

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Memoria de Título**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS ELICITORES  
QUITOSANO Y LA PROTEÍNA HARPIN EN LIMONEROS  
AFECTADOS POR *Tylenchulus semipenetrans*,  
EN LA LOCALIDAD DE PANQUEHUE**

**SERGIO NICOLÁS MATAMALA MATAMALA**

**SANTIAGO - CHILE**

**2006**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS ELICITORES  
QUITOSANO Y LA PROTEÍNA HARPIN EN LIMONEROS  
AFECTADOS POR *Tylenchulus semipenetrans*,  
EN LA LOCALIDAD DE PANQUEHUE**

Memoria para optar al título  
profesional de Ingeniero Agrónomo  
Mención: Sanidad Vegetal

**SERGIO NICOLÁS MATAMALA MATAMALA**

<b>PROFESOR GUÍA</b>	<b>Calificación</b>
Sr. Erwin Aballay E. Ingeniero Agrónomo M. Sc.	7,0
<b>PROFESORES CONSEJEROS</b>	
Sra. Marcela Esterio G. Ingeniero Agrónomo Mg. Sc.	6,0
Sr. Jaime Auger S. Ingeniero Agrónomo MS. Ph. D.	6,4

Santiago, Chile. 2006

**A mi madre**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi profesor guía, Erwin Aballay, por su apoyo, comprensión, y dedicación en el desarrollo de este trabajo.

A todos mis amigos, dentro y fuera del laboratorio de Nematología Agrícola, por su compañerismo, buena voluntad y sobre todo por su amistad incondicional.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Revisión Bibliográfica</b>	<b>5</b>
El cultivo del limonero	<b>5</b>
El nematodo de los cítricos	<b>7</b>
Elicitores	<b>10</b>
<b>Materiales y Método</b>	<b>16</b>
Diseño experimental y análisis estadístico	<b>19</b>
<b>Resultados y Discusión</b>	<b>20</b>
Evaluación del nivel poblacional de <i>Tylenchulus semipenetrans</i>	<b>20</b>
Evaluación sobre la población de nematodos no fitoparásitos	<b>30</b>
Evaluación sobre parámetros de vigor	<b>33</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>36</b>
<b>Literatura Citada</b>	<b>37</b>

## RESUMEN

*Tylenchulus semipenetrans* es uno de los factores que más incide en la disminución de la producción de los cítricos. El presente estudio tuvo como objetivo general evaluar el efecto de Quitosano y de la proteína Harpin en el control del nematodo de los cítricos, *Tylenchulus semipenetrans*. El ensayo se realizó en la localidad de Panquehue, ubicada en la V Región, en un huerto de limoneros de 12 años de edad, variedad Eureka, injertado sobre *Citrus macrophylla*. Los tratamientos consistieron en distintas dosis y parcializaciones de Quitosano y de la proteína Harpin además de la aplicación de estos junto con el nematicida tradicional Fenamiphos. En total se realizaron 9 tratamientos dentro de los cuales se incluyó un tratamiento de control (Fenamiphos) y un testigo absoluto. El diseño experimental correspondió a bloques completos al azar con 5 repeticiones para cada tratamiento. Se evaluaron las fluctuaciones poblacionales del segundo estado juvenil de *Tylenchulus semipenetrans* a los 30, 60 y 90 días desde el inicio del ensayo. Además se evaluaron algunos parámetros de la parte aérea de las plantas. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante ANDEVA y las medias fueron posteriormente separadas con el Test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el parámetro de nivel poblacional para los tratamientos con Fenamiphos y su mezcla con los elicitores. Con respecto a los parámetros de vigor evaluados, no se registraron diferencias estadísticas para ninguno de los tratamientos, así como tampoco, sobre la población de nematodos no fitoparásitos.

**Palabras clave:** Control de nematodos, nematodo de los cítricos, *Citrus macrophylla*

## SUMMARY

*Tylenchulus semipenetrans* is one of the elements affecting the growth of citrus production. The aim of this study was to evaluate the effect of Chitosan and the Harpin protein on the control of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*. The study was carried out in the locality of Panquehue, region V, in an orchard of 12 years old lemon trees, variety Eureka, grafted on *Citrus macrophylla*. The treatments consisted of different rates of Chitosan and the Harpin protein along with mixtures with Fenamiphos. The treatments included a chemical control (Fenamiphos) and one absolute control. The experiment was a randomized blocks design with 9 treatments and 5 replications. The population of second stage juveniles of the nematode was determined at 30, 60 and 90 days since the start of the trial. Besides it was evaluated some parameters of growth of the plants. The evaluations were compared through of ANDEVA and subsequently they were separated with the Tukey test ( $p \leq 0,05$ ). Statistically significant differences in the parameters of population for the treatments existed only with Fenamiphos and their combination with the elicitors, which alone did not produced any effect in decrease populations. With regard to the parameters of growth of plants, they did not present significant differences.

**Key words:** nematode control, citrus nematode, *Citrus macrophylla*

## INTRODUCCIÓN

Enormes pérdidas sufre la agricultura nacional por la acción de los nemátodos fitoparásitos. Aparte del daño directo que estos microorganismos del suelo provocan, su acción es muy lesiva a las plantas al dejar vías de acceso para el establecimiento de hongos, bacterias y virus (González, 1984).

Existe una serie de factores que inducen en los cítricos a una disminución de vigor y consiguiente baja en la producción. Uno de estos factores lo constituyen los nemátodos fitoparásitos, especialmente el “nematodo de los cítricos”, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb. Este nematodo se encuentra en todos los países donde se cultivan citrus, causando un decaimiento de los árboles, que se traduce en muerte de ramillas terminales, crecimiento restringido, clorosis en las hojas, defoliación y disminución de la producción. La fruta y las hojas son de menor tamaño en los árboles afectados (González, 1990).

En nuestro país, *Tylenchulus semipenetrans* corresponde al nematodo más agresivo en cítricos. Produce un síntoma conocido como “decaimiento lento”, ya que a medida que la población se incrementa en el suelo, el vigor de las plantas va disminuyendo (Aballay, 1995).

En Chile, según González (1987), este nematodo se encuentra distribuido desde la provincia de Tarapacá hasta Colchagua, siendo mayor su incidencia en la Región Metropolitana y VI Región. Prospecciones nematológicas realizadas por INIA en diferentes localidades, permiten aseverar que el 90% de las plantaciones, tanto de limoneros como de naranjos, se presentan infestadas con nemátodos.

Las herramientas de control de esta plaga son variadas, desde medidas de tipo cultural, como rotaciones culturales, uso de plantas libres de nematodos, hasta el uso de diferentes productos químicos fumigantes y nematicidas no fumigantes (Aballay, 1995).

La alta incidencia de los nemátodos en los cultivos ha obligado a los productores a implementar programas de control basados en las herramientas existentes, sean estas la aplicación de nematicidas organofosforados o carbamatos, como también la implementación de enmiendas orgánicas, especialmente guanos (Aballay y Flores, 2000).

La mayor desventaja de los nematicidas deriva de su toxicidad, tanto para la planta como para el hombre y otros seres vivos, así como la potencial contaminación, particularmente cuando los residuos o los productos de la degradación alcanzan niveles inaceptables en aguas subterráneas (Philippi, 1989).

Por lo anteriormente indicado, *Tylenchulus semipenetrans* es de gran importancia en una gran cantidad de huertos de cítricos no solamente en Chile sino que en todo el mundo. Además, la alta toxicidad de los productos que hoy se utilizan para su control producirá que en un futuro no muy lejano estos productos no estén disponibles, debido a las cada vez mayores restricciones que existen para el uso de agroquímicos altamente tóxicos. Es por esta razón que es de gran importancia buscar nuevas alternativas o evaluar otras ya existentes para el control de esta plaga, con el fin de sustituir total o parcialmente el uso de nematicidas tradicionales.

El presente estudio tiene como objetivo general evaluar el efecto de Quitosano y de la proteína Harpin en el control del nematodo de los cítricos (*Tylenchulus semipenetrans*), en un huerto con alta infestación.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### El cultivo del limonero

Según Odepa (2003), la superficie total en Chile cultivada con limoneros es de 7700 ha, concentrándose éstas en la V, VI y Región Metropolitana.

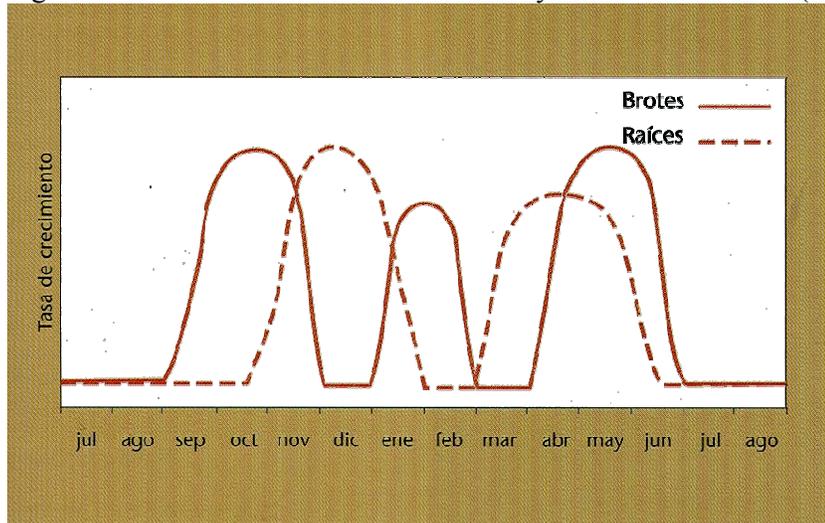
Los eventos fenológicos del limonero son, tanto en época como en duración, muy dependientes del clima reinante en cada localidad, como asimismo de la variación que este presenta año tras año. Con respecto al crecimiento de brotes se distinguen tres períodos: primavera (septiembre a noviembre), verano (enero y febrero) y otoño (abril a junio) (Figura 1). Los crecimientos de primavera y otoño son los más intensos, promovidos por temperaturas medianas. El del verano es más débil y más corto, probablemente debido a las temperaturas excesivas de esa época. El desarrollo de la brotación es óptimo a temperaturas medias diarias entre 15 y 25 °C (Razeto, 2002).

El crecimiento de raíces ocurre a continuación de los ciclos de crecimiento de brotes de primavera y verano. El primer periodo de crecimiento radicular se presenta desde octubre hasta enero. Mientras que el segundo lo hace desde febrero a mayo (Figura 1). A pesar que normalmente el crecimiento de raíces sigue al crecimiento de brotes, en la Zona Central generalmente no se presenta crecimiento después del periodo de brotación de otoño, debido probablemente a la fuerte baja en la temperatura del suelo. Las raíces de los cítricos crecen de manera significativa con temperaturas superiores a los 13 °C en el suelo y alcanzan una tasa de crecimiento en aumento lineal desde 17°C hasta 30 °C. Las raíces de los cítricos por situarse preferentemente en forma superficial en el perfil del suelo, están muy expuestas a rápidos cambios de temperatura según la época del año (Razeto, 2002).

El portainjerto *Citrus macrophylla* ha sido el patrón más usado en limonero durante los últimos años debido a su rápida entrada en producción y un excelente calibre inducido a la variedad injertada. Es una excelente alternativa a usar, pero tiene una alta susceptibilidad a nematodos, además de Cachexia y Tristeza (Ortúzar, 1996a).

De las variedades más plantadas en el último tiempo, Eureka (posiblemente el clon Frost) es muy popular en el país debido a su alta productividad, especialmente cuando se injerta sobre *Citrus macrophylla* (Ortúzar, 1996b). Además, Ortúzar *et al.* (2002) señalan que también es compatible con limón rugoso, naranjo agrio (combinación aparentemente menos longeva), limón volkamer, Benton citrange y el citrandarin X-639. Es incompatible con *Poncirus trifoliata* y la mayoría de sus híbridos (Carrizo, Troyer, Swingle).

Figura 1. Períodos de crecimiento de brotes y raíces en limoneros (Virtual)



Fuente: Bruno Razeto M.

## **El nematodo de los cítricos, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb.**

### **Ciclo de vida**

Corresponde a un nematodo cuyo ciclo de vida está conformado por un estado de huevo, 4 estados juveniles y el adulto, hembras y machos (Aballay, 1998).

La hembra adulta es sedentaria. En los sectores de la raíces que se encuentran parasitados, generalmente se localizan muchas hembras agregadas y cubiertas con una matriz gelatinosa conteniendo muchos huevos de los que eclosan las larvas correspondientes al segundo estado juvenil. La eclosión se produce cuando las condiciones de humedad, temperatura y aireación son adecuadas. Se ha observado que la eclosión normalmente ocurre cuando existe agua libre en el suelo y una temperatura sobre los 18° C (Aballay, 1995).

La hembra adulta joven penetra la raíz a lo largo de su esófago. El resto del cuerpo permanece fuera de la raíz y comienza a engrosar, aumentando de 25 a 30 veces su diámetro, en un breve lapso (Aballay, 1995).

La reproducción es partenogénica, produciéndose huevos que dan origen a juveniles de ambos sexos. El macho no se alimenta y demora de 7 a 10 días en llegar a adulto. Se ha determinado que hasta un 50% de la población pueden ser machos (Aballay, 1995).

Una generación ocurre normalmente entre 6 a 9 semanas, con una temperatura del suelo de 24-26° C (Dropkin, 1980, citado por Fontaine, 1997).

### **Daño y sintomatología**

El nematodo de los cítricos causa síntomas poco específicos y difíciles de diagnosticar. La presencia del nematodo puede ser confirmada por análisis microscópico de suelo o de raíces. Cuando las raíces tienen un alto grado de infestación se presentan llenas de incrustaciones de suelo difíciles de lavar con agua corriente, situación que es provocada por el material gelatinoso que la hembra secreta durante la producción de los huevos (Magunacelaya y Dagnino, 1999).

A medida que la población se incrementa, se aprecian síntomas en la parte aérea, tal como brotes más cortos, mayor pérdida de hojas, clorosis, falta de vigor, todo lo cual se traduce en rendimientos menores y pérdida de calidad. Estos síntomas son normalmente más marcados en la parte superior de las plantas (Aballay, 1995).

El daño producido por *T. semipenetrans* normalmente es incrementado por la presencia de otros organismos en el suelo que invaden los sitios de infección, tal como *Fusarium oxysporum*, *F. solani* y *Phytophthora spp.* (Aballay, 1995).

Generalmente las condiciones ambientales que afectan a las plantas, como baja fertilidad, salinidad o fluctuaciones extremas de humedad incrementan el daño producido por el parasitismo del nematodo de los cítricos. En suelos salinos, las plantas atacadas absorben una mayor cantidad de Na y disminuye la absorción de elementos menores como Zn, Mn y Cu (Aballay, 1996)

El efecto más serio y rápido de los nemátodos sobre el crecimiento y producción de los cítricos, ocurre cuando árboles jóvenes se plantan sobre antiguos suelos de cítricos altamente infestados con el nematodo. Estos árboles jóvenes muestran síntomas claros de decaimiento. Cuando el nematodo coloniza nuevos suelos de cítricos, es posible que la infestación no se detecte en muchos años (10-50). Cuando el suelo ha sido fumigado, los síntomas del nematodo se notan a partir de diez años después (Magunacelaya y Dagnino, 1999).

Considerando que no todos los huertos cítricos son económicamente dañados por este parásito, Cohn (1972), sugiere que la actual reducción en las producciones de cítricos en el mundo debido a *Tylenchulus semipenetrans* fluctúa entre 8,7 a 12,2%.

El nivel crítico de infestación para el “nematodo de los citrus” (*Tylenchulus semipenetrans*) en limoneros, naranjos, pomelos y mandarinos adultos, es de alrededor de 7000 ejemplares juveniles por 250 gramos de suelo. Sobre este nivel comienza una restricción del crecimiento en las raicillas con desprendimiento de corteza radicular, muerte de ramillas terminales, clorosis en hojas, defoliación, frutos pequeños y disminución de la producción (Cohn, 1972).

### **Medidas de control**

**Portainjertos resistentes.** Existen especies de portainjertos resistentes tales como *Poncirus trifoliata* e inmunes como *Severina buxifolia*. Algunos híbridos, como Carrizo y Troyer Citrange, son tolerantes a algunos biotipos de *Tylenchulus semipenetrans* (González, 1987).

**Temperatura.** Prácticamente todos los nemátodos fitoparásitos son eliminados a temperaturas entre los 44° C y 48° C. Tratamientos como calentamiento del suelo con vapor o calor seco, solarización y sumergimiento en agua caliente de las raíces infestadas son empleados para reducir las poblaciones de nemátodos (Heald, 1987, citado por Fontaine, 1997).

**Control biológico.** Los nemátodos son atacados por numerosos organismos, tales como hongos de los géneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* y *Trichothecium*. También los nemátodos saprófitos, ácaros, collembolos y amebas, pueden destruir nemátodos fitoparásitos (González, 1984).

**Materia orgánica.** La incorporación de materia orgánica, (guano de gallina, cabra, vacuno) causa una disminución substancial de las larvas del nematodo de los citrus a los 90 días de la aplicación. Por lo general es recomendable combinar una aplicación de nematicida (en primavera) con una de guano (en invierno), para obtener los mejores resultados (González, 1987).

**Barbecho.** Consiste básicamente en dejar un suelo sin cultivar por un cierto período, principalmente durante los meses de primavera y verano. Todo ello, por supuesto, removiéndolo periódicamente (González, 1984).

**Control químico.** El control químico con fumigantes y no fumigantes fue la primera estrategia de control que se utilizó en California. La fumigación de preplantación con 1,3 dicloropropeno se recomienda cuando un cultivo se arranca y en los tres años siguientes se establece un cultivo susceptible o tolerante. Otros químicos como bromuro de metilo y cloropicrina pueden también usarse en viveros o alguna zona puntual o donde además hay problemas de hongos (Magunacelaya y Dagnino, 1999). Dentro de los nematicidas no fumigantes se encuentran el grupo químico de los organofosforados como fenamifos (Nemacur) y etoprofos (Mocap), así como también el grupo de los carbamatos, entre los cuales se encuentran aldicarb (Temik), oxamil (Vydate) y carbofuran (Furadan) (Philippi, 1989).

### **Elicitores**

Los elicitores son sustancias que activan una serie de mecanismos bioquímicos en la planta que la inducen a producir compuestos activos en su defensa. Ocurren cambios en las reacciones de oxidación, movimientos de iones entre células, alteración de las membranas, engrosamiento de las paredes celulares, entre otros. Algunos cambios más específicos tienen que ver con la producción de sustancias que tiene una acción microbiana directa, llamadas fitoalexinas y con otro tipo de moléculas del tipo de las

proteínas, conocidas como proteínas patógenamente relacionadas (PR) las que también tienen cierta actividad biocida (Aballay y Flores, 2000).

Entre los elementos que juegan un papel más destacado en la inducción de respuestas defensivas en la planta se encuentran el ácido salicílico, el ácido jasmónico, la sistemina, algunos aminoácidos, etileno, glicoproteínas, elementos derivados de levaduras y otros más de origen microbiano, todos los cuales son elementos promotores de PR. Las proteínas patógenamente relacionadas han sido definidas como proteínas de plantas que se acumulan luego del ataque de un patógeno o situaciones relacionadas. Este ataque no sólo se refiere a patógenos microbianos, sino que también incluye nematodos, insectos o el tratamiento con ciertos químicos, además de otros tipos de estrés (Sticher *et al*, 1997). Entre las PR que incrementan su presencia en forma importante en la planta luego de iniciado un ataque, las más estudiadas han sido quitinasas, peroxidasas, B-1,3 glucanasas, inhibidores de proteinasas, entre otras (Aballay y Flores, 2000).

Existen otros elementos, que son carbohidratos de mayor complejidad que también poseen una importante actividad elicitora, entre los que destacan la quitina y algunos de sus derivados como el Quitosano, los que son importantes elicitores de fitoalexinas. Dentro de las fitoalexinas producidas, se han detectado más de 300 sustancias provenientes de plantas de más de 30 familias. Estos elementos, son básicamente isoflavonoides y terpenoides (Aballay y Flores, 2000).

Las fitoalexinas fueron definidas como compuestos antimicrobianos producidos después de una infección o elicitados por agentes abióticos. La mayoría de las fitoalexinas han sido detectadas como respuesta al ataque de hongos, sin embargo, hay reportes de su producción ante la presencia de virus, bacterias y nemátodos. Se ha visto que estas fitoalexinas poseen una actividad tóxica importante sobre estos mismos organismos (Paxton, 1981, citado por Hammerschmidt, 1999).

## Descripción de los productos utilizados en este estudio

### Quitosano

El nombre químico de la quitina es  $\beta$  (1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. Se encuentra principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas. La quitina es completamente insoluble en agua o en medio ácido (Lárez, 2003).

El quitosano es una molécula deacetilada de quitina, componente de la pared celular de muchos hongos, habiéndose encontrado también en la matriz gelatinosa que cubre los huevos de nemátodos del género *Meloidogyne*. La mayoría de los estudios se han realizado utilizando directamente la quitina a través de la incorporación de algunos elementos de origen marino, tal como caparazones de crustáceos aplicados al suelo, con lo que se logra un estímulo importante sobre la actividad de organismos del suelo que degradan la quitina, con lo que se afectan directamente los huevos de nemátodos fitoparásitos los cuales poseen quitina en su composición (Aballay y Flores, 2000).

Según Rodríguez-Kábana *et al.* (1984), la descomposición de la quitina es realizada principalmente a través de la actividad de hongos y actinomicetes. Muchas de las especies de hongos quitinolíticos encontrados en el suelo son capaces de destruir huevos de nematodos. Su acción sobre estos es debida a la hidrólisis enzimática de la quitina sobre la cubierta de los huevos, afectando su permeabilidad. Debido a esto el contenido del huevo podría presentar una posible predisposición a desordenes fisiológicos causados por la difusión de toxinas.

Por su parte Mian *et al.* (1982), encontraron que la adición de quitina causó aumentos en la actividad de la aril-fosfatasa, quitinasa y ureasa del suelo. El suelo tratado con quitina desarrolló una microflora específica y pruebas *in vitro* demostraron que todas las especies fungosas aisladas eran parásitas de huevos de *Meloidogyne arenaria*.

Cárdenas *et al.* (1997), compararon el efecto de quitina y tosíl-quitina con el nematocida comercial Temik-15G en plantas de tomate infestadas con nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne*. Los resultados indicaron que la quitina de langostino redujo en forma significativa el número de nódulos de nemátodos en dosis de 0,5, 1,0 y 1,5%. Por otra parte encontraron que la quitina de langostino al 1 y 1,5% es igualmente efectiva que el nematocida Temik-15G en el control de nemátodos.

También Spiegel *et al.* (1989) demostraron la capacidad como nematocida de la quitina. Al aplicar 0,2% (p/p) de ClandoSan (quitina en polvo extraída de crustáceos) a macetas plantadas con naranjo agrio e inoculadas con 1500 a 2000 juveniles de *Tylenchulus semipenetrans*, evaluadas luego de 5 meses obtuvieron resultados similares a aldicarb (Temik 15G) y EDB. Este efecto nematocida estaría dado, según el autor, por que la descomposición de ClandoSan libera amoníaco que actúa como nematocida, además de estimular un incremento de la microflora quitinolítica capaz de parasitar huevos de nematodos fitoparásitos.

Además del uso de Quitosano en el control de nematodos fitoparásitos también este polímero ha sido utilizado inhibidor de enfermedades fungosas. En esta línea Capdeville *et al.* (2002) demostraron que Quitosano fue capaz de reducir significativamente el progreso de *Penicillium expansum* en manzanas cultivar “Red Delicious” mediante la inducción de resistencia en la fruta.

Reddy *et al.* (2000) en un ensayo con tomates inoculados con *Alternaria alternata* Keissl., señalaron que la aplicación de Quitosano inhibe el desarrollo de la enfermedad y reduce la producción de factores patogénicos por el hongo como enzimas degradadoras de la pared celular, ácidos orgánicos y toxinas específicas responsables de la penetración del hongo y del daño del tejido del hospedero. En este ensayo además se determinó que Quitosano induce la producción de fitoalexinas, sustancias que tiene una acción biocida.

### **Harpin (Messenger)**

Messenger es un bioactivador cuyo ingrediente activo es la proteína Harpin. Proteína de origen natural extraída da la bacteria *Erwinia amylovora*, no actúa directamente sobre los patógenos, en lugar de eso activa los mecanismos de defensa naturales de las plantas (EPA, 2003).

Messenger no es tóxico y no representa daño para la salud humana se formuló para ser usado en sistemas de manejo integrado de plantas, reduciendo la necesidad del uso de pesticidas complementarios y otros agroquímicos. Se aplica en bajas tasas, su degradación es bastante rápida y no posee efectos adversos para muchas especies silvestres (EPA, 2003).

Cuando la planta reconoce a la proteína Harpin, se generan una serie de reacciones internas que estimulan en las plantas resistencia a un amplio rango de patógenos (Blaine, 2000). Esta respuesta de defensa de las plantas llamada “reacción hipersensitiva” se desarrolla en pocas células y solo en las que se encuentran en contacto directo con el patógeno invasor. Este colapso en las células de las plantas previene la diseminación y la infección (Greenberg, 1996).

La producción de oxígeno activo (por ejemplo  $H_2O_2$ ) y el cambio en la relación  $K^+/H^+$  a través de la membrana plasmática son dos eventos estimulados por la proteína Harpin y están asociados a una interacción incompatible planta-bacteria que resulta en una respuesta hipersensitiva (Baker *et al*, 1993).

Desikan *et al* (1998) mostraron que la proteína Harpin inicia el camino a la muerte celular programada estimulando la producción de especies de oxígeno activo ( $H_2O_2$ ) y también actúa como una señal molecular para la expresión de genes de defensa involucrados en diversas respuestas como son la codificación de Fenilalanina amonio-liasa, una enzima clave para la biosíntesis de lignina y ácido salicílico; Glutathion S-

transferasa, una familia de enzimas que protegen contra el estrés oxidativo y por último para la codificación de enzimas requeridas para la síntesis de fitoalexinas.

Diversos estudios se han realizado con la proteína Harpin como supresor de enfermedades fungosas. En esta línea Capdeville *et al.* (2002), aplicaron la proteína Harpin en manzanas cv. “Red Delicious” recién cosechadas contra *Penicillium expansum*. El tratamiento aplicado 96 h antes de la inoculación entregó los mejores resultados. Debido a que el hongo no entró en contacto con el producto aplicado, se concluyó que la proteína Harpin es capaz de inducir resistencia en la fruta.

### **Fenamiphos (Nemacur)**

Nematicida de acción sistémica y de contacto, de largo efecto residual, especialmente indicado para controlar nemátodos ectoparásitos, formadores de quistes y agallas (endoparásitos) y semiendoparásitos, como el nematodo de los cítricos. (Afipa 2002, p. 915).

## MATERIALES Y MÉTODO

El trabajo se realizó en un huerto de limoneros (*Citrus limon* L.) de 12 años de edad, variedad Eureka injertada sobre *Citrus macrophylla*, plantado a una densidad de 533 plantas/ha, con un marco de plantación de 7,5 X 2,5 m. El sistema de riego consistía en una doble línea de riego, con goteros que entregaban 4 L/hora, dispuestos a una distancia de 75 cm.

Algunas de las características físico-químicas del suelo en el que se realizó el presente ensayo son: de reacción neutra (pH 6,7), contenido medio de materia orgánica (3,78%) y no salino (CE de 1,45 dS m<sup>-1</sup>), con una disponibilidad media de nitrógeno (28 mg kg<sup>-1</sup>), alta de fósforo (56 mg kg<sup>-1</sup>) y muy alta de potasio (355 mg kg<sup>-1</sup>). Presenta textura franca, con 21,8% de arcilla, 35% de limo y 43,2% arena.

El huerto presentaba una infestación promedio de 9487 ejemplares de segundo estado juvenil de *Tylenchulus semipenetrans*/250 cm<sup>3</sup> de suelo al momento de iniciar el ensayo.

Los tratamientos implementados en el presente trabajo fueron:

1. Aplicación de Harpin (n.c. Messenger) en dosis de 350 g/ha al follaje de producto formulado al 3%, 1 aplicación
2. Aplicación de Harpin, 700 g/ha de producto comercial al follaje, dividido en 2 aplicaciones de 350 g/ha, cada 20 días.
3. Quitosano al suelo, en dosis de 10 L/ha de producto formulado al 2,5%. 1 aplicación
4. Quitosano al suelo, 10 L/ ha en dos aplicaciones de 5 L/ha, cada 20 días
5. Quitosano al suelo, 20 L/ ha en cuatro aplicaciones de 5 L/ha, cada 20 días
6. Fenamiphos (n.c. Nema-cur 240 CS ), 17 L/ha de producto formulado a 240 g/L más Harpin, 350 g/ha al follaje, una semana después del químico

7. Fenamiphos, 17 L/ha de producto comercial más Quitosano 10 L/ha del producto formulado aplicado al suelo una semana después del primero.
8. Fenamiphos , 17 L/ha de producto comercial, una aplicación
9. Testigo absoluto

El efecto de los distintos tratamientos se evaluó en base a la densidad poblacional del segundo estado juvenil de *Tylenchulus semipenetrans* y de la población de nematodos no fitoparásitos. Además para evaluar el vigor de las plantas se utilizó los parámetros de largo y número de brotes nuevos/m<sup>2</sup> de canopia, estimación de cosecha y una escala visual de vigor de la parte aérea de las plantas.

Los porcentajes de control se calcularon en función de la variación de las poblaciones en relación a la población inicial, considerando también la tasa de variación del testigo.

El inicio de la aplicación de los productos corresponde al 11 de diciembre del 2003. Las fechas de aplicación de las siguientes dosis de los tratamientos 2, 4, 5, 6 y 7 correspondieron a las programadas de acuerdo a cada tratamiento. La aplicación de los productos se realizó en forma localizada bajo el gotero. Inmediatamente después de aplicar los productos se regó para tener una mejor distribución del producto en el bulbo húmedo del suelo. La aplicación de la proteína Harpin fue realizada con una bomba de espalda al follaje.

La extracción de muestras de suelo para la posterior determinación de la población de segundo estado juvenil de *Tylenchulus semipenetrans* y de la población de nematodos no fitoparásitos, se efectuó previo a las aplicaciones y a los 30, 60 y 90 días después de haber iniciado el ensayo. El muestreo de suelo se ejecutó con un barreno de 2,5 cm de diámetro. La muestra se tomó cercana al gotero, entre los 5 y 30 cm de profundidad. Las muestras se sacaron de cada planta de la parcela experimental, las que se mezclaron y formaron una muestra compuesta.

Para el análisis nematológico de las muestras de suelo se empleó el procedimiento de tamizado de Cobb, más embudo de Baermann (Christie y Perry, 1951), en base a 250 cm<sup>3</sup> de suelo. Las muestras fueron procesadas en tamices de 850, 180, 75 y 45  $\mu$ m. El

material que se obtuvo se filtró por 48 horas en un embudo con papel absorbente. Posteriormente se procedió a la identificación y el conteo con una lupa estereoscópica.

Los análisis nematológicos fueron efectuados en el laboratorio de Nematología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

El vigor de las plantas se evaluó con diversos parámetros:

1. Se contabilizó los brotes nuevos/m<sup>2</sup> de canopia. Para ello se utilizó un cuadrante de 50 X 50 cm. La evaluación se efectuó el 23 de abril del 2004, midiendo en los cuatro puntos cardinales y a la altura media de cada planta. Se contabilizó en cada planta de la parcela y se calculó un promedio por m<sup>2</sup> para cada unidad experimental.
2. Se midió el largo de los brotes nuevos. La medición fue realizada el 23 de abril del 2004 considerando para ello 20 brotes por repetición.
3. Se realizó una estimación de cosecha. Para ello se contabilizó los frutos visibles de distintos tamaños correspondientes a dos plantas de la parcela, posteriormente se multiplicó por el peso promedio de los frutos para obtener finalmente una extrapolación de los kilogramos de fruta por tratamiento. Esta medición se realizó el 12 de mayo del 2004.
4. Finalmente se utilizó una escala visual de vigor de la parte aérea medida de 1 a 5. Esta evaluación fue realizada el 12 de mayo del 2004. La escala utilizada se presenta a continuación.

Valor 1. Planta clorótica, escaso follaje, alto grado de defoliación

Valor 2. Planta con un mayor nivel de hojas, menor defoliación

Valor 3. Plantas con follaje cubriendo la mayor parte de la planta, hojas cloróticas, crecimientos nuevos escasos.

Valor 4. Planta cubiertas con follaje en su totalidad, hojas verde a verde clorótica

Valor 5. Planta cubiertas con follaje en su totalidad, nula defoliación, hojas color verde intenso.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño utilizado correspondió a bloques completos al azar con 9 tratamientos y 5 repeticiones para cada uno de estos. Cada bloque estuvo constituido por una hilera, en tanto que la unidad experimental correspondió a parcelas de tres plantas.

La población final (Pf) se designó como P30, P60 y P90 correspondientes a la población a los 30, 60 y 90 días de iniciado el ensayo.

Los datos poblacionales obtenidos en las mediciones posteriores a la aplicación de los productos (Pf), se compararon con los obtenidos de muestras previas (Pi). Utilizando para ello el Índice Reproductivo (R) que relaciona las poblaciones finales con las iniciales,  $Pf/Pi$ . Previo al análisis estadístico y con el objetivo de normalizar las curvas de población, los datos fueron transformados a  $\log(x+1)$ , es decir,  $\log(Pf+1)$  y  $\log(Pi+1)$ .

Sobre el valor R normalizado y para los parámetros de vigor, largo y número de brotes nuevos y estimación de cosecha, se realizó ANDEVA y posteriormente de ser necesario se aplicó el Test de Rango Múltiple de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación del nivel poblacional de *Tylenchulus semipenetrans*

#### 30 días de iniciado el ensayo

En esta evaluación se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Aquellos que presentaron un menor Índice reproductivo (R) fueron: Fenamiphos más Harpin (T6), Fenamiphos más Quitosano (T7) y Fenamiphos (T8). Sólo estos tres tratamientos se diferenciaron estadísticamente del testigo absoluto (T9) ( $p \leq 0,05$ ). (Cuadro 1).

Los tratamientos Fenamiphos y Fenamiphos más Quitosano a los 30 días de iniciado el ensayo, presentaron los mayores porcentajes de control, en torno al 54% (Figura 2) y las menores tasas de variación (Figura 3), este último valor entrega una aproximación más real de lo acontecido con la evolución de las poblaciones, ya que corresponde a la relación de la población final con respecto a la inicial ( $P_f/P_i$ ).

Los tratamientos con Quitosano 1 aplicación de 10 L/ha, Quitosano 2 aplicaciones de 5 L/ha y Quitosano 4 aplicaciones de 5 L/ha, si bien mostraron valores de Índice reproductivo ligeramente inferiores a 1 (Cuadro 1), lo que indica que las poblaciones de juveniles ( $J_2$ ) de *Tylenchulus semipenetrans* no aumentaron, fueron estadísticamente iguales al testigo absoluto. Además se puede observar que el porcentaje de control de estos tres tratamientos es bastante similar, en torno al 25% (Figura 2). Cabe señalar que al momento de la evaluación los tratamientos de Quitosano 2 y 4 aplicaciones presentaban la misma cantidad de producto aplicado, es decir, 10 L/ha., los primeros 5 litros aplicados el día en que se inicio el ensayo y los restantes 20 días después.

Con respecto a los tratamientos en los que se aplicó la proteína Harpin, estos no presentaron diferencias estadísticas significativas con el testigo absoluto (Cuadro 1). Los tratamientos con la proteína Harpin, es decir, 1 aplicación de 350 g/ha (T1) y 2 aplicaciones de 350 g/ha separadas por 20 días (T2), mostraron un porcentaje de control cercanos al 9 y 20% respectivamente (Figura 2). Además, presentaron una tasa de variación levemente superior a 1, lo que indica que la población de juveniles ( $J_2$ ) de *Tylenchulus semipenetrans* aumentó, aunque en menor grado que en el testigo absoluto (Figura 3).

Cuadro 1. Índice reproductivo normalizado (R) y poblaciones iniciales y finales (N° de ejemplares ( $J_2$ ) de *Tylenchulus semipenetrans*/250 cm<sup>3</sup> de suelo), para los tratamientos después de 30, 60 y 90 días de iniciado el ensayo.

Tratamiento	Población Inicial <sup>Z</sup>	Población Final P(30)	R 30 días de iniciado el ensayo	Población Final P(60)	R 60 días de iniciado el ensayo	Población Final P(90)	R 90 días de iniciado el ensayo
Harpin 1 aplicación de 350 g/ha	8287	9964	1,019 c <sup>x</sup>	12278	1,046 b <sup>x</sup>	14272	1,065 a <sup>x</sup>
Harpin 2 aplicaciones de 350 g/ha	9749	10200	1,004 c	14341	1,041 a b	18369	1,069 a
Quitosano 1 aplicación de 10 L/ha	8874	8579	0,998 c	10074	1,016 a b	14180	1,055 a
Quitosano 2 aplicaciones de 5L/ha	7590	7376	0,999 c	10776	1,048 b	13105	1,073 a
Quitosano 4 aplicaciones de 5 L/ha	9960	9272	0,994 bc	12702	1,024 a b	15356	1,047 a
Fenamiphos más Harpin	10241	7106	0,956 ab	12629	1,023 a b	14810	1,043 a
Fenamiphos más Quitosano	9478	5742	0,944 a	9643	1,000 a	12510	1,031 a
Fenamiphos, 17L/ha	12737	7956	0,943 a	13692	1,008 a b	16554	1,030 a
Testigo	8462	10993	1,030 c	12781	1,050 b	15501	1,072 a

<sup>x</sup>: Valores unidos con letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas, según prueba Tukey ( $p \leq 0,05$ )

<sup>Z</sup>: Valores promedio de 5 repeticiones

$R = \log(Pf+1) / \log(Pi+1)$

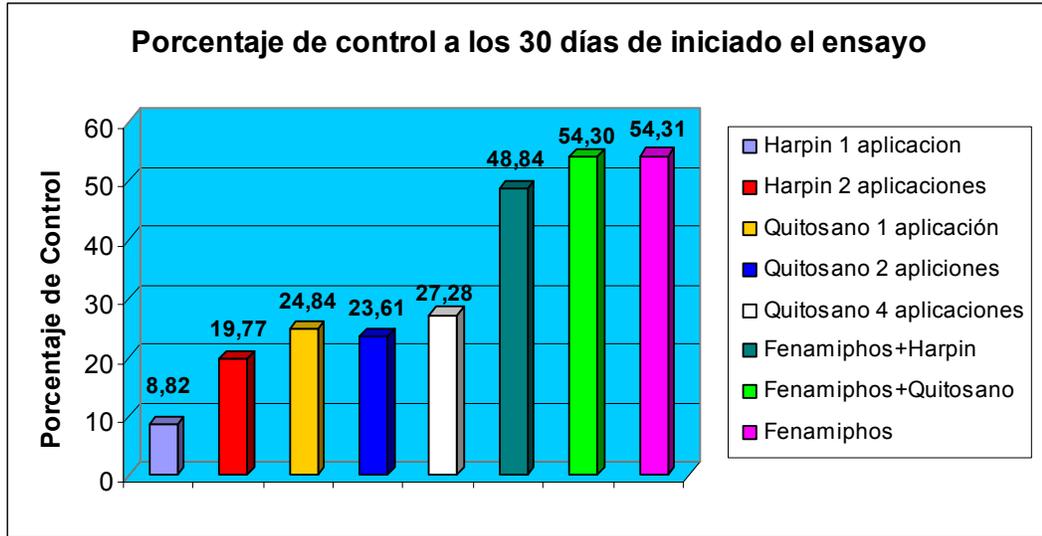


Figura 2. Porcentaje de control de los tratamientos a los 30 días de iniciado el ensayo sobre la población de *Tylenchulus semipenetrans*.

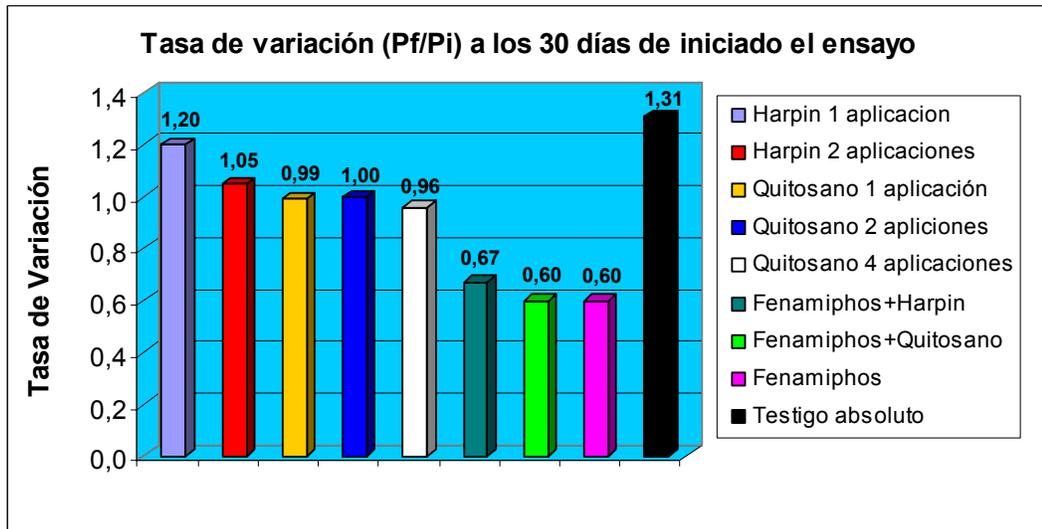


Figura 3. Tasa de variación de la población de *Tylenchulus semipenetrans* a los 30 días de iniciado el ensayo.

**60 días de iniciado el ensayo**

En la evaluación realizada a los 60 días de iniciado el ensayo se observó que los tratamientos con Harpin (T1 y T2) no se diferenciaron estadísticamente del testigo absoluto (T9) presentando valores de Índice reproductivo superiores a 1 (Cuadro2). Además, para ambos tratamientos se advirtió un porcentaje de control prácticamente nulo (Figura 4) y una tasa de variación de ambos tratamientos muy similar al testigo absoluto (Figura 5).

Los tres tratamientos con Quitosano no se diferenciaron estadísticamente del testigo químico (Fenamiphos) ni del testigo absoluto, mostrando valores de Índice reproductivo levemente superiores a 1 (Cuadro 1).

Aunque en esta evaluación los tratamientos con Fenamiphos, Fenamiphos más la proteína Harpin y Fenamiphos más Quitosano no se diferenciaron estadísticamente entre sí, es con el tratamiento de Fenamiphos mezclado con Quitosano (T7) con el que se logra el resultado más eficaz, siendo el único tratamiento estadísticamente distinto al testigo absoluto con un valor de índice reproductivo de 1, lo que indica que la población a los 60 días de aplicados los productos era prácticamente la misma que la presentada al inicio del ensayo (Cuadro 1), además este tratamiento muestra un porcentaje de control del 35% (Figura 4).

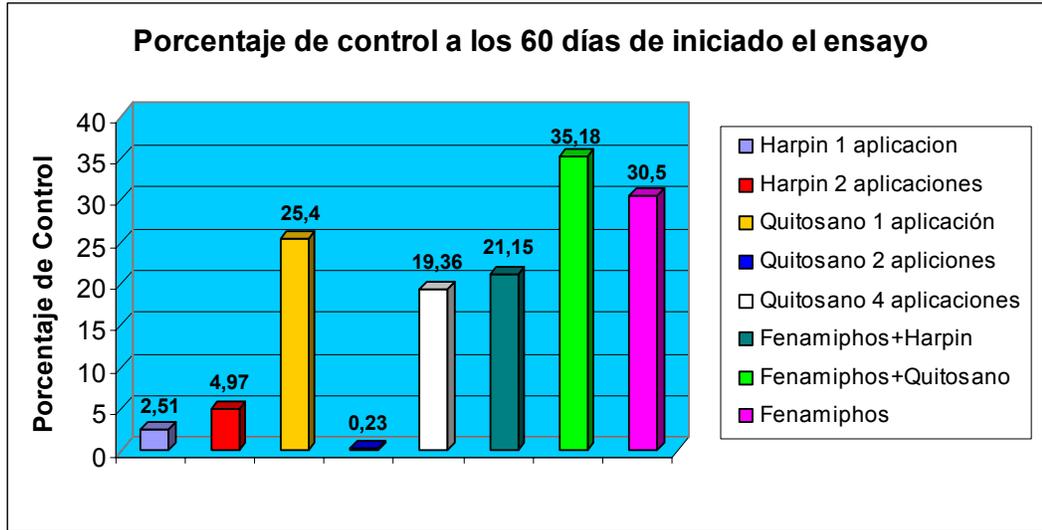


Figura 4. Porcentaje de control de los tratamientos a los 60 días de iniciado el ensayo sobre la población de *Tylenchulus semipenetrans*.

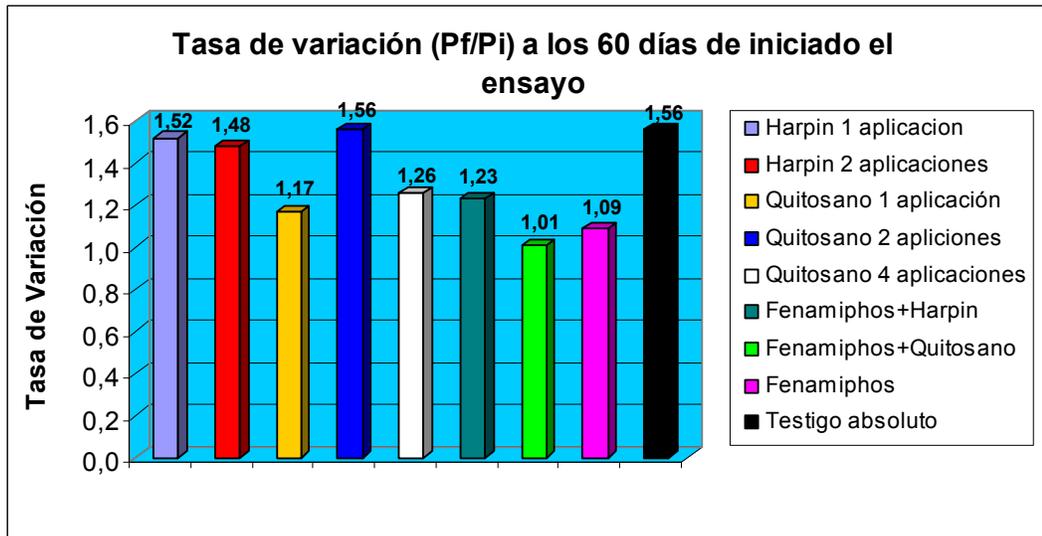


Figura 5. Tasa de variación de la población de *Tylenchulus semipenetrans* a los 60 días de iniciado el ensayo.

### 90 días de iniciado el ensayo

En la última evaluación realizada a los 90 días de iniciado el ensayo todos los tratamientos se comportaron estadísticamente iguales entre sí, no evidenciándose control alguno sobre la población de *Tylenchulus semipenetrans*.

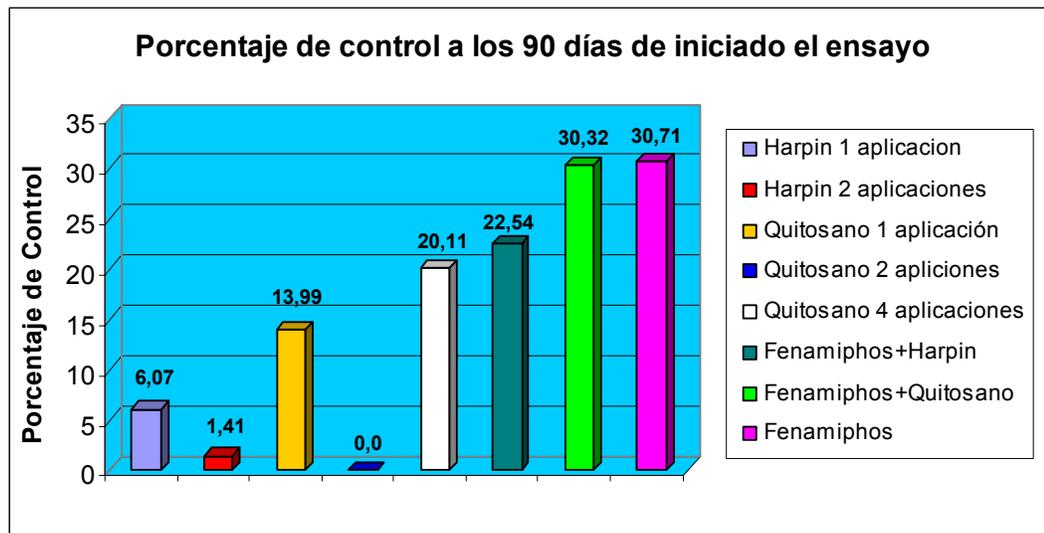


Figura 6. Porcentaje de control de los tratamientos a los 90 días de iniciado el ensayo sobre la población de *Tylenchulus semipenetrans*.

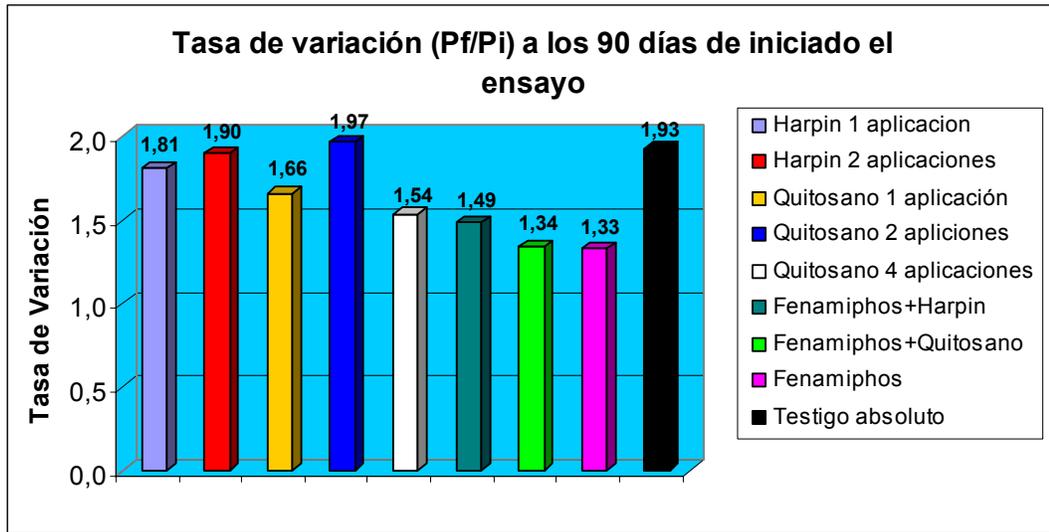


Figura 7. Tasa de variación de la población de *Tylenchulus semipenetrans* a los 90 días de iniciado el ensayo.

El análisis de los datos presentados señala que el efecto del producto Qitosano sobre la población de *Tylenchulus semipenetrans* no fue estadísticamente significativo a los 30 días de iniciado el ensayo (Cuadro 1).

Resultados similares a los presentados en este trabajo obtuvo Troncoso (2003), quien al evaluar el producto comercial Bioriego (i.a. Qitosano) a los 30 días de aplicado, no obtuvo diferencias estadísticas con respecto al testigo absoluto.

Como se puede apreciar en el Cuadro 1, los tres tratamientos en base a Qitosano mostraron un aumento de la población de *Tylenchulus semipenetrans* con respecto a la detectada al inicio del ensayo, obteniendo índices reproductivos ligeramente superiores a 1.

Resultados similares a los presentados a los 60 días de iniciado el ensayo con el ingrediente activo Qitosano obtuvieron Aballay y Flores (2000) en un replante de vid variedad Cabernet Sauvignon, en donde hallaron que si bien, en los tratamientos con Qitosano de todas formas se detecta un aumento de las poblaciones de nematodos

fitoparásitos por sobre el nivel inicial, este es menor que el que potencialmente podría ocurrir.

En otros resultados, obtenidos por González (1993), el tratamiento con un producto en base a quitina (Clandosan 618) en distintas dosis fue tan efectivo como el testigo químico (Fenamiphos 40% EC) en la supresión de nematodos parásitos de kiwis en producción.

El único tratamiento que se diferenció estadísticamente del testigo absoluto a los 60 días de iniciado el ensayo corresponde a Fenamiphos más Quitosano (Cuadro 1). Este resultado no se puede atribuir a la presencia de Quitosano, sino más bien, al tratamiento químico tradicional. Esto queda más claro al verificar que los tres tratamientos que incluyen Fenamiphos no se diferenciaron estadísticamente entre sí, por lo que el complemento de estos tratamientos, vale decir Quitosano y la proteína Harpin, no tienen una influencia respaldada estadísticamente en el control de *Tylenchulus semipenetrans*.

El modo de acción de este producto, pudo estar dado en primer lugar, por una estimulación del desarrollo de organismos que degradan materiales quitinolíticos, hecho estudiado por diversos autores entre ellos Spiegel *et al.* (1987) y Culbreath *et al.* (1986) quienes señalan que en suelos enmendados con quitina se produce un incremento de la población de microorganismos quitinolíticos específicos como bacterias y actinomicetes capaces de parasitar huevos de nematodos. Y en segundo lugar por la inducción de respuestas defensivas por parte del hospedero, como por ejemplo la producción de fitoalexinas, reportado por Reddy *et al.* (2000).

Con respecto a la proteína Harpin y a su posible capacidad para suprimir las poblaciones de *Tylenchulus semipenetrans*, los tratamientos de 1 y 2 aplicaciones mostraron ser estadísticamente iguales al testigo absoluto en todas las fechas de evaluación (Cuadro 1), por lo que no se estableció la presencia de efecto nematocida alguno.

En otros resultados tendientes a evaluar el efecto de la proteína Harpin sobre nematodos fitoparásitos, McLean y Lawrence (2002) utilizaron Messenger en combinación con aldicarb para el manejo de *Rotylenchus reniformis* en algodón. Los resultados obtenidos fueron más bien erráticos, mostrando en algunas localidades un aumento de los rendimientos de la semilla de algodón que llegó hasta 227 kg/ha comparado con el tratamiento con aldicarb solo.

Por su parte Caimanque (2004) utilizó la proteína Harpin en combinación con el organofosforado cadusaphos (n.c. Rugby) obteniendo valores de índice reproductivo no diferentes estadísticamente a la aplicación de Rugby solo.

El que no se hayan obtenido resultados satisfactorios en relación al control de *Tylenchulus semipenetrans* con la proteína Harpin podría deberse a que este producto, como se ha indicado anteriormente, no tiene un efecto tóxico sobre los nematodos fitoparásitos sino que más bien su efecto está relacionado con la activación de los sistemas de defensa propios de la planta, lo que no sería suficiente en el caso de tener poblaciones de nematodos tan altas como las existentes en el presente trabajo (Cuadro 1).

### **Evaluación de los tratamientos sobre la población de nematodos no fitoparásitos**

Al analizar el efecto de los tratamientos sobre la población de nematodos no fitoparásitos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos en ninguna de las fechas de evaluación efectuadas (Cuadro 2).

Con respecto a los tratamientos en los que se aplicó Quitosano, los índices reproductivos muestran un aumento progresivo de la población de nematodos no fitoparásitos a través del tiempo. Esto concuerda con los resultados obtenidos por González (1993), quien observó que el tratamiento con un producto a base de quitina produjo un incremento de los nematodos saprófagos.

Según Rodríguez-Kábana *et al.* (1984), estos nematodos podrían alimentarse de hongos, bacterias y otros desechos derivados de la quitina e incrementar su número en respuesta a la enmienda por algún tiempo. Es así que en un ensayo realizado en macetas con soya se determinó que el número de nematodos no fitoparásitos fue más alto en suelos con 0,5 a 1,0% de quitina que en suelos no enmendados.

Materiales con alto contenido de quitina generan nitrógeno amoniacal y además estimulan las actividades de la microflora quitinolítica del suelo, con lo que se produce un incremento notorio en las poblaciones de nematodos saprófitos, especialmente de los géneros *Rhabditis*, *Mononchus* y *Dorylaimus*, los que se alimentan de los nematodos parásitos (González, 1995).

Resultados similares a los entregados en el presente trabajo obtuvo Troncoso (2003), quién al evaluar el efecto de productos tales como Etoprofos y Quitosano sobre las poblaciones de nematodos no fitoparásitos, no observó diferencias estadísticamente significativas entre los diversos tratamientos.

Por otra parte, la no detección de diferencias significativas entre el tratamiento químico convencional (Fenamiphos) y el testigo absoluto concuerda con González (1991, 1993), quien luego de aplicar el nematicida Fenamiphos obtuvo un aumento en la población de saprófagos.

Cuadro 2. Índice reproductivo normalizado (R) y poblaciones iniciales y finales (N° de ejemplares de nematodos no fitoparásitos/250 cm<sup>3</sup> de suelo), para los tratamientos después de 30, 60 y 90 días de iniciado el ensayo.

<b>Tratamiento</b>	<b>Población Inicial<sup>Z</sup></b>	<b>Población Final P(30)</b>	<b>R 30 días de iniciado el ensayo</b>	<b>Población Final P(60)</b>	<b>R 60 días de iniciado el ensayo</b>	<b>Población Final P(90)</b>	<b>R 90 días de iniciado el ensayo</b>
Harpin 1 aplicación de 350 g/ha	1057	1892	1,085 a <sup>x</sup>	2522	1,128 a <sup>x</sup>	3300	1,162 a <sup>x</sup>
Harpin 2 aplicaciones de 350 g/ha	1345	1709	1,035 a	3929	1,152 a	3924	1,152 a
Quitosano 1 aplicación de 10 L/ha	1639	1538	0,985 a	3643	1,114 a	3240	1,103 a
Quitosano 2 aplicaciones de 5L/ha	1660	1750	1,009 a	3725	1,115 a	4280	1,132 a
Quitosano 4 aplicaciones de 5 L/ha	1327	1595	1,017 a	3143	1,126 a	3110	1,120 a
Fenamiphos más Harpin	1146	987	0,980 a	2616	1,130 a	2676	1,132 a
Fenamiphos más Quitosano	1400	1127	0,962 a	2972	1,107 a	3682	1,133 a
Fenamiphos, 17L/ha	2290	2002	0,985 a	3346	1,050 a	3086	1,029 a
Testigo	1339	2627	1,089 a	3826	1,144 a	3820	1,138 a

<sup>x</sup>: Valores unidos con letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas, según prueba Tukey ( $p \leq 0,05$ )

<sup>Z</sup>: Valores promedio de 5 repeticiones

$R = \log(Pf+1) / \log(Pi+1)$

### **Evaluación de los tratamientos sobre parámetros de vigor**

Al evaluar el efecto de los productos utilizados en el presente ensayo sobre los parámetros de vigor de las plantas, se puede advertir que, con respecto al número de brotes nuevos/m<sup>2</sup>, los tratamientos que presentaron las medias más altas corresponden a 2 aplicaciones de los productos Quitosano y de la proteína Harpin (Cuadro 3), aunque sin diferencia estadísticamente significativa.

En relación al parámetro largo de brotes nuevos tampoco existió diferencia estadística entre los tratamientos. No obstante lo anterior nuevamente el tratamiento de dos aplicaciones de Quitosano obtuvo la mayor media, esta vez junto a Fenamiphos (Cuadro 3).

Con respecto al parámetro de producción se puede observar que es con el tratamiento de 2 aplicaciones de la proteína Harpin (T2) con el cual se logró obtener la media más alta, aun cuando sin diferenciarse estadísticamente de los demás tratamientos (Cuadro 3). Esto marcaría una tendencia interesante en cuanto a las propiedades de la proteína Harpin, que como se ha descrito anteriormente, además de ser un producto para la supresión de una amplia gama de patógenos, sería capaz de promover un aumento de los rendimientos. Así lo comprobaron McLean y Lawrence (2002) quienes utilizaron la proteína Harpin (n.c. Messenger) en combinación con aldicarb para el manejo de *Rotylenchus reniformis* en algodón, logrando aumentar los rendimientos de la semilla de algodón 227 k/ha comparado con el tratamiento con aldicarb solo.

Finalmente refiriéndose al aspecto aéreo de las plantas se puede señalar que el testigo absoluto fue el tratamiento más afectado, no siendo diferente estadísticamente del resto de los tratamientos. Estos datos concuerdan con Aballay (1998), quien al utilizar la misma escala de vigor tampoco obtuvo diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 3. Número de brotes nuevos por m<sup>2</sup>, largo de brotes nuevos (cm), estimación de cosecha (k/tratamiento) y escala de vigor.

<b>Tratamiento</b>	<b>Numero de brotes nuevos/m<sup>2</sup><sup>Z</sup></b>	<b>Largo de brotes nuevos (cm)</b>	<b>Estimación de cosecha (k/tratamiento)</b>	<b>Escala de vigor</b>
Harpin 1 aplicación de 350 g/ha	6,20 a <sup>x</sup>	12,69 a <sup>x</sup>	95,48 a <sup>x</sup>	3,46 a <sup>y</sup>
Harpin 2 aplicaciones de 350 g/ha	7,13 a	12,50 a	111,32 a	3,16 a
Quitosano 1 aplicación de 10 L/ha	6,67 a	11,77 a	99,07 a	3,10 a
Quitosano 2 aplicaciones de 5L/ha	7,33 a	13,31 a	93,08 a	3,30 a
Quitosano 4 aplicaciones de 5 L/ha	5,33 a	11,58 a	84,64 a	3,26 a
Fenamiphos más Harpin	6,73 a	11,95 a	82,88 a	3,19 a
Fenamiphos más Quitosano	6,25 a	12,87 a	82,85 a	3,26 a
Fenamiphos, 17 L/ha	6,40 a	13,53 a	77,81 a	3,13 a
Testigo	6,33 a	10,74 a	78,56 a	3,03 a

<sup>x</sup>: Valores unidos con letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas, según prueba Tukey ( $p \leq 0,05$ )

<sup>y</sup>: Valores unidos con letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas, según prueba Friedman ( $p \leq 0,05$ )

<sup>Z</sup>: Valores promedio de 5 repeticiones

El que no se presentaran diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros de vigor evaluados en el presente trabajo se debe principalmente a que para la obtención de respuestas positivas por parte de toda la planta se requiere extender las evaluaciones a través del tiempo. Estos resultados coinciden con Gonzáles (1991), que señala que cualquiera que sea el método empleado en el control de nematodos, se requiere de al menos 3 temporadas consecutivas para obtener los resultados deseados.

Resultados similares a los entregados en el presente trabajo obtuvieron Caimanque (2004) y Troncoso (2003), quienes al evaluar el número de brotes nuevos/m<sup>2</sup>, no obtuvieron en una primera temporada diferencias estadísticas significativas.

## CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de alta infestación natural demostradas en el presente estudio, los tratamientos en base a los elicitores Quitosano y de la proteína Harpin, al ser aplicados como único tratamiento para la supresión de *Tylenchulus semipenetrans*, no resultaron ser efectivos en reducir significativamente la población de este fitoparásito.

La mezcla de los elicitores utilizados en el presente estudio con nematocidas convencionales no implica un incremento en la tasa de control de *Tylenchulus semipenetrans*.

**LITERATURA CITADA**

ABALLAY, E. 1991. Modo de acción y efectividad de los nematicidas en el control de nemátodos fitoparásitos en vides. Aconex 34: 23-25.

ABALLAY, E. 1995. El nematodo de los cítricos, *Tylenchulus semipenetrans*. p. 46-49. In: Aballay, E. y Magunacelaya, J.C. eds. Nematología Agrícola Básica. Santiago, Universidad de Chile. 76 p.

ABALLAY, E. 1996. El nematodo de los cítricos, *Tylenchulus semipenetrans*, en frutales y vides. P. 145-146. In: Avances en sanidad vegetal de frutales y vides. Universidad de Chile.

ABALLAY, E. 1998. Evaluación del control del nematodo de los cítricos, *Tylenchulus semipenetrans*, en zonas de alta infestación. Aconex 59:14-16.

ABALLAY, E. y FLORES, P. 2000. Nuevas alternativas para el control de nematodos fitoparásitos. Aconex 67:5-8.

AFIPA. 2002. Manual Fitosanitario. 1215 p.

BAKER, C., ORLANDI, E. and MOCK, N. 1993. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amilovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. Plant Physiology 102: 1341-1344.

BLAINE, P. 2000. [En línea]. EPA approves use of Cornell-discovered protein that enables plants to resist disease and insect while enhancing growth. Disponible en: <http://www.news.cornell.edu/release/april00/fireblight.bpf.html>. Leído el 03 de julio de 2003.

CAIMANQUE, S. 2004. Evaluación de diferentes épocas de aplicación de nematicidas en el control del nematodo de los cítricos (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb) en limoneros. Memoria de Título. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 62 p.

CAPDEVILLE, G., WILSON, C., BEER, S. and AIST, J. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested "Red Delicious" apple fruit. *Phytopathology* 92:900-908.

CARDENAS, G., CUELLAR, D. y CASALS, P. 1997. Aplicaciones de quitina y tosilitina como nematicida. *Boletín Sociedad Chilena Química* 42(4):535-546.

CHRISTIE, J. R. 1974. *Nemátodos de los vegetales, su ecología y control*. México, Limusa. 275 p.

CHRISTIE, J. and PERRY, V. 1951 Removing nematodes from soil. *Proceeding of Helminthological Society of Washington*. 18 (2):106-108.

COHN, E. 1972. Nematode disease of citrus. p. 215-244. *In*: Webster J. M. *Economic Nematology* Londo. Academic Press, London.

CULBREATH, A. K., RODRIGUEZ-KABANA, R. and MORGAN-JONES, G. 1986. Chitin and *Paecilomyces lilacinus* for control of *Meloidogyne arenaria*. *Nematropica* 16(2):153-166.

DESIKAN, R., REYNOLDS, A., HANCOCK, T. and NEILL, S. 1998. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochemistry Journal* 330: 115-120.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) 2003. [En línea]. Pesticides: Regulating pesticides Harpin Protein (006477). Disponible en: [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet\\_006477.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006477.htm). Leído el 03 de Septiembre de 2003.

FONTAINE, S. 1997. Efecto de los productos orgánicos sincosin y agrispon en el control del nematodo de los cítricos (*Tylenchulus semipenetrans*, Cobb) en limoneros (*Citrus limon*). Taller de licenciatura. Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía.

GONZALEZ, H. 1984. Principales problemas causados por nematodos fitoparásitos en Chile. Aconex 7:11-15

GONZALEZ, H.1987. El “nematodo de los citrus” (*Tylenchulus semipenetrans*) y la importancia de su estudio, en Chile. Aconex 17:5-8.

GONZALEZ, H. 1990. Efecto del aldicarb y el carbofurano en el control del “nematodo de los cítricos” *Tylenchulus semipenetrans* en limoneros y naranjos en producción. Aconex 27: 20-24.

GONZÁLEZ, H. 1991. La materia orgánica en la reducción de nemátodos parásitos, un buen complemento al control de productos químicos. Investigación y Progreso Agropecuario la Platina 65: 17-21.

GONZÁLEZ, H. 1993. Efectos de un nematicida orgánico en el control de nematodos parásitos de kiwis en producción. Revista Frutícola 14(2): 67-71

GONZÁLEZ, H. 1995. El control biológico de nematodos parásitos de plantas. Revista Frutícola 16(2): 63-72

GREENBERG, J. Programmed cell death: A way of life for plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 12094-12097

HAMMERSCHMIDT, R. 1999. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? Annual Review of Phytopathology 37: 285-306

LÁREZ, C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. Revista Iberoamericana de Polímeros 4(2): 91-109.

MACLEAN, K. and LAWRENCE, G. 2002. Evaluation of Messenger in combination with aldicarb or thiamethoxam for management of *Rotylenchulus reniformis* on cotton (abstract). Nematology 4(2): 297.

MAGUNACELAYA, J. C. y DAGNINO, E. 1999. Nematología agrícola en Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Serie de ciencias Agronómicas N° 2.

MIAN, I.H., GODOY, G., SHELBY, R.A., RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. and MORGAN-JONES, G. 1982. Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. Nematropica 12(1): 71-84.

ODEPA, 2003. [En línea]. Oficina de estudios y políticas agrarias. Estadísticas de la agricultura chilena. Estadísticas macrosectoriales y productivas. Disponible en: <http://www.odepa.cl/>. Citado: 15 de Septiembre del 2003

ORTUZAR, J. E. 1996a. Portainjertos para naranjo dulce, limonero, mandarino y pomelo. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad d Agronomía e Ing. Forestal. In: Avances en citricultura: nuevas variedades, portainjertos y establecimientos de huertos. Santiago, 20-21 de Agosto de 1996.

ORTUZAR, J. E. 1996b. Consideraciones para la elección de variedades de naranjas, mandarinas y limones. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad d Agronomía e Ing. Forestal. In: Avances en citricultura: nuevas variedades, portainjertos y establecimientos de huertos. Santiago, 20-21 de Agosto de 1996.

ORTUZAR, J. E., RAGA, V., MÁRTIZ, J., QUINTEROS, J. y ARENAS, M. 2002. Descripción de variedades de cítricos, ficha técnica N° 4. Aconex 77: 31-32.

PHILIPPI, I. 1989. Nematicidas, p. 165-200. En: Latorre, B. ed. Fungicidas y nematicidas; avances y aplicabilidad. Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile.

RAZETO, B. 2002. La fonología del limonero para efectos prácticos. Aconex 77: 10-15

RODRÍGUEZ-KABANA, R., MORGAN-JONES, G. and OWNLEY GINTIS, B. 1984. Effects of chitin amendments to soil on *Heterodera glycines*, microbial populations, and colonization of cysts by fungi. *Nematropica* 14(1): 11-25

REDDY, M.V., ANGERS, P., CASTAIGNE, F. and ARUL, J. 2000. Chitosan effects on blackmold rot and pathogenic factors produces by *Alternaria alternata* in postharvest tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125(6): 742-747.

SPIEGEL, Y., CHET, I. and COHN, E. 1986. Use of chitin for controlling plant-parasitic nematodes. *Plant and Soil* 98: 337-345

SPIEGEL, Y., COHN, E. and CHET, I. 1989. Use of chitin for controlling *Heterodera avenae* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Journal of Nematology* 21(3): 419-422

STICHER, L., MAUCH-MANI, B. and MÉTRAUX, J.P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270

TRONCOSO, R. 2003. Evaluación de nuevas alternativas de control del nematodo de los cítricos *Tylenchulus semipenetrans* Cobb en limoneros *Citrus limon* L. Memoria de Título. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 51p.