



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Trabajo Final de carrera

Expediente 200-3125/17

**TRATAMIENTOS NO CONVENCIONALES PARA EL
CONTROL DE *Nacobbus aberrans* EN ACELGA**

Rípodas, Juan Ignacio

N° de legajo: 26348/8

locatellicondor@gmail.com

Tel. 0221-15-5432815

Director: Ing. Agr. Mg. Sc. Sebastián Garita

sebastiangarita@hotmail.com

Codirector: Ing. Agr. Mg. Sc. María Cecilia Arango

mcecilia_arango@hotmail.com.ar

Índice

Resumen	3
Introducción	4
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Materiales y métodos	
- Extracción de aceites esenciales	11
- Otros productos utilizados	11
- Diseño experimental	12
- Tratamientos aplicados en los distintos ensayos	13
- Evaluación de la actividad nematocida de los aceites esenciales	13
- Evaluación de los distintos tratamientos sobre germinación y emergencia	14
- Ensayo a campo	15
- Parámetros evaluados a lo largo de Trabajo Final	16
Resultados y discusión	18
Conclusiones	25
Bibliografía	26

Resumen

En las últimas décadas el Cinturón Hortícola Platense ha adoptado el modelo de producción bajo invernáculo, acompañado por el riego localizado, empleo de variedades hortícolas mejoradas, fertilizantes y agroquímicos. La aplicación inadecuada de estas tecnologías ha afectado la capacidad productiva de los suelos. En estos sistemas hortícolas intensivos, se requiere aplicar métodos de control para disminuir la población de adversidades bióticas a niveles de daño económicamente aceptables, siendo la más empleada el control químico, particularmente la fumigación con bromuro de metilo. La suspensión de este fumigante trajo aparejada la reaparición de importantes adversidades bióticas para los cultivos de la región, como los nematodos fitoparásitos, destacando así la importancia de rediseñar programas de manejo integrados. El nematodo de suelo *Nacobbus aberrans*, constituye una de las adversidades bióticas más importantes en los cultivos bajo cubierta del Cinturón Hortícola Platense provocando anualmente importantes pérdidas económicas en la región. El presente trabajo tiene como objetivo disminuir la población de *N. aberrans* en cultivos hortícolas de invierno, para que los cultivos de primavera-verano, de mayor susceptibilidad al patógeno, inicien su ciclo con una población menor del nematodo. Para ello se evaluó el efecto de la aplicación *in vitro* de aceites esenciales sobre estadios juveniles de nematodos, por aplicación directa y por aplicación en muestras de suelo, como así también la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares sobre la multiplicación del *N. aberrans* en un cultivo de acelga. Los resultados preliminares demostraron que la acelga no es una especie micorrizable por el hongo *Funneliformis mosseae*. El empleo de los aceites esenciales (AE) evaluados, en las concentraciones utilizadas, no presenta efectos fitotóxicos y contribuyen a disminuir la población de este nematodo en el suelo. Es por ello que esta práctica puede ser considerada una alternativa válida dentro de un plan integrado de manejo.

Introducción

En las últimas décadas los sistemas de producción hortícola se han modificado considerablemente. La incorporación de invernaderos para cultivo bajo cubierta fue uno de los cambios más destacados, el cual fue acompañado por el riego localizado, el uso de cultivares mejorados e híbridos, fertilizantes y agroquímicos, siendo estos últimos los principales responsables de los problemas socioambientales de la horticultura bonaerense (Bocer, 2002; Souza Casadinho & Bocero, 2008). El Cinturón Hortícola de La Plata constituye el área productiva más importante del Cinturón Verde Bonaerense con el 46,15% de la superficie productiva total y el 25,15% de la superficie hortícola total. Las especies más importantes son la lechuga, el tomate y el pimiento (García, 2012). Para el caso particular de la acelga se estima una superficie de 45 has cultivadas en invernáculo y 353 has cultivadas a campo (CFHB, 2005).

Aplicar métodos de control para disminuir la población de adversidades bióticas a niveles de daño económicamente aceptables, es una práctica de manejo casi obligada en los sistemas intensivos hortícolas actuales, debido a las altas poblaciones presentes en los invernáculos y el monocultivo. Existen numerosas herramientas para llevar adelante esta práctica. Sin embargo, la más adoptada por los productores a nivel mundial ha sido el control químico. Para el caso de patógenos de suelo durante muchos años tuvo gran difusión la fumigación con bromuro de metilo.

Este producto es un gas que destruye la capa de ozono a un ritmo 50 veces superior que los clorofluorocarbonos (CFCs), y es muy peligroso para la salud de los trabajadores que lo manipulan (SENASA, 2006). Nuestro país ha adherido a distintos protocolos internacionales y actualmente su uso se encuentra prohibido. Sólo en casos particulares y para usos específicos se permite su utilización con autorización previa y

bajo declaración jurada. Se pretende hacer un listado de los productores que usarán la sustancia, pero en el 2020 ya dejaría de aplicarse definitivamente.

La suspensión de este fumigante trajo aparejada la reaparición de importantes plagas y enfermedades para los cultivos de la región, como los nematodos fitoparásitos, destacando así la importancia de rediseñar programas de manejo integrados.

El nematodo de suelo *Nacobbus aberrans* (Thorne & Allen) constituye una de las adversidades bióticas más importantes en los cultivos bajo cubierta del Cinturón Hortícola Platense, provocando anualmente importantes pérdidas económicas en la región ya sea por la disminución en el rendimiento, o por el elevado costo de los fumigantes aplicados al suelo. Los datos formales sobre el daño económico causado por este nematodo son escasos. Un informe de INTA-Mar del Plata indica que los daños en tomate y pimiento bajo cubierta alcanzan el 40 % (Adlercreutz et al., 2007) e investigadores mexicanos indican, en tomate, mermas del 80 % (Cristóbal et al., 2006) y hasta la pérdida total del cultivo (Manzanilla-López et al., 2002). Esta especie reúne una serie de características que la hacen diferente de otros nematodos del suelo; se destacan su polifagia, un elevado potencial reproductivo y una notable capacidad de adaptación, motivos por los que se encuentra ampliamente distribuido, abarcando diferentes regiones geográficas de nuestro país (Doucet & Lax, 2005).

En las raíces de las plantas afectadas por *N. aberrans* se observa la presencia de agallas que se extienden a lo largo de la raíz (Manzanilla-López et al., 2002). *Fotografía propia.*



A nivel celular, se han registrado alteraciones de la apariencia y fisiología de las células que corresponden a respuestas de hiperplasia e hipertrofia (Hewezi & Baum, 2013). Estas alteraciones provocadas por las agallas derivan en la ruptura del xilema y el floema. Como consecuencia de esto se reduce el flujo de sustancias a través de los tejidos de conducción y las plantas sufren marchitamiento, deficiencia en la absorción de Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio, disminución de la conductancia estomática y en consecuencia baja asimilación de CO₂, retraso del crecimiento, pérdidas de rendimiento e incluso la muerte de la planta (Castillo & Marbán-Mendoza, 1984; Inserra et al., 1985).

Entre las prácticas de bajo impacto ambiental utilizadas para el manejo de nematodos endoparásitos se destacan el uso de agentes biológicos, como la inoculación con hongos nematófagos y micorrizas arbusculares (Puertas et al., 2006), la solarización (Alcoser et al., 2006), la incorporación de enmiendas orgánicas biofumigantes (Bongiorno et al., 2009) y la aplicación de aceites esenciales (Gupta et al., 2011).

Las micorrizas arbusculares son asociaciones simbióticas entre las raíces de las plantas y hongos del género *Glomeromycota* (Ruiz Sánchez et al., 2011). Las hifas

de este hongo crecen intracelularmente y se extienden también por fuera del tejido vegetal sobrepasando la región de la rizósfera y permitiendo una mayor exploración del suelo. Esta simbiosis proporciona a las plantas micorrizadas una serie de beneficios que les permiten tener un mejor desempeño en situaciones de estreses bióticos y abióticos. Diversos estudios evidencian que la simbiosis micorrícica aumenta la absorción de agua y nutrientes, incrementando así la tolerancia al estrés hídrico y nutricional (Ruscitti et al., 2015). También ha sido documentado que esta asociación mejora la tolerancia al estrés causado por salinidad, metales pesados (Ruscitti et al., 2011; 2017), y herbicidas (Ronco et al., 2008).

Muchos compuestos orgánicos presentes en las plantas han demostrado tener una fuerte actividad biocida contra los patógenos del suelo y las plagas. Entre ellos se encuentran los aceites esenciales sintetizados por plantas aromáticas.

Las plantas aromáticas se definen como aquellas que pueden generar por algún proceso fisicoquímico un producto con olor o sabor determinado, independientemente de su calidad comercial o estética (Bandoni, 2002). Estas especies vegetales son utilizadas a nivel comercial o industrial como material vivo, fresco o desecado o para la obtención de extractivos y aceites esenciales debido a sus características organolépticas, que otorgan aromas, colores y sabores característicos a los alimentos (Bandoni, 2002).

Los aceites esenciales, son líquidos oleosos, aromáticos, pertenecientes al metabolismo secundario de las plantas, formados por una mezcla de diversos compuestos químicos de estructuras diferentes, entre los que se incluyen algunos terpenoides (principalmente sesquiterpenos y monoterpenos). En su composición también se encuentran compuestos aromáticos derivados de fenoles, alcoholes simples, cetonas y otras moléculas alifáticas (Ringuelet & Viña, 2013). Se caracterizan por ser arrastrables por vapor de agua y se obtienen a partir de distintos materiales

vegetales, tales como flores, yemas, semillas, hojas, brotes, corteza, madera, frutos, raíces, etc. (Ringuelet, 2013). Entre las familias botánicas que presentan especies que producen aceites esenciales se encuentran las *Asteraceae* (o *Compositae*), *Labiatae*, *Umbeliferae*, *Mirtaceae*, *Rutaceae* y *Lauraceae*. Los aceites esenciales se destinan principalmente a la industria perfumística. Muchos de ellos, o alguno de sus componentes, presentan propiedades antimicrobianas e insecticidas (Burt, 2004). Dichos compuestos naturales son de baja toxicidad para mamíferos, biodegradables y no persistentes. Por lo tanto, resultan adecuados para un control amigable con el medio ambiente (Kimpinski et al., 2000).

Diversos estudios han informado que los componentes volátiles de los aceites esenciales tienen acción nematocida (Isman, 2000; Pandey, 2000; Barbosa et al., 2010; Oka, 2012). Entre las especies promisorias se destaca la utilización de plantas del género *Tagetes* (*Asteraceae*), el cual ha sido reconocido por producir compuestos nematocidas como e-tagetona, cis-ocimeno, dihidrotagetona, entre otros (Ploeg, 2000; Kimpinski et al., 2000). También se ha ensayado la aplicación de AE de especies del género *Eucalyptus*. En un cultivo de tomate la aplicación de AE de *E. globulus*, *E. citriodora*, *Ruta graveolens* y *Mentha piperita* redujeron significativamente la multiplicación y formación de agallas de *Meloidogyne incognita*, en las raíces (Laquale et al., 2015). Diversos estudios determinaron que el mecanismo de acción de los AE frente a hongos, bacterias y otros microorganismos ocurre a nivel celular, afectando la membrana plasmática, volviéndola permeable y susceptible a otros componentes más tóxicos. Además, dependiendo de la dosis de exposición, los aceites esenciales interfieren en la respiración celular pudiendo provocar lisis celular (Pérez, 2012).

Características de las especies aromáticas utilizadas para la obtención de los aceites esenciales aplicados en el ensayo.

El *Eucalyptus globulus* pertenece a la familia *Myrtaceae*. Es uno de los árboles de más rápido crecimiento en el mundo y alcanza a veces una altura de 100 m. Sus hojas poseen glándulas que segregan aceites esenciales los cuales producen su olor característico. El componente clave de las hojas de



eucalipto es un terpenoide volátil conocido como eucaliptol (1,8-cineol) encontrado con la más alta proporción (70% como mínimo). Los aceites esenciales de *Eucalyptus* se conocen desde hace cientos de años como antibacterianos, antifúngicos y antisépticos naturales y se utilizan como repelentes de insectos y como pesticidas (Barton, 2000).

La *Mentha x piperita* L. (familia *Lamiaceae*), conocida como menta inglesa, es producto de hibridaciones espontáneas (cruzamientos entre individuos) y luego multiplicada en forma vegetativa, siendo una de las especies de menta más cultivadas en Argentina (Bandoni, 2002). El valor comercial de



esta especie está dado por su aceite esencial, cuyos componentes mayoritarios son el mentol y mentona. Esta esencia es utilizada en la industria alimenticia, para la fabricación de licores y golosinas, para dar el sabor conocido como “peppermint” y en la industria perfumística. También se comercializan sus hojas desecadas, utilizadas para infusiones y sus hojas frescas con aplicaciones culinarias. Entre sus propiedades medicinales, se destaca por sus capacidades estimulante, antisépticas y analgésicas (Alippi et al., 1996, Sánchez, 1996).

El laurel (*Laurus nobilis* L.) pertenece a la familia *Lauraceae*, es un árbol de hoja perenne de hasta 20 metros de altura, nativo de la región del Mediterráneo. Esta planta es utilizada extensivamente en la industria alimenticia, así como en la elaboración de medicamentos y cosméticos.



Las hojas secas y su aceite esencial son usados extensivamente en la alimentación como condimento, debido a su sabor y aroma, y como conservante por sus propiedades antimicrobianas e insecticidas. Entre los componentes mayoritarios encontrados en el laurel se encuentran el 1,8-cineol (29,3%) y el linalol (31,3%) (Ringuelet et. al 2012).

Objetivo general

Disminuir la población de *Nacobbus aberrans* en cultivos hortícolas de invierno, para que los cultivos de primavera-verano, de mayor susceptibilidad al patógeno, inicien su ciclo con una población menor del nematodo.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la aplicación in-vitro de AE sobre estadios juveniles de nematodos, por aplicación directa y por aplicación en muestras de suelo.
2. Evaluar el efecto de la aplicación de AE y de la inoculación con hongos micorrizicos arbusculares sobre la multiplicación de *Nacobbus aberrans* en un cultivo de acelga bajo cubierta.
3. Determinar el efecto de la aplicación de AE en la germinación, emergencia, crecimiento y rendimiento de acelga.

Materiales y métodos

Extracción de aceites esenciales

La extracción de aceites esenciales (AE) se realizó por hidrodestilación, en el laboratorio de Bioquímica y Fitoquímica (FCAyF-UNLP), utilizando un destilador a escala de laboratorio.

Se recolectaron hojas de: *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Mentha x piperita* (menta inglesa) y *Laurus nobilis* (laurel), las cuales fueron sometidas a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 72 horas. Muestras de 100 g de cada una de las especies fueron colocadas en un balón con agua destilada para proceder a la extracción de los aceites esenciales. Los



mismos fueron capturados en una trampa tipo Clevenger para ser separados de la fracción acuosa.

Otros productos utilizados:

- Abamectina: insecticida, acaricida y antihelmíntico de acción translaminar ampliamente utilizado en la agricultura. Abamectina es una mezcla de avermectinas que contiene más del 80% de avermectina B1a y el resto de avermectina B1b. Estos dos compuestos B1a y B1b tienen propiedades toxicológicas parecidas. La avermectina es un derivado de compuestos obtenidos por fermentaciones en laboratorio de la bacteria del suelo *Streptomyces avermitilis*. La abamectina es el producto de la fermentación natural de esta bacteria.

- Dioctil sulfosuccinato (Tensioactivo comercial): este producto ha sido utilizado como alternativa a los acaricidas convencionales por su reducido impacto en el medio ambiente, enemigos naturales y bajo costo, como alternativa de manejo en la producción integrada. Sin embargo, puede generar casos de fitotoxicidad en algunas especies vegetales, dependiendo de la concentración utilizada (Curkovic & Araya, 2004).
- Saponinas (QL Agri®): glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman espuma cuando se las agita en agua. Actualmente se están utilizando como nematocidas, acaricidas e insecticidas. Por ser productos naturales se los recomienda en programas de manejo integrado.

Diseño experimental

- El análisis estadístico de las pruebas *in vitro* se realizó por ANOVA simple con 3 repeticiones por tratamiento.
- Para el ensayo a campo, el diseño experimental se realizó siguiendo un diseño de bloques completos al azar, con 3 bloques y 8 plantas en cada uno de los tratamientos.
- En todos los casos, las medias se compararon por el test de LSD ($p < 0,05$), utilizando el programa InfoStat.

Tratamientos aplicados en los distintos ensayos

1. Agua (Testigo)
2. Micorrización (Solo en el ensayo a campo)
3. AE de *Eucalyptus globulus*, 1,25 μL de AE. mL^{-1} .
4. AE de *Laurus nobilis*, 1,25 μL de AE. mL^{-1} .
5. AE de *Mentha x piperita*, 1,25 μL de AE. mL^{-1} .
6. Saponinas extraídas de *Gleditsia amorphoides* 5000 ppm
7. Avermectina A1, 216 ppm
8. Dioctil sulfosuccinato 0,2 ppm

En la preparación de los AE se utilizó Tween-20 al 0,5% (v/v) para facilitar la homogenización del AE (compuesto hidrofóbico) en agua.

Evaluación de la actividad nematicida de los aceites esenciales

Se utilizaron los AE en una concentración de 125 μL de AE en 100mL de solución acuosa de tween al 0,5% para verificar su efecto en las formas móviles de nematodos de suelo. Para ello, se aplicaron las mismas soluciones en dos situaciones:

- a) Aplicaciones sobre muestras de suelo conteniendo formas juveniles de distintos nematodos, realizando una posterior extracción de nematodos vivos.
- b) Aplicación directa de las soluciones sobre formas juveniles contenidas en tubos de ensayo.

Para el primer caso se utilizaron muestras de 100 cm^3 suelo previamente tamizadas, y colocadas en pequeños recipientes. El suelo fue humedecido hasta capacidad de campo con las soluciones e incubado por 24 horas a 26° C. Luego de la incubación las muestras se colocaron en embudos Baermann para la extracción de las formas móviles vivas. Luego de 24 horas de permanencia de las muestras en los embudos, se

recolectó el filtrado y utilizando instrumental óptico se contabilizó el número de nematodos vivos.

Para la aplicación directa de las soluciones sobre las formas móviles, fueron colocados 100 individuos en estadio juvenil de distintos nematodos de suelo en tubos Eppendorf a los cuales se les adicionó cada una de las soluciones evaluadas. Al cabo de 24 horas de incubación se contabilizó el número de nematodos móviles e inmóviles de cada tratamiento.

Evaluación de los distintos tratamientos sobre la germinación y emergencia de plántulas de acelga

Para determinar si los AE tenían algún efecto estimulador o inhibidor de la germinación de acelga se colocaron 20 semillas de acelga (*Beta vulgaris* var. cicla L.) en cajas de Petri, sobre papel de filtro y se humedecieron con 5 ml de cada una de las soluciones mencionadas anteriormente. Las cajas se sellaron con film y se incubaron en estufa de germinación a una temperatura de 28°C. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento y, transcurridos 10 días, se evaluó el porcentaje de germinación.

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la emergencia de las plántulas de acelga se utilizaron macetas de 0,5 kg de capacidad con tierra tinalizada donde se sembraron 10 semillas de acelga. Las macetas fueron regadas con las soluciones correspondientes a los distintos tratamientos, y colocadas en cámara de crecimiento a 28 °C. De cada tratamiento se realizaron 3 macetas y a los 15 días se cuantificó el porcentaje de emergencia.

Ensayo a campo

El ensayo se llevó a cabo en la Estación Experimental J.J. Hirschhorn (34° 51 lat. sur; 57° 53 long. oeste), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, ubicada en la localidad de Los Hornos, partido de La Plata. Plantines de acelga de la “variedad Fordhook” fueron trasplantados en un invernáculo tipo capilla infestado con *Nacobbus aberrans*. Para el ensayo se tomaron tres lomos o surcos y en cada uno de ellos se realizaron dos líneas de plantas, separándose 20 cm entre líneas y 60 cm entre plantas (Figura 1).

Figura 1: Implantación de cultivo de acelga en Estación Experimental J.J Hirschhorn.



Fotografía propia.

A partir del momento del trasplante, cada 20 días, se aplicaron en *drench* (riego dirigido al cuello de la planta) 200 mL por planta de las siguientes soluciones:

1. Agua (Testigo)
2. 50 g de inóculo micorrícico por planta.
3. Aceite esencial de *Eucaliptus globulus* 250 μ L de AE en 200mL
4. Aceite esencial de *Laurus nobilis* 250 μ L de AE en 200mL
5. Aceite esencial de *Mentha x piperita* 250 μ L de AE en 200mL
6. Saponinas extraídas de *Gleditsia amorphoides* 5000 ppm
7. Avermectina A1, 216 ppm
8. Diocetil sulfosuccinato 0,2 ppm

Para el tratamiento “micorrización”, la siembra de la acelga se realizó incorporando en el *speedling*, 40-60 esporas por celda del hongo micorrícico *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd), multiplicado en cámara de cultivo en las instalaciones del Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) (Colección Instituto Spegazzini, UNLP).

Parámetros evaluados a lo largo de Trabajo Final

- Rendimiento en aceite del material vegetal utilizado.
- Evaluación del porcentaje de micorrización
- Porcentaje de germinación de semillas de acelga en cajas de Petri.
- Porcentaje de emergencia de acelga en contenedores de 0,5 kg
- Porcentaje de sobrevivencia de formas juveniles de nematodos
- Infestación inicial: Previo a la implantación del cultivo se realizará un muestreo de suelo del invernáculo para confirmar y cuantificar la infestación por *N.*

aberrans. Para ello las muestras de suelo se procesaron según la técnica de tamizado, centrifugación y flotación indicada por Coolen, (1979).

- *Tinción de raíces de tratamientos inoculados con F. mosseae*

Se seleccionaron en forma aleatoria fracciones de raíces no lignificadas y se procedió a clarificar y teñir según la técnica de Phillips & Hayman (1970). Las raíces se aclararon con KOH al 10% (p/v) (10 min, 100°C). Luego se lavaron tres veces con agua y se aplicó una solución de HCl 0,1N (5 min a temperatura ambiente). Finalmente se tiñeron con azul de tripán (5 min a 95°C). El colorante tiñe de color azul las estructuras del hongo que contienen quitina, principal componente de las paredes celulares de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA). Luego las raíces se conservaron en una solución de lacto-fenol.

- *Porcentaje de micorrización de las raíces teñidas*

La infectividad micorrícica se evaluó a través de la colonización fúngica según Trouvelot et al. (1986) y se expresó como porcentaje de micorrización (M%).

Fragmentos de raíces teñidas, de aproximadamente 1cm de longitud, se montaron en portaobjetos añadiendo gotas de ácido láctico y se cubrieron con un cubreobjeto observándose al microscopio óptico. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, cada una de 10 fragmentos de raíz. Se observó la presencia de campos negativos (sin presencia de estructuras fúngicas) y positivos (con presencia de estructuras fúngicas).

- *Peso Fresco y área foliar*. Las hojas que alcanzaron tamaño comercial fueron cortadas y se determinó el peso fresco y área foliar, utilizando un medidor de área foliar (LICOR, Li 3000 Lincoln, NE, EE. UU.).

- *Número de huevos de nematodo*: Al finalizar el ensayo las plantas fueron descalzadas, se lavaron las raíces y se extrajeron los huevos del nematodo según la técnica de tamizado, centrifugación y flotación (Coolen, 1979). Las raíces se licuaron a máxima velocidad, durante 30 segundos, en una solución

de hipoclorito de sodio al 0,5%. La mezcla obtenida fue tamizada sobre una malla de 35 micrones y lo recolectado del tamiz fue centrifugado con caolín a 1000g durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido con una solución de sacarosa (484 g.L⁻¹) centrifugando durante 2 minutos a 1000×g. El sobrenadante se depositó sobre un tamiz de 35 micrones y fue lavado con agua corriente para retirar la sacarosa. Finalmente se cuantificó el número de huevos por observación microscópica.

Resultados y discusión

Para confirmar la infestación de *Nacobbus aberrans* en el invernáculo se realizó un muestreo en “zig-zag” para la elaboración de una muestra compuesta. Luego de realizada la extracción por el método de centrifugación y flotación, y su posterior observación en el microscopio, se determinó una carga de 6 juveniles.100 g suelo⁻¹. Para los nematodos agalladores en cultivos hortícolas, cargas iniciales superiores a los 2 juveniles en 100 mL de suelo, es considerado una carga alta, que requiere algún tipo de práctica de control (Figura 2).

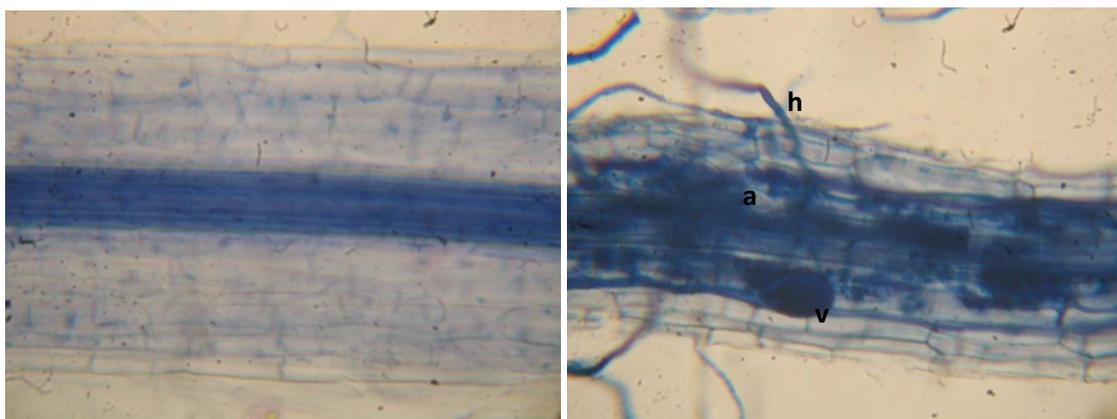
Figura 2. Juvenil de *Nacobbus aberrans* recolectado en Estación Experimental J.J. Hirschhorn.



Fotografía propia

Previo al trasplante, se realizó una tinción de las raíces de los plantines de acelga que habían sido inoculados con el hongo micorrícico y no se observaron estructuras fúngicas dentro de las raíces (Figura 3).

Figura 3. Raíz de acelga no micorrizada (Izquierda) y Raíz de tomate con estructuras fúngicas en su interior (a: arbuscúlos; h: hifa; v: vesícula)



Fuente: imágenes propias

Si bien el 97% de las plantas terrestres son micorrizables, existe un pequeño número de plantas que no realizan esta simbiosis. Algunos autores incluyen en este grupo a la acelga y otras especies de la familia *Chenopodiaceae*. El motivo por el cual no se desarrolla esta simbiosis no está del todo esclarecido, pero algunos trabajos sugieren que en estas plantas no están presentes algunos genes que median en la comunicación con el hongo (Harley & Harley, 1987; Smith & Read, 1997). Por no estar micorrizadas las plantas, al comenzar el ensayo, este tratamiento fue descartado, y por esta razón no se analizaron los parámetros correspondientes.

El rendimiento de la extracción de los aceites esenciales de las especies ensayadas arrojó los siguientes resultados: *Eucaliptus globulus*: 2,3 % (v/p), *Laurus nobilis*: 2,1% (v/p) y *Mentha x piperita*: 1,6% (v/p).

El rendimiento obtenido en eucalipto y laurel está por encima de la media de la mayoría de las plantas aromáticas que tienen rendimientos entre 1 y 2 %, Estas especies tienen excelente adaptabilidad en la región y por ser de porte arbóreo producen gran cantidad de hojas cada año lo que viabiliza su uso como fuente de AE para ser utilizadas en la horticultura intensiva.

En cuanto a la germinación de las semillas en cajas de Petri, se observó que la solución conteniendo AE de eucalipto fue la única que no redujo la germinación. Los AE de laurel y de menta inhibieron totalmente la germinación (Tabla 1). Cuando la germinación de las semillas se realizó en suelo y se cuantificó la emergencia, muchos efectos inhibitorios de la germinación observados en cajas de Petri no se manifestaron. Sin embargo, el AE de laurel que no permitió la germinación de las semillas en las placas, fue el que presentó una menor emergencia en maceta (Tabla 1).

Tabla 1. Germinación y emergencia de acelga tratada con aceites esenciales.

Tratamiento	% de germinación en Placa	% de emergencia en suelo
Testigo	72,3 A	86,6 A
Eucalipto	60 A	96,6 A
Laurel	0 D	73,3 B
Menta	0 D	86,6 A
Saponinas	40 B	76,6 AB
Avermectina	13,3 C	86,6 A
Diocetil	26,6 BC	83,3 A

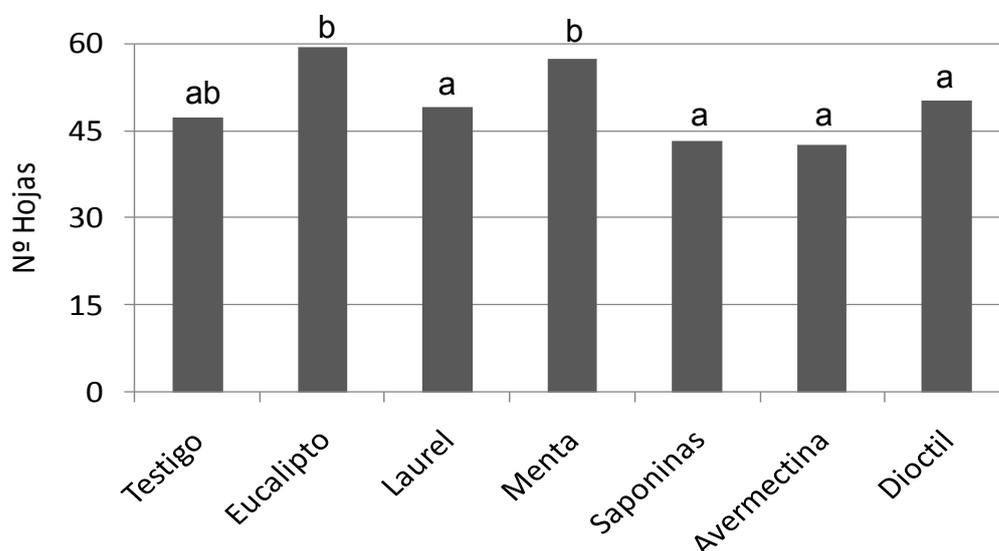
Medias seguidas por la misma letra, no difieren significativamente por test de LSD de Fisher.

Si bien en el ensayo que se realizó en campo, la siembra se hizo en bandejas germinadoras y luego se trasplantó, es habitual que en el Cinturón hortícola de La Plata el cultivo de acelga se inicie por siembra directa. El efecto inhibitorio de los AE

sobre la germinación es importante no solo para saber si podría afectar a los cultivos, sino para explorar su uso como herbicidas naturales.

En el ensayo realizado a campo, la determinación del número total de hojas no mostró interacción significativa entre los factores lomo y tratamiento, ni efecto de los lomos, pero sí existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Los tratamientos con AE de menta y eucalipto fueron los que presentaron mayor número de hojas, y los tratamientos con avermectina y saponinas el menor número de hojas (Figura 4).

Figura 4. Número de hojas de tamaño comercial cosechadas durante el ensayo.

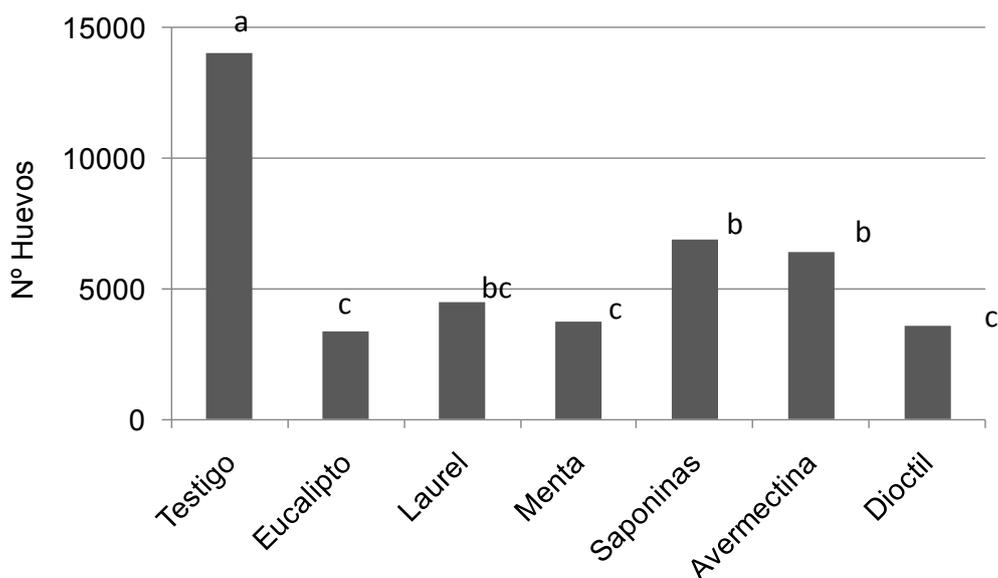


Columnas acompañadas por la misma letra, no difieren significativamente por test de LSD de Fisher.

Al pesar el material cosechado, medir el área de las hojas y analizar estadísticamente los resultados se observa que existe una interacción entre el factor lomo y el factor tratamiento, razón por la cual deben analizarse la totalidad de los datos en simultáneo (Anexo 1). Esto no destaca alguno de los tratamientos como el más favorable en términos de rendimiento. Sin embargo, los resultados obtenidos no evidencian un efecto perjudicial sobre el crecimiento de acelga. Esto permitiría evaluar estos mismos tratamientos en otras adversidades bióticas que afecten a este cultivo.

Luego de procesar las raíces y cuantificar el N° de huevos, se observó que en todos los tratamientos hubo una reducción significativa del número de huevos respecto al tratamiento control. Los tratamientos más efectivos fueron aquellos que utilizaron aceite esencial (Figura 5).

Figura 5. Número de huevos extraídos de raíces de acelga bajo distintos tratamientos



Columnas acompañadas por la misma letra, no difieren significativamente por test de LSD de Fisher,

Estos resultados indican que la multiplicación del nematodo en las raíces disminuye por las aplicaciones realizadas, reduciendo de esta manera el inóculo que permanecerá en suelo para el siguiente cultivo.

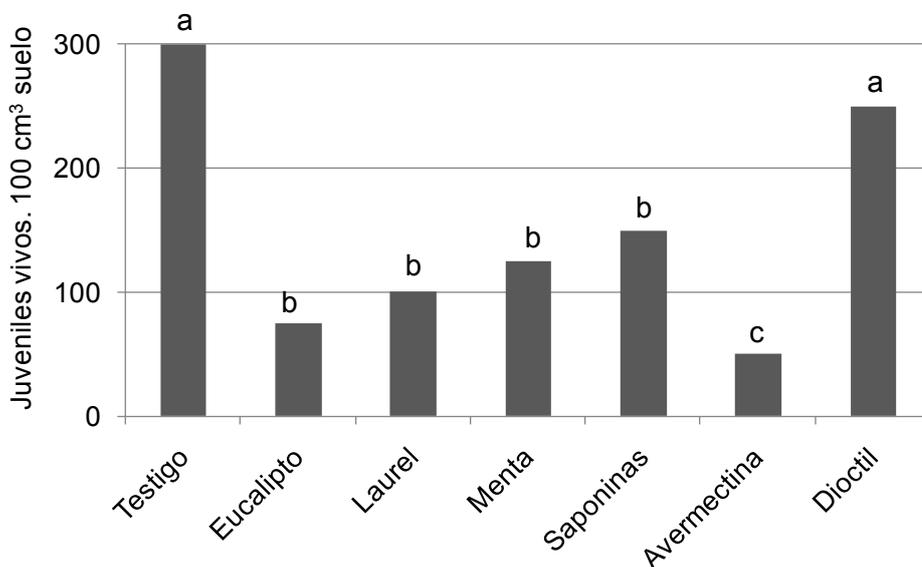
Si bien *N. aberrans* es un patógeno muy agresivo durante la primavera y el verano, en el invierno presenta tasas reproductivas bajas, debido a las bajas temperaturas. Por esta razón y por ser la acelga un cultivo de gran rusticidad, el tratamiento control no presenta rendimientos significativamente menores cuando se lo compara con los restantes tratamientos.

Al realizar las aplicaciones de las distintas soluciones de forma directa sobre las formas móviles de nematodos, se observó que a las 24 horas de realizada la

aplicación, en el tratamiento control la totalidad de los nematodos continuaba moviéndose, y en los restantes tratamientos el 100 % de los nematodos estaba inmóvil. Distintos trabajos destacan que aceites esenciales cuyos componentes principales son carvacrol, timol y linalol, seguidos del terpenol y la mentona tienen efecto letal sobre formas juveniles del nematodo *Meloidogyne incognita* (Ibrahim, 2006). Existen sustancias que tienen efecto nematostático que paralizan los individuos, pero luego de un tiempo al desaparecer el principio activo que los afecta, éstos recuperan la movilidad. Otros compuestos tienen efecto nematocida o letal. En este caso, se puede afirmar que todos los tratamientos tuvieron un efecto nematostático, pero para corroborar si hubo muerte del patógeno deberían realizarse ensayos de inoculación de plantas con nematodos tratados previamente.

Al realizar las aplicaciones de las soluciones sobre muestras de suelo, y extraer luego los nematodos móviles, se observa que todos los tratamientos tienen efecto sobre las formas juveniles. Sin embargo, por el efecto “buffer” que ejerce el suelo, los valores de control alcanzados son menores que en el ensayo anterior donde la aplicación de las soluciones es directa (Figura 6).

Figura 6. Número de juveniles extraídos de suelo, luego de 24 horas de la aplicación de los tratamientos.



Columnas acompañadas por la misma letra, no difieren significativamente por test de LSD de Fisher,

Existen numerosos trabajos que muestran la efectividad de los AE para el control de nematodos cuando la aplicación se realiza de forma directa sobre los individuos (Gupta et al., 2001; Oka, 2012; Laquale et al., 2015) En este trabajo, se evidencia la importancia de complementar este tipo de pruebas realizando aplicaciones a muestras de suelo, principalmente cuando el objetivo buscado es el control de nematodos que viven y se protegen en el suelo.

Por lo expuesto, se evidencia que la aplicación en *drench* de aceites esenciales es una práctica eficaz para disminuir la población de nematodos fitoparásitos en cultivos de invierno.

Los aceites de laurel y eucalipto presentan como ventaja que son especies que producen una importante cantidad de biomasa. En el caso del eucalipto, el follaje de los árboles podados y talados representan una fuente de biomasa aprovechable para la obtención de aceites esenciales, resultando una alternativa para el aprovechamiento de residuos de la industria forestal.

Ninguna práctica utilizada de forma individual es suficiente para realizar un eficaz manejo de adversidades bióticas por lo que es necesario evaluar los sinergismos y antagonismos de esta práctica con otras utilizadas en la horticultura local.

Conclusiones

- La acelga, en las condiciones ensayadas, no resultó ser una especie micorrizable por el hongo *Funneliformis mosseae*.
- El aceite esencial de menta, eucalipto y laurel aplicado junto al agua de riego contribuyen a disminuir la población de *Nacobbus aberrans* en el suelo.
- Los aceites esenciales de menta, eucalipto y laurel no tienen efecto fitotóxico aplicados en una concentración de 1,25 μL de AE. mL^{-1} .
- Los aceites esenciales de menta, eucalipto y laurel provocan inmovilidad en formas juveniles de nematodos de suelo.
- La aplicación de AE puede ser considerada una herramienta válida dentro de un plan integrado de manejo, al tener bajo efecto residual, ser rápidamente biodegradables e inocuos para la salud.

Bibliografía

Adlercreutz, E. A., E. Chaves, E. Mondino, & A. Szczesny. 2007. Fluctuación poblacional de juveniles del segundo estadio de *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne* sp. bajo condiciones de invernáculos. (Período Sept. 2004 / Oct. 2007). INTA. 2pp.

Alcoser, H., J. Murguía-Cordova, & C. Murguía. 2006. Efectos de solarización y enmiendas orgánicas contra el nematodo del nudo *M. incognita* bajo condiciones de vivero. *Universalia* 11 (1): 13-22.

Alippi, A. M., J. A. Ringuet, E. L. Cerimele, M. S. Re and C. P. Henning. 1996. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils Against *Paenibacillus* larvae, the Causal Agent of American Foulbrood Disease. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 4:9-16.

Barbosa, P., A.S. Lima, P. Vieira, L.S. Dias, M.T. Tonoco, J.G. Barroso, L.G. Pedro, A.C. Figueiredo & M. Mota. 2010. Nematicidal activity of essentials oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology* 42:8-16.

Bandoni, A.L. 2002. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires.

Barton, A. 2000. Industrial uses of Eucalyptus. Available online at <http://www.oilmallee.com.au/docs/BARTON.doc>.

Bocer, S. L. 2002. Cultivos protegidos y problemas ambientales: un estudio de la horticultura marplatense en la década del noventa. Tesis de Maestría, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Bongiorno, M., Larrosa, A., Maidana, M., Arenas, Y., Cruz, R., López, L., Gianuzzi & Cap, G. 2009. Biofumigación con recursos locales: el caso de la producción hortícola de los quinteros del Parque Pereyra Iraola. *LEISA revista de agroecología*.

Burt S. 2004 Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol.* 1;94(3):223-53.

Castillo, P. G. & N. Marbán-Mendoza. 1984. Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne & Allen 1944 en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. *Agrociencia* 56:85-93.

Coolen, W. A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. pp. 317-329. En: *Root knot nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control*. (Lamberti, F. y Taylor, C. E., eds.) Academic Press, London.

Cristóbal, A. J., G. Mora-Aguilera, R. H. Manzanilla, N. Marbán-Mendoza, P. Sánchez, I. Cid del Prado & K. Evans. 2006. Epidemiology and Integrated control of *Nacobbus Aberrans* on Tomato in México. *Nematology* 8: 727–737.

Curkovic, T. & J. Araya. 2004. Acaricidal action of two detergents against *Panonychus ulmi* (Koch) and *P. citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) in the laboratory. *Crop Protection* 23(8):731-733.

Doucet, M. E. & P. Lax. 2005. El género *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 en Argentina. 6. La especie *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchida) y su relación con la agricultura. In *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria* (Vol. 59, pp. 5-45).

Frick, F. 1976. Oxidative enzymes. En: *Physiological Plant Pathology*. Encyclopedia of Planta pathology. Ed. Heitefuss, R y Williams, P. H. New seies 4, p. 617-627.

García, M. 2012. Análisis de las transformaciones de la estructura agraria hortícola platense en los últimos 20 años. El rol de los horticultores bolivianos. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de La Plata.

Gupta, A., S. Sharma & S.N. Naik. 2011. Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. *Int Biodeter Biodeg* 65:703-707.

Harley & Harley. 1987 “A check-list of mycorrhiza in the british flora”. *New Phytologist* vol. 105. Academic Press, 102 pp. ISSN 0028-646X.

Heath, R.L. & L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 125:189–198.

Hewezi, T. & T. Baum. 2013. Manipulation of plant cells by Cyst and Root-Knot Nematode Effectors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26(1): 9-16.

Ibrahim, S.K., A. F. Traboulsi, S. El-Haj. 2006. Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. *Phytopathol. Mediterr.* 45, 238–246.

Inserra, R. N., G.D. Griffin & L. J. Anderson. 1985. The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Utah Agricultural Experiment Station. Logan, Utah., USA. Research bulletin 510.

Isman, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection.* 19: 603–608

Kimpinski, J., C. Arsenault, A. Gallant & J. Sanderson. 2000. The effect of marigolds (*Tagetes* sp.) and other cover crops on *Pratylenchus penetrans* and on following potato crops. *Journal of Nematology*. 32:531-536.

Laquale, S., V. Candido, P. Avato, M. P. Argentieri & T. D'Addabbo. 2015. Essential oils as soil biofumigants for the control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato. *Annals of Applied Biology* ISSN 0003-4746

Manzanilla-López, R. H., M.A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R.N. Inserra, P.S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R.M. Souza & K. Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227.

Oka, Y. 2012. Nematicidal activity of *Vervesina encelioides* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and effects on plant growth. *Plant Soil* 355:311-322.

Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Van de landbouwhogeschool te wageningen, Nederland*, v.66, n.4, p.1-46.

Pandey, R., A. Kalra, S. Tandon, N. Mehrotra, H. N. Singh & S. Kumar. 2000. Essential oils as potent source of nematicidal compounds. *Journal of Phytopathology* 148, 501e502.

Pérez, E. (2012). Plaguicidas botánicos: Una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*, 16(1), 51-59.

Puertas, A., B.M. de la Noval, B. Martínez, I. Miranda, F. Fernández & L. Hidalgo-Díaz. 2006. Interacción de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* con *Rhizobium* sp., *Trichoderma harzianum* y *Glomus clarum* en el control de *Meloidogyne incognita* *Rev. Protección Veg.* Vol. 21 No. 2: 80-89

Ringuelet, J. A. & S. Z. Viña. 2013. *Productos naturales vegetales*, coordinado por Jorge Abel Ringuelet. - 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2013 e-Book 173 pp

Ronco, M. G., M. F. Ruscitti, M. C. Arango & J. Beltrano. 2008. Glyphosate and mycorrhization induce changes in plant growth and in root morphology and architecture in pepper plants (*Capsicum annum* L.). *J. Hort. Sc. Biotech* 83: 497-505.

Ruiz Sánchez, M., J. M. Ruiz-Lozano & Y. Muñoz Hernández. 2011. Aquaporins, their relationship with arbuscular mycorrhizal fungi and water transport in plants. *Cultivos Tropicales*, vol. 32, no. 3, pp. 18-26.

Ruscitti M., M. Arango & J. Beltrano. 2017. Improvement of copper stress tolerance in pepper plants (*Capsicum annum* L.) by inoculation with arbuscular mycorrhizal

fungi. Theoretical and Experimental Plant Physiology DOI 10.1007/s40626-016-0081-7. e-ISSN 2197-0025.

Ruscitti, M., S. Garita, C. Arango & J. Beltrano. 2015. Inoculación con aislamientos seleccionados de hongos vesículo arbusculares como alternativa para moderar el estrés hídrico en plantas de tomate platense bajo condiciones de invernáculo. Rev. de la Facultad de Agronomía, La Plata. Vol 114 (2): 219-229.

Ruscitti, M. F., M. C. Arango, M. G. Ronco & J. Beltrano. 2011. Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). Brazilian Journal of Plant Physiology 23(1): 15-25. ISSN: 1677-0420 printed version. ISSN 1677-9452 on line version.

Sánchez, E., D. García, C. Carballo and M. Crespo. 1996. Estudio farmacognóstico de *Mentha x piperita* L. (toronjil de menta). Revista Cubana de Plantas Medicinales.v.1 n.3.

SENASA. 2006. Resolución 77-2006 <http://www.senasa.gov.ar/normativas/resolucion-77-2006-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>. Ultimo acceso: 8 de noviembre de 2016.

Smith, S. E. & V. Gianinazzi-Pearson. 1990. Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. Australian Journal of Plant Physiology, 17:177-188.

Souza Casadinho, O. & S. Bocero. 2008. Agrotóxicos: Condiciones de utilización en la horticultura de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). Revista Iberoamericana de Economía Ecológica, 9: 87-101.

Trouvelot, A., J. L. Kough & V. Gianinazzi-Pearson. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. En: 'Physiological and genetical aspects of mycorrhizae'. 1er Simposio europeo de micorrizas. INRA, Paris, 101-109.

Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology. 144:307-313.

Anexo 1. Peso Fresco (gr) y Área Foliar (cm²) de hojas de acelga cosechadas durante el ensayo.

Tratamiento	Bloque	Área Foliar		Peso fresco	
Laurel	4	9438,33	A	893,33	A
Avermectina	2	9753,67	A	921,67	A
Control	4	9867,33	A	904,67	A
Control	3	10042,67	A	899,00	A
Saponinas	3	10918,67	A B	983,33	A
Avermectina	4	11537,67	A B	1265,33	A B C D
Saponinas	4	11834,33	A B	1153,00	A B C
Diocetil	2	12026,67	A B	1041,33	A B
Saponinas	2	12285,33	A B C	1128,67	A B C
Laurel	2	12818,33	A B C	1144,67	A B C
Eucalipto	4	12842,33	A B C	1155,00	A B C D
Eucalipto	2	14138,33	A B C D	1305,00	A B C D E
Diocetil	4	14186,33	A B C D	1387,67	A B C D E
Menta	4	14318,67	A B C D	1207,33	A B C D
Menta	2	14647,00	A B C D	1516,33	B C D
Diocetil	3	15602,00	B C D	1310,00	A B C D E
Avermectina	3	16249,67	B C D	1666,67	D E
Laurel	3	17590,00	C D	1516,67	B C D E
Menta	3	17741,67	C D	1504,33	B C D E
Control	2	17767,00	C D	1811,00	E
Eucalipto	3	18950,33	D	1629,33	C D E

Medias seguidas por la misma letra, no difieren significativamente por test de LSD de Fisher,