEAOC) y el Dr. Daniel Ploper (Director Técnico de la EEAOC). En la ocasión los asistentes pudieron observar un corto video sobre las actividades que lleva adelante la EEAOC.