

## CONTROL BIOLÓGICO DEL MOHO AZUL (*PERONOSPORA TABACINA ADAM*) EN EL CULTIVO DEL TABACO (*NICOTIANA TABACUM L.*)

Marusia Stefanova Nalimova,<sup>1</sup> Felipe Rodríguez Maza,<sup>1</sup> Berta Lina Muiño García<sup>1</sup> y Pilar M. Villa Gómez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.<sup>a</sup> B y 5.<sup>a</sup> F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

<sup>2</sup> Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, Ciudad de La Habana

### RESUMEN

El moho azul (*Peronospora tabacina Adam*) es la enfermedad más importante del tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) en Cuba. En las variedades susceptibles se requieren hasta diez aplicaciones de fungicidas durante el cultivo, lo cual incide en el costo de producción y la contaminación ambiental. Con el propósito de introducir nuevas alternativas se evaluó la efectividad del producto biológico Gluticid, en ensayos realizados en el laboratorio y en condiciones de campo, en las provincias de Pinar del Río y La Habana. Los tratamientos semanales se iniciaron a partir de la aparición de los primeros síntomas, y la incidencia del moho azul se evaluó por la escala de Coresta. Con una aplicación del producto biológico a 200 ppm sobre plantas de tabaco en laboratorio, la infección por *P. tabacina* disminuyó en un 50% y más, en comparación con el testigo. Las parcelas protegidas con Gluticid a 0,09 kg/ha i.a. en Pinar del Río mostraron un índice de ataque del 5,1% y la variante de mancozeb 80 PH, del 5,8%, sin diferencia significativa entre los tratamientos. En la provincia de La Habana el producto aplicado a la misma dosis mantuvo la incidencia del moho azul en el 2,07%, y mostró una eficacia similar a la de mancozeb con el 2,04% de infección. Los resultados señalan la posibilidad de utilizar el producto biológico al igual que el mancozeb bajo una moderada incidencia de moho azul, dentro de la estrategia del manejo de la enfermedad.

Palabras claves: control biológico, *Peronospora tabacina*, tabaco

### ABSTRACT

Blue mold (*Peronospora tabacina Adam*) is considered the most important disease of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*), in Cuba. Susceptible varieties require up to ten fungicides applications during culture cycle, which inside on cost production and environmental contamination. In order to introduce new alternatives the effectivity of biological product Gluticid was evaluated, in laboratory and in field conditions in Pinar del Río and Havana provinces. Weekly treatments started since the appearance of the first symptoms and the incidence of the blue mold was evaluated by Coresta scale. *P. tabacina* infection diminished 50% or more in laboratory tobacco plants, with a single 200 ppm application of the biological product, compared with the control. Experimental fields protected with Gluticid at 0.09 kg/ha a.i. in Pinar del Río province showed an attack index of 5.1%, and mancozeb 80 PH variant showed 5.8%, without significant difference between treatments. Product applied in Havana province at similar dose maintained the incidence of blue mold in 2.07% and showed a similar effectiveness to mancozeb with 2.04% of infection. Results indicate the possibility of using biological product like mancozeb, under a moderate incidence of blue mold, within the management strategy of this disease.

Key words: biological control, *Peronospora tabacina*, tobacco

### INTRODUCCIÓN

Los hongos oomicetes causan alrededor del 20% de pérdidas anuales a nivel mundial [Lucas, 1998], y su control extensivo se basa fundamentalmente en el uso de fungicidas sintéticos [Knight *et al.*, 1997]. El moho azul (*Peronospora tabacina Adam*) está considerado entre las plagas de mayor importancia en el tabaco (*Nicotiana tabacum L.*), y constituye el principal problema fitosanitario del cultivo en América del Norte, América Central, Europa y Australia. La enfermedad se presenta de forma local o como epidemias de gran escala, durante períodos húmedos y fríos, que favorecen el de-

sarrollo del hongo, y los procesos de germinación e infección pueden ocurrir en un período de 2 a 4 h [Johnson, 1989; Main, 2006]. La patología se ha controlado exitosamente con fungicidas sistémicos como el metalaxyl; sin embargo, con el tiempo estos provocan el surgimiento de poblaciones resistentes al hongo [Lyr, 1995]. El empleo de diferentes fungicidas sistémicos y de contacto cada 5-7 días, durante el desarrollo del tabaco, para prevenir y controlar la enfermedad de carácter policíclica, representa una carga tóxica de consideración para el cultivo y el medio ambiente, que ha

motivado la realización de estudios para soluciones alternativas contra el moho azul.

Diversos estudios se han realizado con el propósito de proponer alternativas para el combate del moho azul mediante inoculaciones con el propio patógeno, aplicación en el suelo e inoculación en el tallo con esporangios del hongo que no tuvieron valor práctico; pero señalaron que la inducción de resistencia podría ser una alternativa futura para el control de la enfermedad [Mandryk, 1960; Cruickshank y Mandryk, 1960; Cohen y Kuc, 1981; Tuzun y Kuc, 1985]. En los últimos quince años numerosas investigaciones han demostrado la resistencia sistémica adquirida bajo tratamientos con rizobacterias en varios sistemas planta/patógeno [Ryals *et al.*, 1996], en el caso particular del tabaco, contra enfermedades bacterianas y virales [Maurhofer *et al.*, 1994; Maurhofer *et al.*, 1998; Park y Kloepper, 2000]. Zhang *et al.* (2002) evaluaron contra el moho azul, en condiciones de laboratorio e invernadero, las especies de rizobacterias *Serratia marcescens* 90-166, *Bacillus pumilus* SE34, *Pseudomonas fluorescens* 89B-61, *B. pumilus* T4 y *B. pasteurii* C-9 con comprobado efecto elicitor de la resistencia. Todas las cepas provocaron una reducción significativa de la esporulación de *P. tabacina*, y tres de ellas redujeron significativamente las lesiones de la enfermedad cuando se aplicaron en la superficie de las hojas. El biocontrol puede ocurrir incluso en la propia planta. Recientemente Shepherd *et al.* (2005) encontraron que la planta de tabaco biosintetiza una proteína, localizada en la superficie de las hojas, que inhibe las esporas y la infección por *P. tabacina*.

Las posibilidades de las rizobacterias como controladores biológicos de enfermedades se han estudiado en Cuba, y se ha obtenido el biofungicida Gluticid, de naturaleza bioquímica, a partir de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS, aislada del suelo [Villa *et al.*, 2002], cuyo efecto se ha demostrado contra fitopatógenos en tomate y papa, en condiciones de campo [Castellanos *et al.*, 2005; Rodríguez y Stefanova, 2005]. También se rea-

lizaron ensayos para evaluar la eficacia contra el moho azul, cuyos resultados se exponen en el presente trabajo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El efecto preventivo del producto se comprobó previamente en condiciones controladas, se asperjaron plantas de tabaco de la variedad Criollo, a concentraciones de 200 y 400 ppm, después las hojas se inocularon con una suspensión del hongo de  $5 \times 10^5$  esporangios/mm. El inóculo de *P. tabacina* se obtuvo de plantas de tabaco infectadas, con una esporulación fresca, de 7-8 días. Las plantas se colocaron en un ambiente húmedo, a temperatura de 20°C, con régimen de luz fluorescente durante el día y total oscuridad por la noche.

Los estudios en las condiciones del campo se realizaron en la provincia de Pinar del Río, municipio de San Juan y Martínez, sobre suelo ferralítico cuarzítico amarillo lixiviado, y en la provincia de La Habana, en la empresa tabacalera Lázaro Peña, sobre suelo ferralítico rojo. En Pinar del Río se empleó la variedad Criollo cultivada al sol, con una alta susceptibilidad a la enfermedad. Se utilizaron bloques al azar con parcelas de 14,4 m<sup>2</sup>, constituidas por cuatro surcos de 4 m de largo espaciados a 0,9 m con tres réplicas por variante. Para el ensayo, en el de La Habana se utilizó un diseño de parcelas grandes [CIBA-GEIGY, 1985] compuestas por 10 surcos de 20 m de largo, espaciados a 0,90 m con tabaco de la variedad Criollo-98. Las variantes utilizadas fueron Gluticid a 0,09 kg/ha i.a., Gluticid a 0,075 kg/ha i.a. y mancozeb a 2,4 kg/ha i.a. Los tratamientos se iniciaron a partir de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, con una periodicidad de siete días.

La incidencia de ataque del moho azul se evaluó por la escala de Coresta, la cual se basa en el grado de ataque, tipo de reacción y naturaleza del desarrollo del patógeno en el cultivo. El grado promedio de ataque se calculó por la fórmula:

$$\begin{array}{ccccccc} \text{Índice de} & & \text{Superficie ocupada} & & \text{Intensidad de} & & \text{Desarrollo} \\ \text{moho azul} & = & \text{por el parásito.} & \times & \text{esporulación o tipo} & + & \text{sistémico o} \\ & & \text{Grado de ataque} & & \text{de reacción} & & \text{naturaleza} \\ & & & & & & \text{del parásito} \end{array}$$

La intensidad de los síntomas está dada por un índice de 2-30, donde 2 representa planta sana y 30 totalmen-

te afectada por moho azul. Los datos obtenidos se transformaron a  $2 \arcsin \sqrt{\%}$ , y luego se sometieron al análisis

estadístico de varianza y la décima de comparación múltiple de medias de Newman-Keuls para  $p = 5\%$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las condiciones controladas de laboratorio, con una aplicación del producto biológico a 200 ppm, la infección en las plantas de tabaco por *P. tabacina* disminuyó en un 50% en comparación con el testigo. En el segundo ensayo se obtuvo una reducción mayor de la enfermedad por debajo del 50%. La eficacia resultó superior en la variante de 400 ppm del producto biológico (Fig. 1).

En el ensayo realizado en Pinar del Río el fungicida biológico aplicado a 0,09 kg/ha i.a. mostró un control similar al de mancozeb, y redujo el índice de ataque de *P. tabacina* sobre las plantas en un 2,06% con respecto al tratamiento con los fungicidas químicos metalaxyl + mancozeb. La reducción de la enfermedad con respecto al testigo fue del 7,2%. Los resultados de la última evaluación permitieron apreciar diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo (Tabla 1). En este ensayo existió una fuerte presión de inóculo, determinada por la presencia muy intensa de la enfermedad, con poblaciones de *P. tabacina* resistentes al metalaxyl.

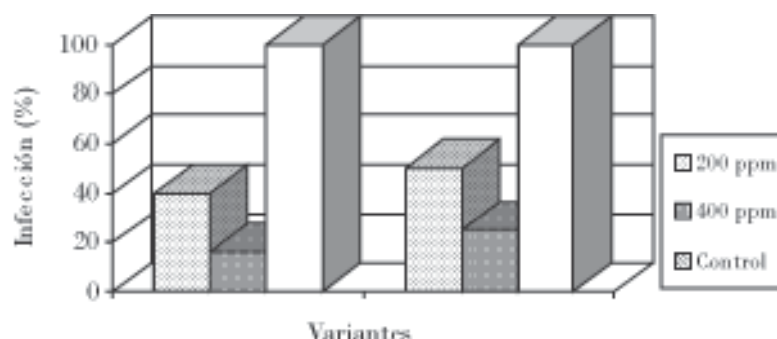


Figura 1. Efecto del biopreparado sobre *Peronospora tabacina* en condiciones de laboratorio.

Tabla 1. Eficacia del producto biológico en el control del moho azul en tabaco, var. Criollo (San Juan y Martínez, Pinar del Río)

Variantes	Dosis/ha (kg/ha i.a.)	Intervalo (días)	Índice de ataque (%)	
			17/2/97	24/2/97
Gluticid	0,09	7	4,79 abc	5,1 abcd
Mancozeb	2,4	7	5,54 abc	5,86 abcd
Metalaxyl + mancozeb	2,4 + 1,9	7	6,92 ab	7,16 bcd
Testigo	—	—	7,35 ab	12,3 a

En la empresa tabacalera Lázaro Peña, en la provincia de La Habana, los resultados de las evaluaciones realizadas a los 27, 33, 40 y 50 días del transplante del tabaco señalaron que Gluticid, a la dosis de 0,09 kg/ha i.a., y aplicado cada siete días, ofrece igual efecto de control sobre el moho azul, con un índice de infección del 2,75%, que el tratamiento estándar de mancozeb a la dosis de 2,4 kg/ha i.a., cuyo índice fue del 2,8%, con la misma

periodicidad de aplicación. Las parcelas tratadas con el fungicida biológico a dosis de 0,075 kg/ha i.a. presentaron una incidencia de moho azul mayor (3,05-4,1% de infección) (Tabla 2). En la Fig. 2 se refleja la dinámica del moho azul en los diferentes tratamientos, donde la enfermedad bajo el efecto de Gluticid a 0,09 kg/ha i.a. mostró un desarrollo e incidencia similar a las parcelas tratadas con mancozeb a 2,4 kg/ha i.a.

**Tabla 2. Efectividad de Gluticid en el control del moho azul en tabaco tapado (Empresa tabacalera Lázaro Peña, La Habana)**

Variantes	Dosis (kg/ha i.a.)	Índice de infección de moho azul (2-30)			
		Días de evaluación			
		27	33	40	50
Gluticid	0,075	2,0	2,0	3,05 b	4,1 a
Gluticid	0,09	2,0	2,0	2,07 a	2,75 b
Mancozeb	2,4	2,0	2,0	2,04 a	2,8 b
ES				0,55	0,21
CV				5,79	2,43

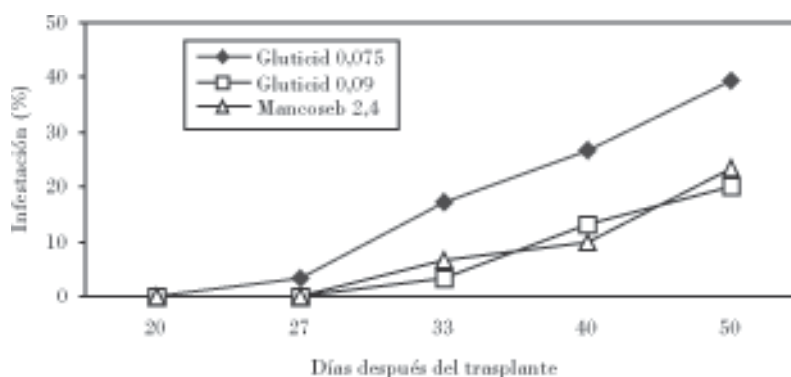


Figura 2. Dinámica del moho azul en los diferentes tratamientos.

A los 50 días de transplantado el cultivo se observó un incremento notable de la incidencia del moho azul, lo que obligó a realizar el tratamiento previsto con el fungicida sistémico dimetomorf + mancozeb, de acuerdo con la estrategia de control de la enfermedad establecida para las áreas de producción. No se observaron síntomas de fitotoxicidad en ninguno de los ensayos realizados con el producto biológico a las dosis estudiadas.

Las rizobacterias del género *Pseudomonas* producen diferentes metabolitos extracelulares, entre ellas sideróforos, diversos antifúngicos y ácido salicílico, entre otros, que contribuyen a la supresión de los fitopatógenos mediante la formación de quelatos de hierro que les confieren ventaja competitiva como agentes biocontroladores por la limitada suplementación de minerales esenciales en hábitats naturales, acción controladora y la elevación de la resistencia y la defensa de las plantas [Keel *et al.*, 1990; Maurhofer *et al.*, 1994; Thomashow y Weller, 1995; Wipps, 2001]. El ácido salicílico está estrechamente relacionado con la reacción de defensa y la resistencia de la planta [Ryals *et al.*, 1996]. Mediante aspersión foliar con ácido salicílico en hojas de tabaco, Cohen (1994) obtuvo una reducción

en un 74% de la esporulación de *P. tabacina*. El ácido salicílico inyectado en los peciolo de las hojas de tabaco desprendidas produjo una reducción del 85% de las lesiones y del 80% de la esporulación por el moho azul en comparación con el testigo [Zhang *et al.*, 2002].

El biofungicida Gluticid, libre de células bacterianas, se obtiene mediante procedimiento biotecnológico y contiene metabolitos bioactivos tales como sideróforos (pioverdín Tipo II), antifúngicos de naturaleza fenólica y ácido salicílico. Este último alcanza concentraciones entre 100 y 300 mg/kg en el producto final, y entre 30 y 100 mg/kg el pioverdín [Villa, 1999; Villa *et al.*, 2002], hecho que explica la eficacia del producto biológico contra el moho azul en los ensayos de laboratorio y campo.

En Cuba el moho azul es la plaga económicamente más importante, tanto en el semillero como en plantación, con pérdidas que ascienden en ocasiones a millones de pesos [Muñoz, 1999]. Durante los primeros estadios de desarrollo del cultivo –0-40 días después del trasplante– se requiere el uso de tratamientos preventivos de fungicidas debido a que los mecanismos de resistencia de la planta de tabaco contra el moho azul se encuentran inhibidos. En las variedades susceptibles se



requieren entre ocho y diez aplicaciones de fungicidas durante el ciclo del cultivo [CNSV, 2001], lo que incide notablemente en los costos de producción del tabaco y en la contaminación ambiental.

Las estrategias actuales de manejo del moho azul incluyen diferentes medidas, donde los tratamientos preventivos con químicos a base de cobre ocupan un lugar primordial [Ivers *et al.*, 2006]. El empleo alternado de fungicidas sitúa al mancozeb entre los productos de protección efectivos contra el moho azul [Shoemaker y Main, 1990; Lyr, 1995; Ivers *et al.*, 2006]. Para el control de la enfermedad en Cuba se utilizan fungicidas sistémicos y de contacto solos o en mezclas, para prevenir y retardar la aparición de poblaciones resistentes del hongo, y es mancozeb el fungicida de contacto más utilizado, en mezclas o en tratamientos de alternancia [Muiño, 1999]. Los resultados de este estudio sugieren que Gluticid puede también incluirse en esta estrategia para disminuir la carga tóxica al cultivo y por ende la contaminación ambiental.

## CONCLUSIONES

- El producto biológico Gluticid aplicado cada siete días a la dosis de 0,09 kg/ha i.a. mostró efectividad sobre el moho azul, y tuvo efecto de control igual que el obtenido con el fungicida estándar mancozeb en condiciones de campo.
- Puede utilizarse igual que el producto químico, en las primeras fases de desarrollo de las plantas, bajo una moderada incidencia del moho azul, en una estrategia de uso de los fungicidas, dentro del manejo integrado del cultivo.

## REFERENCIAS

Castellanos, L.; M. Stefanova; P. Villa; I. Irimia; M. Gonzalez; M. E. Lorenzo: «Ensayos con el producto biológico Gluticid para el control de *Alternaria solani* y *Cladosporium fulvum* en el tomate en casas de cultivo protegido», *Fitosanidad* 9 (2) 39-43, 2005.

CIBA-GEIGY: *Manual para ensayos de campo en protección*, CIBA-GEIGY, Switzerland, 1985.

CNSV: «Programa de defensa para el cultivo del tabaco», Centro Nacional de Sanidad Vegetal, Minagri, La Habana, 2001.

Cohen, Y.; J. Kuc: «Evaluation of Systemic Resistance to Blue Mold Induced in Tobacco Leaves by Prior Stem Inoculation with *Peronospora tabacina*», *Phytopathology* 71:783-787, 1981.

Cohen, Y.: «3-Aminobutyric Acid Induces Systemic Resistance Against *Peronospora tabacina*», *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44:273-288, 1994.

Cruickshank, I. A. M.; M. Mandryk: «The Effect of Stem Injection of Tobacco with *Peronospora tabacina* on Foliage Reaction to Blue Mold», *J. Aust. Inst. Agric. Res.* 26:369-372, 1960.

Ivers, K. L.; K. Seebold; C. S. Johnson; A. Mila: «Blue Mold Control Recommendations Blue mold Control Plan», [http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/bluemold/control\\_2006.php](http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/bluemold/control_2006.php).

Johnson, U. I.: «*Peronospora hyoscyami* de Bary: Taxonomic History, Strains and Host Range», *Blue Mold of Tobacco*, APS Press, St. Paul, MN, 1989, pp. 1-18.

Keel, C.; P. H. Wirthner; T. H. Oberhansli; C. Voisard; D. Burger; G. Défago: «Pseudomonads as Antagonists of Plant Pathogens in the Rhizosphere: Role of the Antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol in the Suppression of Black Root of Tobacco», *Symbiosis* 9:327-341, 1990.

Knight, S. C.; V. M. Anthony; A. M. Brady; A. J. Greenland; S. P. Heaney; D. C. Murray; K. A. Powell; M. A. Schulz; C. A. Spinks; P. A. Worthington; D. Youle: «Rationale and Perspectives on the Development of Fungicides», *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:349-372, 1997.

Lucas, J. A.: *Plant Pathology and Plant Pathogens*, Blackwell Science, Oxford, Inglaterra, 1998.

Lyr, H.: *Modern Selective Fungicide*, Jena, Alemania, 1995.

Main, C. E.: «The Blue Mold Disease of Tobacco Department of Plant Pathology, N.C. State University Raleigh, NC 27695, <http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/bluemold/thedisease.php>, agosto, 2006.

Mandryk, M.: «Host Pathogen Relationship in Tobacco Plants, Which Were Stem Injected with *Peronospora tabacina*», *J. Aust. Agric. Res.* 11:16-26, 1960.

Maurhofer, M.; C. Hase; P. Meuwly; J. P. Metraux; G. Defago: «Induction of Systemic Resistance of Tobacco to Tobacco Necrosis Virus by the Root-Colonizing *Pseudomonas fluorescens* Strain CHAO: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production», *Phytopathology* 84:139-146, 1994.

Maurhofer, M.; C. Reimann; P. Schmidli-Sacherer; S. Heeb; D. Haas; G. Défago: «Salicylic Acid Biosynthesis Genes Expressed in *Pseudomonas fluorescens* Strain P3 Improve the Induction of Systemic Resistance in Tobacco Against Tobacco Necrosis Virus », *Phytopathology* 88:678-684, 1998.

Muiño, Berta L.: «Manejo de la resistencia a las fenilamidas en especies de Oomycetes en Cuba», *Boletín Técnico Cidisav* 5 (3):53, noviembre, 1999.

Park, K. S.; J. W. Kloepper: «Activation of PR-1a Promoter by Rhizobacteria Which Induce Systemic Resistance in Tobacco Against *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*», *Biol. Control* 18:2-9, 2000.

Rodríguez, F. M.; M. Stefanova: «Control biológico del tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer) en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en condiciones de campo», *Fitosanidad* 9 (4):35-37, 2005.

Ryals, J. A.; U. H. Neuenschwander; M. G. Willits; A. Molina; H. Y. Steiner; M. D. Hunt: «Systemic acquired resistance», *Plant Cell* 8:1809-1819, 1996.

Shepherd, R. W.; W. T. Bass; R. L. Houtz; G. J. Wagner: «Phylloplanins of Tobacco Are Defensive Proteins Deployed on Aerial Surfaces by Short Glandular Trichomes», *The Plant Cell* 17:1851-1861, 2005.

Shoemaker P. B.; C. E. Main: «Fungicide Evaluation and Control Strategies in North America», *Blue Mold Disease of Tobacco*, 1990, pp. 131-146.

Thomashow, L. S.; D. M. Weller: «Current Concepts in the Use of Introduced Bacteria for Biological Disease Control: Mechanisms and Antifungal Metabolites», *Plant Microbe Interactions*, vol 1 G, Chapman and Hall, Nueva York, 1995, pp. 187-235.

Tuzun, S.; J. Kuc: «A Modified Technique for Inducing Systemic Resistance to Blue Mold and Increasing Growth in Tobacco», *Phytopathology* 75:1127-1129, 1985.

Villa, P.: «Producción de metabolitos a partir de *Pseudomonas* fluorescentes para su uso en el control biológico de hongos

### *Stefanova y otros*

- fitopatógenos». Tesis para optar por el título de Maestro en Microbiología, Universidad de La Habana, 1999, pp. 1-60.
- Villa, P.; M. E. Díaz de Villegas; M. Stefanova; G. Michelena; J. Rodríguez; I. Gutiérrez; A. Frias: «Procedimiento de obtención de metabolitos antifúngicos de *Pseudomonas aeruginosa*, PSS por vía biotecnológica», Patente: Certificado # 22 805, CI no. 1079/ 2002, 18 de abril, 2002.
- Villa, P.; M. Stefanova; L. Castellanos: «Metabolitos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS para el control de los hongos *Alternaria solani* y *Cladosporium fulvum* en tomate (*Lycopersicon esculentum*)», *Revista Biotecnología*, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. 9 (2):32-37, 2005.
- Wipps, J. M.: «Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere», *J. Exp.Bot.* 52:487-511, 2001.
- Zhang, Shan'an; M. S. Reddy; J. W. Klopfer: «Development of Assays for Assessing Induced Systemic Resistance by Plant Promoting Rhizobacteria Against Blue Mold of Tobacco», *Biological Control* 23:79-86, 2002.