

Eficacia y selectividad de Nobacil® fortificante de las defensas de las plantas sobre *Botrytis cinerea* en el cultivo del calabacín

José Ignacio Castillo (Departamento de Investigación y Desarrollo de LIDA QUÍMICA S.L.).
Francisco Vilches Martínez y Jorge Vilches (Enagro, Ensayos y Asesoramiento Agrícola S.L.).

INTRODUCCIÓN

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno necrótrofo que infecta una amplia variedad de plantas y que puede hacer uso de diferentes mecanismos de infección. Cualquier intento de control de la enfermedad exige un conocimiento detallado tanto de los mecanismos de infección del hongo como de los mecanismos de defensa de la planta. La aplicación de distintas aproximaciones experimentales está permitiendo analizar en detalle el proceso de infección del patógeno sobre distintos huéspedes, describir los elementos que participan en cada fase del mismo e identificar aquellos factores de patogenicidad que son esenciales para que tenga lugar el establecimiento de la interacción. La caracterización de estos últimos proporcionará información acerca de elementos clave sobre los que intervenir con el objeto de desarrollar estrategias de control duraderas, efectivas y respetuosas con el medio ambiente.

Botrytis cinerea agente causal de la "podredumbre gris", infecta más de 200 especies vegetales distintas, determinando serias pérdidas económicas antes y después de la recolección. El patógeno puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo y puede infectar cualquier parte de la planta. Debido a la considerable incidencia del patógeno y a las repercusiones económicas que tiene en cultivos de importancia tales como vid, tomate, fresa, ornamentales... son muy numerosos los estudios que se han realizado sobre la biología de *B. cinerea*, sobre las interacciones en las que éste participa y sobre los posibles métodos de control del patógeno. La mayor parte de las estrategias de control utilizadas hasta el momento se han basado en el empleo de agentes químicos. Sin embargo, la utilización de fungicidas es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de contaminación ambiental que de su aplicación se derivan y por la frecuente aparición de cepas del patógeno resistentes a los fungicidas utilizados.

Las posibilidades de desarrollar estrategias de control basadas en genotipos resistentes son reducidas, ya que no se han descrito genes de resistencia en las especies que infecta y, además, la diversidad fenotípica que muestran los distintos aislamientos del hongo es enorme. En este contexto, y con el

objeto de diseñar estrategias de control válidas, resulta imprescindible profundizar en el conocimiento de mecanismos de desarrollo y patogenicidad del hongo y en los mecanismos de defensa de la planta. El análisis de los mecanismos de infección supone caracterizar los factores de patogenicidad del hongo. La genética molecular, aplicada al análisis de las interacciones planta-patógeno, está poniendo al alcance del investigador poderosas herramientas de trabajo que posibilitan estrategias experimentales muy útiles para profundizar en el análisis de los mecanismos que participan en estos procesos.

De los estudios preliminares realizados hay tres líneas de acción claramente diferenciadas y que empleadas conjuntamente se convierten en una herramienta muy completa como técnica de control:

- **Una primera línea encaminada al empleo de antioxidantes específicos para reducir los efectos del estrés biótico.**

La respuesta local está asociada a la generación de especies activas de oxígeno que, según algunos investigadores, pueden activar lo que se conoce como respuesta hipersensible y en la que, con objeto de dificultar el desarrollo del patógeno, la planta provoca la muerte de las células vegetales

que rodean los puntos de infección, dando lugar a la formación de pequeñas lesiones necróticas. De esta manera se retiran los nutrientes al patógeno, se aísla el área por medio del refuerzo de las paredes celulares circundantes y se secretan fitoalexinas en la zona aislada para controlar al patógeno.

Sin embargo estos mecanismos de defensa locales no resultan eficaces en el caso de patógenos necrótrofos, es decir, los que se alimentan de material muerto como es el caso de *botrytis* y *sclerotinia*. Estos patógenos segregan sus propias toxinas provocando la muerte celular liberando enzimas digestivas para aprovechar los nutrientes de la célula vegetal. Por lo tanto, un aumento de las especies activas de oxígeno no conduciría a parar la enfermedad, sino lo contrario, ayudaría a su desarrollo. (Alex Levine, Eri M. Govrin "Hypersensitive reaction facilitates infection of plants by *Botrytis cinerea*". Laboratory of Plant Sciences, Hebrew University, Givat-Ram, 91904 Jerusalem).

- **Una segunda estrategia con el objetivo de interferir en los procesos metabólicos implicados en la biosíntesis de la pared celular del patógeno**

Según Cid *et al.* (1995) y Orlean (1997), la pared

Nº	Tesis	Aplicación	Dosis / Ha
1	testigo	-	-
2	nobacil®	foliar	2 kg
3	nobacil®	foliar	3 kg
4	nobacil®	foliar	4 kg
5	Scala	foliar	1,5 litros

Tabla 1. Plan de ensayo.

Fecha	Estado fenológico ¹	Caldo/ha	Momento	Tª (°C)	Hr (%)
14.10.08	59-60	1000 litros	8,0 %	21	95
21.10.08	59-63	1000 litros	A07	19	92
28.10.08	73-74	1000 litros	B07	16	65
04.11.08	74-75	1000 litros	C07	18	60
12.11.08	75-76	1000 litros	D07	18	65

¹Código BBCH.

Tabla 2. Condiciones ambientales y estado de la plaga en el momento de la aplicación.

celular de los hongos está constituida por tres macromoléculas: β -glucano, carbohidrato formado por enlaces β -1,3 y/o β -1,6, quitina y manoproteínas, los cuales representan respectivamente el 50-60%, 1-2% y 35-40% del peso seco de la pared fúngica.

El enzima encargado de sintetizar los β -glucanos es la β -glucan sintetasa tomando como sustrato azúcares como la D-glucosa. Pues bien, se ha demostrado (MOORE, 1981; EL-GHAOUTH *et al.*, 1997) que utilizando como fuente compuestos análogos a estos azúcares, llamados glucodeóxidos, es posible alterar el crecimiento del patógeno al interferir en los procesos metabólicos implicados en la biosíntesis de la pared celular, es decir, reduciendo la formación de los β -glucanos.

- Y una tercera vía de control es la inhibición de la acción del ácido oxálico secretado por estos hongos como un factor determinante de la patogenicidad.

Botrytis cinerea y *Sclerotinia sclerotiorum* secretan ácido oxálico como un factor de patogenicidad. Se conocen cepas deficientes en la producción de ácido oxálico que no son patógenas y, por tanto, no producen enfermedad. Se han propuesto varias funciones del ácido oxálico en la interacción planta-patógeno:

- la secreción de ácido oxálico acidifica el pH de la superficie de la planta, favoreciendo la acción de los enzimas pectolíticos que degradan la pared celular vegetal.
- el ácido oxálico bloquea las señales de defensa locales y sistémicas de la planta.
- otro mecanismo sería el mediado por el secuestro del calcio de las paredes celulares mediante el anión oxalato debilitando de esta manera la pared celular vegetal.

Nobacil® es una innovadora formulación desarrollada para fortificar y proteger a la planta de los efectos del estrés biótico que causan los hongos necrótrofos como *Botrytis* sp. y *Sclerotinia* protegiendo la salud de las plantas, por tres vías de acción:

- neutralizando las especies oxidativas que generan estos patógenos para desarrollarse, mediante el empleo de resveratrol, de fuerte poder antioxidante.
- alterando el crecimiento del patógeno al interferir en los procesos metabólicos implicados en la biosíntesis de la pared celular mediante el uso de glucodeóxidos.
- reduciendo la acción destructiva del ácido oxálico que segrega el patógeno.

Materiales y métodos

Objetivo

Selectividad y Eficacia del formulado nobacil®, propiedad de la empresa Lida Química S.L., en el control de *Botrytis cinerea* en el cultivo del calabacín, variedad Venus.

Localización del ensayo

Finca: Cotes.
Localidad Algemesi (Valencia).
Propietario Javier Roig Roig.

Condiciones del ensayo

Cultivo/Varietal: Calabacín / Venus.
Tipo de cultivo: Aire libre.
Fecha transplante: 27.09.08
Plantas/ha: 11428 plantas (1,25 m x 0,7 m).
Riego: Por goteo.

Diseño del ensayo

Tipo de ensayo: Bloques randomizados.
Parcela elemental: 10,0 m² (2,5 m x 4m).
Repeticiones: 4

Aplicación y tratamientos (Tabla 1)

Datos de la aplicación (Tabla 2)

- Equipo: Mochila de espalda con motor de dos tiempos Maruyama modelo MS073D.
- Boquillas: Yamaho D-5. Boquilla de abanico.
- Presión: 5,0 bares.
- Plaga/grado ataque: *Botrytis cinerea* / Los tratamientos se inician con presencia de enfermedad, el área de ensayo presentaba un promedio de ataque del 8,0%.

Evaluaciones

Método

- Selectividad: Estimación del % de daños sobre el cultivo tras la aplicación, daños como decoloraciones o quemaduras, según una escala 1:10.
- Eficacia El método escogido para valorar la eficacia de los formulados ha sido, F EN DOS CLASES, consistente en la clasificación de todos los frutos presentes por parcela elemental en sanos (sin ataque) y atacados por *Botrytis cinerea*.

Momento y frecuencia

- Selectividad: A los 7 días después de cada aplicación.

tesis	Dosis (l-kg /Ha)	% frutos atacados ¹	Eficacia Abbot ⁴
		Media ²	% Media ²
1	testigo	37,8 a ³	-
2	Nobacil 2 kg	19,7 b	47,8 a
3	Nobacil 3 kg	19,4 b	48,7 a
4	Nobacil 4 kg	18,4 b	51,0 a
5	Scala 1,5 litros	17,8 b	52,8 a

1 Porcentaje de ataque = [(Frutos atacados)/(Frutos sanos + frutos atacados)]*100
 2 Promedio de cuatro repeticiones.
 3 Medias seguidas de la misma letra no difieren al 95% según la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD test).
 4 Eficacia Abbot = [(Testigo bloque-tratado bloque)/(Testigo bloque)]*100.

Cuadro 1.

tesis	Dosis (l-kg /Ha)	% frutos atacados ¹	Eficacia Abbot ⁴
		Media ²	% Media ²
1	testigo	38,7 a ³	-
2	Nobacil 2 kg	19,1 b	49,1 a
3	Nobacil 3 kg	19,0 b	50,6 a
4	Nobacil 4 kg	15,5 b	57,3 a
5	Scala 1,5 litros	13,4 b	64,7 a

1 Porcentaje de ataque = [(Frutos atacados)/(Frutos sanos + frutos atacados)]*100
 2 Promedio de cuatro repeticiones.
 3 Medias seguidas de la misma letra no difieren al 95% según la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD test).
 4 Eficacia Abbot = [(Testigo bloque-tratado bloque)/(Testigo bloque)]*100.

Cuadro 2.

tesis	Dosis (l-kg /Ha)	% frutos atacados ¹	Eficacia Abbot ⁴
		Media ²	% Media ²
1	testigo	43,8 a ³	-
2	Nobacil 2 kg	18,3 b	57,6 a
3	Nobacil 3 kg	17,6 b	59,2 a
4	Nobacil 4 kg	16,3 b	62,0 a
5	Scala 1,5 litros	15,7 b	63,2 a

1 Porcentaje de ataque = [(Frutos atacados)/(Frutos sanos + frutos atacados)]*100
 2 Promedio de cuatro repeticiones.
 3 Medias seguidas de la misma letra no difieren al 95% según la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD test).
 4 Eficacia Abbot = [(Testigo bloque-tratado bloque)/(Testigo bloque)]*100.

Cuadro 3.

tesis	Dosis (l-kg /Ha)	% frutos atacados ¹	Eficacia Abbot ⁴
		Media ²	% Media ²
1	testigo	44,5 a ³	-
2	Nobacil 2 kg	22,1 b	49,4 a
3	Nobacil 3 kg	21,9 b	50,7 a
4	Nobacil 4 kg	21,4 b	51,2 a
5	Scala 1,5 litros	19,0 b	56,8 a

1 Porcentaje de ataque = [(Frutos atacados)/(Frutos sanos + frutos atacados)]*100
 2 Promedio de cuatro repeticiones.
 3 Medias seguidas de la misma letra no difieren al 95% según la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD test).
 4 Eficacia Abbot = [(Testigo bloque-tratado bloque)/(Testigo bloque)]*100.

Cuadro 4.

tesis	Dosis (l-kg /Ha)	% frutos atacados ¹	Eficacia Abbot ⁴
		Media ²	% Media ²
1	testigo	44,5 a ³	-
2	Nobacil 2 kg	24,2 b	45,5 a
3	Nobacil 3 kg	23,9 b	46,2 a
4	Nobacil 4 kg	23,8 b	46,4 a
5	Scala 1,5 litros	20,8 c	53,1 b

1 Porcentaje de ataque = [(Frutos atacados)/(Frutos sanos + frutos atacados)]*100
 2 Promedio de cuatro repeticiones.
 3 Medias seguidas de la misma letra no difieren al 95% según la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD test).
 4 Eficacia Abbot = [(Testigo bloque-tratado bloque)/(Testigo bloque)]*100.

Cuadro 5.

tesis	Dosis (l-kg /Ha)	% frutos atacados ¹	Eficacia Abbot ⁴
		Media ²	% Media ²
1	testigo	47,1 a ³	-
2	Nobacil 2 kg	25,4 b	46,1 a
3	Nobacil 3 kg	24,7 bc	47,5 a
4	Nobacil 4 kg	24,1 bc	48,9 a
5	Scala 1,5 litros	21,5 c	54,2 a

1 Porcentaje de ataque = [(Frutos atacados)/(Frutos sanos + frutos atacados)]*100
 2 Promedio de cuatro repeticiones.
 3 Medias seguidas de la misma letra no difieren al 95% según la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD test).
 4 Eficacia Abbot = [(Testigo bloque-tratado bloque)/(Testigo bloque)]*100.

Cuadro 6.

- Eficacia:

A07. 6-8 días después de la 1ª aplicación.

B07. 6-8 días después de la 2ª aplicación.

C07. 6-8 días después de la 3ª aplicación.

D07. 6-8 días después de la 4ª aplicación.

E07. 6-8 días después de la 5ª aplicación.

E14. 13-15 días después de la 5ª aplicación.

Análisis estadístico

- Análisis de la varianza (ANOVA). Comparación de medias entre variantes según la prueba de la Mínima Diferencia Significativa.

Resultados

Cuadro de eficacias

1. Evaluación A07, día 21.10.08

% de frutos atacados por *Botrytis cinerea* por parcela elemental, siete días después de la primera aplicación (Cuadro 1).

2. Evaluación B07, día 28.10.08

% de frutos atacados por *Botrytis cinerea* por parcela elemental, siete días después de la segunda aplicación (Cuadro 2).

3. Evaluación C07, día 4.11.08

% de frutos atacados por *Botrytis cinerea* por parcela elemental, siete días después de la tercera aplica-

ción (Cuadro 3).

4. Evaluación D07, día 12.11.08

% de frutos atacados por *Botrytis cinerea* por parcela elemental, siete días después de la cuarta aplicación (Cuadro 4).

5. Evaluación E07, día 19.11.08

% de frutos atacados por *Botrytis cinerea* por parcela elemental, siete días después de la quinta aplicación (Cuadro 5).

6. Evaluación E14, día 26.11.08

% de frutos atacados por *Botrytis cinerea* por parcela elemental, catorce días después de la quinta aplicación (Cuadro 6).

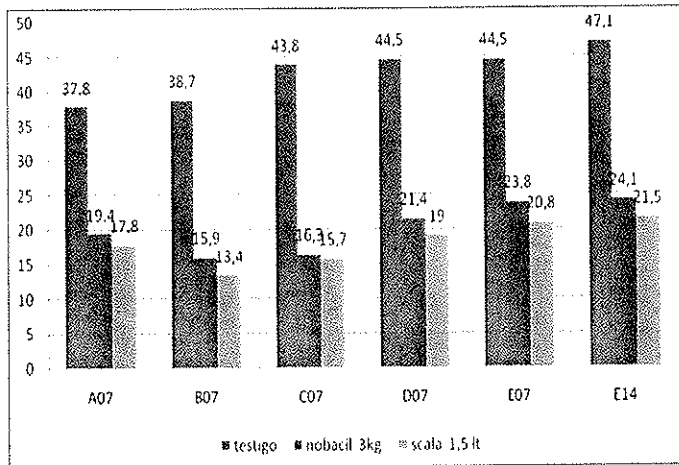


Gráfico 1. Porcentaje promedio de ataque de *Botrytis cinerea* en fruto obtenido en las distintas evaluaciones.

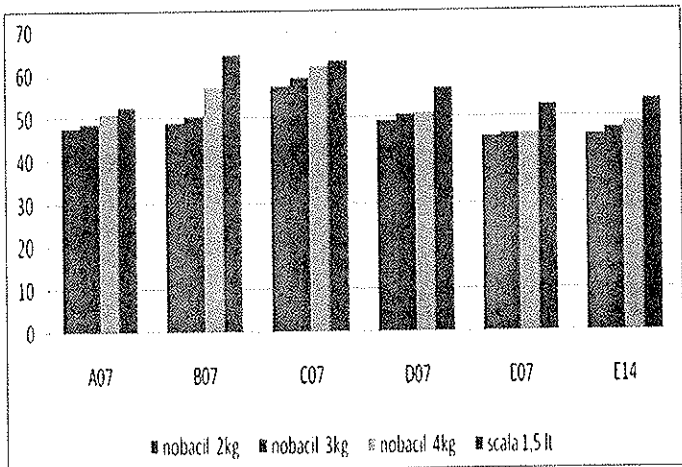


Gráfico 2. Eficacia Abbott del tratamiento obtenida en las distintas evaluaciones.

Discusión de resultados y conclusiones

Selectividad

Después de 5 aplicaciones, con un consumo de caldo de 1.000 l/Ha por aplicación, todos los productos en estudio han resultado ser selectivos para el cultivo del calabacín, variedad Venus.

Eficacia

Antes de entrar a valorar el grado de control de los distintos formulados sobre *Botrytis cinerea* en el cultivo del calabacín, conviene aclarar que se escogió el método F EN DOS CLASES consistentes en la determinación del porcentaje de ataque, después de haber clasificado los frutos presentes en cada parcela elemental en sanos y atacados (con presencia de enfermedad), no pudiéndose determinar la intensidad del ataque al considerarse que la mera presencia de enfermedad hace inviable la comercialización del fruto, los que conlleva su destrucción.

Las diferentes dosis de nobacil (2, 3 y 4 kg/Ha) tras 5 aplicaciones y un consumo de 1.000 l/Ha por aplicación han resultado ser selectivos para el cultivo del calabacín, variedad Venus, presentado un buen control sobre *Botrytis cinerea* en condiciones climáticas óptimas para el desarrollo del patógeno.

Por otra parte, antes de la 1ª aplicación, se realizó un muestreo general en el área de ensayo con la finalidad de establecer el grado de ataque de *Botrytis cinerea* del que se partía, observándose un 8% de ataque en fruto y obteniéndose bajo las condiciones de este ensayo los siguientes resultados.

La 1ª evaluación se realizó 7 días después de la 1ª aplicación, resultando todos los productos significativamente diferentes con el Testigo, registrándose un promedio de ataque de 37,8% frente a los tratados que osciló entre 17,7% y 19,7%, con unas eficacias promedio del 52,8% y 47,8%, significación que se mantuvo hasta el final del ensayo, sin que hubiera diferencias estadísticas entre los distintos formulados, circunstancia que se repitió 7 días después de la 2ª aplicación, cuando nuevamente no hubo diferencias significativas entre formulados, con un porcentaje de ataque promedio entre 20,3% y 11,8% frente al 38,7% del Testigo.

A los 7 días de la 3ª aplicación, los mejores resultados se obtuvieron con nobacil 3 kg y nobacil 4 kg y Scala, con un promedio entre 17,6% y 15,7%, significaciones que se mantuvieron 7 días después de la 4ª aplicación, mostrando nobacil y Scala unas eficacias entre 51,2% y 56,8%, respectivamente.

Después de 7 días desde la 5ª aplicación, los mejores resultados se obtuvieron con Scala, con un promedio de ataque del 20,8%, presentando significación con el resto de formulados, seguido por nobacil, a sus distintas dosis, con un promedio entre 23,8% y 24,2%. En cuanto a la eficacia Abbott se refiere, no existieron diferencias estadísticas entre nobacil y Scala con un promedio entre 53,1% y 45,5%.

A los 14 días después de la 5ª aplicación, no hubo diferencias estadísticas entre nobacil (3kg y 4 kg) y Scala a 1,5 litros, ni en porcentaje de frutos atacados ni en cuanto a la eficacia Abbott.

BIBLIOGRAFÍA

- JARVIS W.R. *Botrylotinia and Botrytis species. Taxonomy and pathogenicity.* Can Dep Agric. Monogr 15, Harrow, Ontario, Canada. 1977.
- COLEY-SMITH J.R., VERHOEFF K, JARVIS W.R. (Eds) *The biology of Botrytis.* Academic Press, London. 1980.
- MOVVAHEDI S, HEALE J.B. *The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of Botrytis cinerea Pers ex.* Pers. Physiol Mol Plant Pathol 1990b; 36: 303-324.
- MANSFIELD J.W. *Mechanisms of resistance to Botrytis.* En: The Biology of Botrytis. Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR.(Eds). Academic Press, London. 1980; pp. 181-218.
- ADRIAN, M., JEANDET, P., VENEAU, J., WESTON, L. A., and BESSIS, R. 1997. *Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against Botrytis cinerea, the causal agent for gray mold.* J. Chem. Ecol. 23:1689-1702.
- BAKER, C. J., and ORLANDI, E. W. 1995. *Active oxygen in plant pathogenesis.* Annu. Rev. Phytopathol. 33:299-321.