

# ALTERNATIVAS ECOLÓGICAS PARA EL CONTROL DE PSEUDOPERONOSPORA CUBENSIS (BERK. Y CURT.) ROSTOW EN PEPINO (*CUCUMIS SATIVUS* L.) BAJO CONDICIONES DE CASAS DE CULTIVO PROTEGIDO

Leanne Ortiz Guilián, Juan José Castellanos Linares, Sahily Fraga Ruiz, Odalis Meléndez Ferrer y Jesús Estrada Ortiz

## RESUMEN

La explotación intensiva de las casas de cultivo protegido, conduce al incremento de los problemas con las plagas, lo que trae como consecuencia un aumento en el número de las aplicaciones químicas; pero la utilización de plaguicidas de alta residualidad, sobre todo en las fases de producción-cosecha, provocan daños a la salud humana y al medio ambiente; por lo que es necesario ir a la búsqueda de alternativas para el control de las enfermedades en estos sistemas. Se determinó la inhibición ejercida por diferentes concentraciones de los bioproductos del Nim (NeoNim 60 CE y OleoNim 80 CE) y una solución de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, sobre la germinación conidial de *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. Y Curt) Rostow, causante de la enfermedad mildiu vellosa, limitante del cultivo del pepino en Cuba. También se estudió en casas de cultivo protegido ubicadas en el INIFAT, la efectividad de las aplicaciones alternas de estos bioproductos (solos y combinados), en diferentes épocas de siembra durante tres años. Los bioproductos mostraron un efectivo control en la inhibición de la germinación de los conidios de *P. cubensis* y en las aplicaciones realizadas en las diferentes siembras efectuadas. Los tratamientos basados en las combinaciones de (*B. subtilis*, NeoNim 60 y OleoNim 80), (*B. subtilis* y Oxicloruro de Cobre) aplicados de forma alterna cada siete días, ejercieron un buen control del patógeno igual que los productos comerciales utilizados en la producción y constituyen estrategias más económicas y ecológicas para el control del mildiu vellosa en casas de cultivo protegido.

**Palabras claves:** pepino, *Pseudoperonospora cubensis*, control

**Ecological alternatives for the control of *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. and Curt). Rostow in cucumber (*Cucumis sativus* L.) under conditions of greenhouse crops**

## ABSTRACT

The intensive development of greenhouse crops increases the problems with pests, resulting in an increment in the number of chemical applications. The use of high residue insecticides, especially in the production - harvest phases, they provoke damages the human health and the environment. Therefore it is necessary to look for

---

Lic. Leanne Ortiz Guilián, Especialista del Grupo de Protección de Plantas del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT).

✉ fitoplantas@inifat.co.cu

alternatives to control the diseases in these systems. The inhibition exerted by different concentrations of Nim bioproducts (NeoNim 60 CE and OleoNim 80 CE) and a solution of *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, on the conidial germination of *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. And Curt) Rostow was determined. The latter causes the mildiu downy, the most important disease of the cucumber crop in Cuba. The effectiveness of the alternate applications of these bioproducts (alone and combined) was also studied in greenhouse crops located in the INIFAT, in different sowing dates for three years. The bioproducts showed an effective control in the inhibition of the conidial germination of *P. cubensis* and in the applications carried out in different sowing dates. The treatments based on bioproducts combinations (*B. subtilis*, NeoNim 60 and OleoNim 80; *B. subtilis* and Copper Oxichloride) applied of alternate form every seven days, were as good as the production commercial witness in controlling the pathogen and they constitute a more economic and ecological strategy for controlling the downy mildiu in greenhouse crops.

**Key words:** Cucumber, *Pseudoperonospora cubensis*, control

## INTRODUCCIÓN

El pepino (*Cucumis sativus* L.) es un cultivo muy importante pues ocupa el cuarto lugar entre las hortalizas de mayor consumo en el mundo. El cultivo se ve afectado por numerosos factores climáticos y agronómicos que provocan grades dificultades relacionadas con el control de las plagas y enfermedades, sobre todo bajo condiciones de campo, por lo que su producción en Cuba se hace en extremo temporal (Bandín, 1995; IIHLD, 1999) y el rendimiento que se obtiene en condiciones de producción a pleno sol, es bajo (Del Busto *et al.*, 2005).

La agricultura cubana en sus esfuerzos para garantizar las cantidades y calidades de las hortalizas, se ha encaminado a la búsqueda e introducción de alternativas para la producción durante todo el año con altos rendimientos y estabilidad, entre las que se encuentran los Sistemas de Cultivo Protegido (SCP); en el caso del pepino se obtienen hasta 100 t/ha, si se propicia un manejo agronómico adecuado y en especial, una acertada estrategia fitosanitaria (Casanova *et al.*, 2007).

El ambiente de invernadero (SCP), con niveles altos de humedad y temperatura proporciona un medio adecuado para el desarrollo de hongos, que son una amenaza constante para los cultivos protegidos (MINAG, 1996). Especial atención merecen las enfermedades, siendo el mildiu vellosa, ocasionado por *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. Y Curt.) Rostow, la de mayor importancia económica y la

limitante para el desarrollo del cultivo de pepino en Cuba. El mildiu puede dañar severamente el follaje, causar grandes afectaciones y más del 50 % de pérdidas en las cosechas (Rodríguez *et al.*, 1998; Martínez, *et al.*, 2007; Boucher, 2009; McGrath, 2009). Por lo común su control se establece con fungicidas de alta residualidad, que generan contaminación al ambiente y resistencia en el patógeno (MINAG-CNSV, 1999; Cristóbal *et al.*, 2006).

La explotación más intensiva del sistema de cultivo protegido, incrementa los problemas con las plagas, lo que trae como consecuencia un aumento en el número de las aplicaciones químicas en la búsqueda por alcanzar altos rendimientos; pero la utilización de productos con término de carencia prolongados, sobre todo en las fases de producción-cosecha, implica algunas dificultades como el resurgimiento de plagas primarias y secundarias, el desarrollo de resistencia genética, la contaminación del medio ambiente y afectaciones a la salud humana (Batista *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2006).

En el manejo de enfermedades es necesario ir a la búsqueda de otros métodos de control, con el objetivo de disminuir al máximo el uso de productos fitosanitarios y garantizar la producción, donde los aspectos ecológicos y los residuos de las producciones estén en primer lugar, entre ellos se encuentran el uso de productos de origen biológico y botánico (Reynoso *et al.*; 2006). *Bacillus subtilis* es considerada entre las bacterias más importante en lo que se refiere a la producción de sustancias antibióticas, endotoxinas y

proteínas con actividad antifúngica (Hernández *et al.*; 2008). Sus productos son capaces de controlar diversas enfermedades provocadas por hongos como *Botrytis*, *Mildius*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Rhizoctonia*, *Pyricularia*, etc y bacterias como *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, etc. (Agris, 1997; Soffia, 2008). Los productos derivados del Nim son efectivos contra una gama considerable de especies de insectos, ácaros y nematodos que constituyen plagas de importancia económica en la agricultura cubana, su efectividad se ha reportado a nivel internacional en más de 360 de ellas (Estrada y López, 2003; Scholaeen, 2005). Existen muy pocos reportes del uso del Nim en el control de patógenos vegetales, Achimu y Scholoser (1992) reportaron su acción fungicida frente al mildiu veloso de las uvas (*Plasmopara viticola* (Berk y Curtis) Berl. y de Tori). Hernández *et al.* (2001) reportan el uso del Nim en Cuba para el control de la mancha concéntrica (*Alternaria tenuis* Ness.) y la marchitez causada por *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Sclerotium* sp. El objetivo de este trabajo fue determinar la posibilidad de aplicaciones de productos biológicos, botánicos y fungicidas de baja residualidad como alternativas en el control del patógeno *P. cubensis* bajo condiciones de cultivo protegido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Efecto de los bioproductos del Nim y de *Bacillus subtilis* sobre la germinación conidial de *Pseudoperonospora cubensis*

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), utilizando los productos del Nim (NeoNim 60 CE y OleoNim 80 CE) (Estrada y López, 1998) y una solución de *B. subtilis* para el estudio del control de la germinación de los conidios de *P. cubensis* obtenidos de aislados de pepino en casas de cultivo protegido.

Para preparar la solución bacteriana se utilizó una cepa de *Bacillus subtilis* aislada de campos de arroz en el INIFAT, la cual se inoculó en medio líquido boniato y se mantuvo en fermentación estática bajo condiciones

de laboratorio a temperatura de 27°C (Castellanos *et al.*, 1996). Los conidios de *Pseudoperonospora cubensis* se colectaron con un pincel, a partir de hojas traídas directamente del campo con lesiones características del patógeno con abundante esporulación y montadas en cámara húmeda. Se obtuvo una suspensión de 2,4. 10<sup>4</sup> conidios/ml. Las suspensiones se prepararon con agua destilada estéril y una gota de Tween al 0,1 %.

Las concentraciones empleadas de cada producto (NeoNim 60 CE y OleoNim 80 CE y la solución de *Bacillus subtilis*) fueron de: 0,5 %, 1 %, 10 %, 25 % y 50 % y un testigo con agua estéril. Los tratamientos se montaron sobre portaobjetos donde se mezclaron las concentraciones de los bioproductos y los conidios *Pseudoperonospora cubensis*, estos se colocaron en placas petri con papel de filtro previamente humedecido a temperatura ambiente. Se emplearon tres réplicas por cada variante en estudio.

Las lecturas para determinar la germinación de los conidios se realizaron a las 24 horas de montadas las preparaciones, se contaron 100 conidios por tratamiento y se determinaron los germinados y los porcentajes de inhibición, clasificándose la respuesta de cada bioproducto (*B. subtilis* y bioinsecticidas del Nim) según la escala propuesta por Castellanos *et al.*, (1995): Bajo control, del 1-25 % de la inhibición conidial; Control regular, del 26-50 %; Buen control, del 51-80 %; Muy buen control, del 81-90 % y Excelente control del 91-100 %.

### Efectividad de las aplicaciones del biocontrol *B. subtilis*, los derivados del Nim y fungicidas, solos y combinados, en la lucha contra el patógeno *Pseudoperonospora cubensis* bajo cultivo protegido

Los experimentos se llevaron a cabo en diferentes épocas de siembra durante tres años en Casas de Cultivo Israelí y Españolas, ubicadas sobre suelo Ferralítico Rojo, en el INIFAT. La variedad de pepino utilizada fue el híbrido “HA- 454”. Las plantas se sembraron a doble hilera, separadas a 60 cm. y 40 cm. entre plantas, a tresbolillo y el área se dividió en parcelas de 12 m<sup>2</sup>. Se cumplieron con todas las Normas Técnicas Orientadas por el Manual para Casas de Cultivo Protegido (MINAG, 1999).

Se usó un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones para cada tratamiento. Las aplicaciones se realizaron con una mochila manual y se iniciaron siete días después de plantado el cultivo. Las evaluaciones se realizaron semanalmente al 50 % de las plantas en estudio, teniendo en cuenta una escala de grados del cero al cinco (CNSV-MINAG, 2002), y se determinaron los índices de infección a través de la fórmula de Townsend y Heubergerd (1948) citado por Ciba-Geygi (1981). Los datos se procesaron mediante el sistema estadístico SPSS version 9.0 a través de un análisis de varianza y la medias fueron comparadas mediante la prueba de Tuckey al 5 % de probabilidad. Los rangos en porcentaje se transformaron por  $2 \arcsin \sqrt{\%}$ .

En la Tabla 1 se muestran los tratamientos utilizados solos y combinados, en aplicaciones alternas cada cuatro y siete días. La solución de *B. subtilis* se obtuvo de la siembra de la bacteria en medio líquido de boniato por fermentación estática, se tomaron 200 ml/L de agua, con una concentración final de  $1,10^4$  ufc/ml, con dosis de aplicación final de 20 L/ha (Castellanos *et al.*, 1996). En el tercer año se realizó una verificación de la efectividad alcanzada por las aplicaciones alternas de las combinaciones de *Bacillus subtilis* y Oxidloruro

de Cobre 50 PH (Bs-Químico) y la de *B. subtilis* con los derivados del Nim (Bs-ON-NN), productos menos contaminantes del medio ambiente, frente a la combinación de Oxidloruro de Cobre 50 PH + Mancozeb 80 PH, recomendada en la práctica para el control de enfermedades en estas condiciones (Químico II).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

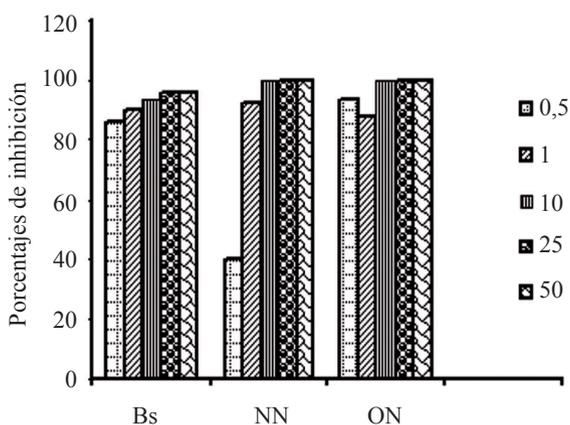
### Efecto de los bioproductos del Nim y de *Bacillus subtilis* sobre la germinación conidial de *Pseudoperonospora cubensis*

Al comparar los resultados de las concentraciones empleadas de los bioproductos teniendo en cuenta el 98 % de germinación de los conidios obtenido a las 24 horas de incubación en el testigo (agua estéril), se aprecia que los porcentajes de inhibición conidial alcanzados con la solución bacteriana de *B. subtilis*, estuvieron entre el 86 y 96 % en todas las concentraciones (Figura 1), lo que representa según la escala propuesta un control de muy bueno a excelente, con valores superiores al 90 % en las concentraciones al 10, 25 y 50 %. Ello da idea de la potencialidad de empleo de *B. subtilis* para el control del patógeno.

**Tabla 1.** Variantes empleadas en los experimentos

Clave	Productos	Dosis	Frecuencia aplicación
T	Testigo. Sin aplicación.	--	--
Bs	<i>Bacillus subtilis</i> . Solución bacteriana.	20 L/ha	4 días
BsE	<i>Bacillus subtilis</i> . Metabolitos.	20 L/ha	4 días
BsT	<i>Bacillus subtilis</i> + Tensoactivo (0,5 ml./L)	20 L/ha	4 días
ON	Oleonim 60 CE (5 ml./L)	1 L/ha	4 días
NN	Neonim 80 CE (10 ml./L)	1,5L/ha	4 días
ON - NN	Oleonim 60 CE + Neonim 80 CE (5 + 10 ml/L)	1 + 1,5 L/ha	7 días
Bs- ON- NN	<i>Bacillus subtilis</i> + Oleonim 60 CE + Neonim 80 CE (Solución bact. + 5 + 10 ml./L)	20 L/ha + 1 + 1,5 L/ha	7 días
Bs – Quím.	<i>Bacillus subtilis</i> + Oxidloruro de Cobre 50 PH	20 L/ha + 4 Kg/ha	7 días
Químico I	Oxidloruro de Cobre 50 PH + Mancozeb 80 PH	4,0 + 3,0 Kg/ha	4 días
Químico II	Oxidloruro de Cobre 50 PH + Mancozeb 80 PH	4,0 + 3,0 Kg/ha	7 días

En los conidios se observaron deformaciones y oscurecimientos, así como variación en el contenido celular y escape de este hacia el exterior. Los resultados expuestos concuerdan con los obtenidos por Sánchez *et al.* (2003), los cuales demostraron que después de incubar durante 24 horas los conidios de *Peronospora tabacina* Adams en una solución de *B. subtilis* ocurrió una inhibición del 80 % de la germinación, además de producirse un oscurecimiento rápido de los mismos, la desintegración de la membrana conidial y las paredes de los conidióforos, el retorcimiento exagerado de estos en la base y la expulsión del contenido citoplasmático.



**Figura 1.** Porcentajes de inhibición de la germinación conidial de *P. cubensis* con el empleo de los productos del Nim y la solución bacteriana de *B. subtilis*

Las formulaciones del Nim (NeoNim 60 y OleoNim 80) mostraron un control efectivo sobre la germinación conidial, excepto en la concentración más baja del NeoNim que solo redujo a un 40 % el número de esporas no germinadas (Figura 1). Se observó oscurecimiento y deformación de los conidios de igual manera que en la solución de *B. subtilis*. Es importante destacar que a las concentraciones de 0,5 % en el caso de OleoNim 80 y 1 % para NeoNim 60, se alcanzaron el 94 y 92 % de inhibición de la germinación, clasificándose el control de excelente. Además estas concentraciones (5 ml/L y 10 ml/L) son las recomendadas para las aplicaciones de las formulaciones del Nim contra diferentes plagas en los cultivos (ají, frijol, tomate, pepino, col, melón) reportadas por Estrada y López en 1998, por lo que el

resultado expuesto permite aumentar las posibilidades de uso de los derivados del Nim, no solo contra plagas de insectos, sino también contra un patógeno fungoso de gran importancia económica en el cultivo del pepino en Cuba.

### Efectividad de aplicaciones del biocontrol *B. subtilis*, de los derivados del Nim y fungicidas (solos y combinados) en la lucha contra el patógeno *P. cubensis* bajo cultivo protegido

#### Primer Año

En la siembra de invierno se puede apreciar que hubo diferencias significativas de todos los tratamientos usados con respecto al testigo (Tabla 2), mostrando medias de infección entre 3 y 5 %. Aunque no existen diferencias significativas entre los tratamientos, no obstante consideramos que los tratamientos combinados con Bs-ON-NN mostraron una tendencia al aumento del control de la enfermedad.

**Tabla 2.** Acción de los tratamientos frente a *P. cubensis* en la siembra de invierno del primer año

Tratamientos	<i>P. cubensis</i>	
	% infección	Datos Transformados Tukey $\alpha=0,05$
Testigo	9,50	1,454 a
BsT c/4d	5,16	1,361 b
ON c/4d	4,91	1,384 b
Bs-Químico c/7d	4,16	1,377 b
NN c/4d	4,10	1,370 b
Bs c/4d	3,18	1,352 b
Bs-ON-NN c/7d	3,11	1,345 b
Químico II c/7d	3	1,339 b
ET*		0,067
CV (%)		4,43

Tratamientos con las mismas letras son estadísticamente iguales al 0,05 % de significación según la prueba de Tukey

En la siembra de primavera (Tabla 3), los tratamientos Bs-Químico, BsT y BsE no presentan diferencias con el testigo, pero si el resto de los tratamientos, mostrando efectividad apreciable las aplicaciones de la solución bacteriana de *B. subtilis* (Bs) y los bioproductos del

Nim (NeoNim 60 y OleoNim 80) aplicados solos o combinados entre sí (ON, NN, ON-NN, Bs-ON-NN). El mejor resultado se obtuvo con NN cuya media fue inferior al 1 % aún bajo las condiciones favorables que ofrece esta época del año para la diseminación y establecimiento de la enfermedad, incluso superior al tratamiento con fungicidas más intenso (Químico I c/4 días), aunque es también apreciable el control alcanzado por ON. Al respecto Achimu y Schollosser (1992) probaron el doble comportamiento de extractos y aceites de Nim que muestra acción fungicida frente al mildiu veloso de las uvas (*Plasmopara viticola* (Berk y Curtis) Berl. y de Tori).

En la siembra de verano (Tabla 3), de nuevo los tratamientos de derivados del Nim (NN, ON, Bs-ON-NN) y *Bacillus subtilis* (Bs-Químico, Bs y BsT) alcanzaron la mayor reducción de los porcentajes de infección con valores entre 0,19 y 2,27 y diferencias significativas con respecto al testigo, resultando ser los más efectivos frente al mildiu veloso bajo estas condiciones.

Se cree que gran parte del efecto de los extractos de plantas sobre las enfermedades, más que deberse a algún tipo de toxicidad directa, se produce por el

fortalecimiento estructural de esta, incrementando su resistencia a la penetración de los micelios de los hongos y a las picaduras de insectos chupadores como los pulgones, o bien estimulando un desarrollo vigoroso para superar un ataque (Lampkin, 1998). Jeyarajan *et al.*, en 1990 informaron que la incidencia de la pudrición de la raíz de frijol de soya, causada por *Macrophomina phaseolina*, disminuyó al utilizar enmiendas al suelo a base de tortas de Nim, con lo que alcanzaron iguales resultados a las aplicaciones al suelo con el fungicida Quintosene.

### Segundo Año

La Tabla 4 muestra que en la siembra de invierno los tratamientos con la solución de *B. subtilis* (Bs) y los bioproductos del Nim (NN y ON) aplicados solos cada cuatro días, resultaron ser los más efectivos y los únicos que mostraron diferencias significativas respecto al testigo con valores inferiores a 1 %, lo cual confirma su potencialidad en la lucha contra la enfermedad mildiu veloso en el cultivo del pepino, incluso con superioridad a la acción de los productos químicos, manteniendo las tendencias encontradas en los experimentos anteriores.

**Tabla 3.** Acción de los tratamientos frente a *P. cubensis* en la siembra de primavera y verano del primer año

Primavera			Verano		
Tratamientos	% infección	Datos Transformados Tukey $\alpha=0,05$	Tratamientos	% infección	Datos Transformados Tukey $\alpha=0,05$
Testigo	26,0	1,487 a	Testigo	8,80	1,424 a
Bs-Químico c/4d	20,27	1,407 ab	Químico I c/4d	5,65	1,416 a
BsT c/4d	18,12	1,386 ab	ON-NN c/7d	3,57	1,408 ab
BsE c/4d	12,71	1,357 abc	BsE c/4d	3,21	1,406 ab
ON-NN c/7d	11,27	1,279 bcd	BsT c/4d	2,27	1,382 bc
Bs-ON-NN c/7d	11,51	1,277 bcd	Bs c/4d	1,16	1,376 bcd
Bs c/4d	9,71	1,275 bcd	Bs-Químico c/7d	0,82	1,358 cde
Químico II c/7d	6,30	1,262 bcd	Bs-ON-NN c/7d	0,80	1,350 cde
ON c/4d	5,56	1,180 cde	ON c/4d	0,77	1,344 de
Químico I c/4d	5,06	1,123 de	NN c/4d	0,62	1,332 ef
NN c/4d	0,97	1,040 e	Químico II c/7d	0,19	1,302 f
ET*		0,175	ET*		0,034
CV (%)		4,80	CV (%)		4,62

Tratamientos con las mismas letras son estadísticamente iguales al 0,05 % de significación según la prueba de Tukey

**Tabla 4.** Acción de los tratamientos frente a *P. cubensis* en la siembra de invierno del segundo año

Tratamientos	<i>P. cubensis</i>	
	% infección	Datos Transformados Tukey $\alpha= 0,05$
Testigo	9,58	1,613 a
BsE c/4d	2,81	1,501 ab
BsT c/4d	2,46	1,493 ab
Químico I c/4d	2,34	1,484 ab
Bs-Químico c/7d	2,07	1,459 ab
Químico II c/7d	1,85	1,457 ab
ON-NN c/7d	1,76	1,446 ab
Bs-ON-NN c/7d	1,44	1,441 ab
ON c/4d	0,74	1,390 b
NN c/4d	0,59	1,342 bc
Bs c/4d	0,56	1,330 c
ET*		0,091
CV (%)		4,56

Tratamientos con las mismas letras son estadísticamente iguales al 0,05 % de significación según la prueba de Tukey

En la siembra de primavera los tratamientos que más disminuyeron la infección del hongo *P. cubensis*, fueron el Químico II, Bs, NN, Químico I, Bs-Químico, ON y Bs-ON-NN, los cuales mostraron diferencias significativas con el testigo, pero no entre ellos (Tabla 5). De forma general se repitió que los menores valores de los promedios de infección se correspondieron con los tratamientos basados en aplicaciones de *B. subtilis* y NeoNim solos, seguidos de la combinación de *B. subtilis* con Oxiclورو de cobre.

Arysta (2008) refiere que un biofungicida obtenido de una cepa de *B. subtilis*, actuaría a través de varios mecanismos de acción importantes en el manejo de la resistencia a fungicidas químicos o sintéticos tradicionales mediante la mezclas o alternancias se induciría la producción de sideróforos, que previenen la germinación de esporas de los hongos patógenos, o mediante la producción de antibióticos del tipo Bacilysin e Iturin que son altamente fungotóxicos, o durante la competencia por el sustrato en la rizosfera y filosfera con patógenos de plantas, o bien en la inducción de resistencia al instalarse en las raíces y hojas, lo que induciría a la planta a producir

fitoalexinas que le dan resistencia al ataque de hongos, bacterias y nemátodos.

En la siembra de verano los tratamientos de Químico I, Químico II, NN, Bs-On-NN, Bs-Químico y Bs otra vez difieren significativamente con respecto al testigo en el control de *P. cubensis* (Tabla 5), con valores promedios siempre inferiores a este, lo que vuelve a ratificar las posibilidades de lucha empleando tratamientos de origen botánico y biológico contra la enfermedad mildiu vellosa, causante de grandes pérdidas económicas, así como con productos químicos como el Oxiclورو de cobre, aprobados por las normas para producciones orgánicas (IFOAM), con el fin de evitar o disminuir las contaminaciones ambientales y afectaciones al hombre causadas por las aplicaciones frecuentes de plaguicidas. Este resultado se corrobora lo planteado por Castellanos *et al.* (2004) quienes determinaron que los tratamientos realizados a partir de combinaciones de fungicidas sintéticos (Zineb y Oxiclورو de cobre) y biológicos (*Bacillus subtilis*) mostraron mejor comportamiento que el resto en el control de *Alternaria porri* en cebolla.

**Tabla 5.** Acción de los tratamientos frente a *P. cubensis* en la siembra de primavera y verano del segundo año

Primavera			Verano		
Tratamientos	% infección	Datos Transformados Tukey $\alpha= 0,05$	Tratamientos	% infección	Datos Transformados Tukey $\alpha= 0,05$
Testigo	26,95	1,309 a	Testigo	1,33	1,561 a
BsE c/4d	25,61	1,306 a	BsE c/4d	0,82	1,559 a
BsT c/4d	21,51	1,265 ab	BsT c/4d	0,70	1,552 ab
Bs-ON-NN c/4d	21,39	1,248 abc	ON-NN c/7d	0,46	1,537 abc
ON-NN c/7d	21,29	1,237 abc	ON c/4d	0,40	1,535 abc
Bs-ON-NN c/7d	21,13	1,218 bcd	Bs c/4d	0,38	1,530 bc
ON c/4d	19,35	1,210 bcd	Bs-Químico c/7d	0,36	1,529 bc
Bs-Químico c/7d	17,19	1,206 bcd	BS-ON-NN c/7d	0,31	1,526 bc
Químico I c/4d	16,78	1,203 bcd	NN c/4d	0,17	1,516 cd
NN c/4d	14,98	1,192 bcd	Químico II c/7d	0,06	1,508 cd
Bs c/4d	14,23	1,167 cd	Químico I c/4d	0,05	1,495 d
Químico II c/7d	11,81	1,141 d	ET*	1,33	0,029
ET*		0,088	CV (%)		4,55
CV (%)		4,74			

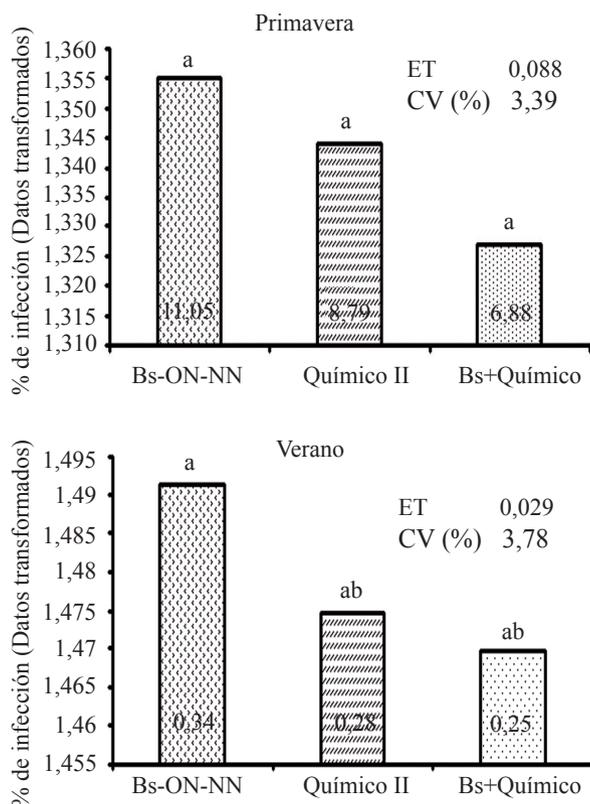
Tratamientos con las mismas letras son estadísticamente iguales al 0,05 % según la prueba de Tukey

Los resultados de las investigaciones demostraron que la solución bacteriana de *Bacillus subtilis* y derivados del Nim (NeoNim 60 y OleoNim 80) aplicados solos resultaron efectivos en la lucha contra el patógeno *Pseudoperonospora cubensis* en las siembras efectuadas en los dos años en estudio, pero la esencia del manejo de enfermedades debe estar basada en aplicaciones con productos específicos, buscando alternancia de las sustancias empleadas para evitar la aparición de resistencia; es importante no emplear tratamientos excesivos de plaguicidas que no sean necesarios y alcanzar producciones con bajos residuos de agroquímicos (Carluccio *et al.*, 2006). Dado que el mildiu vellosa ha desarrollado resistencia a los fungicidas de manera muy rápida, una medida importante para el manejo de las plagas es la alternancia constante de los productos que resulten efectivos (Batista *et al.*, 2004), de manera que no se produzcan alteraciones notables en el equilibrio del agroecosistema, así como la interferencia en la dinámica poblacional de los microorganismos participantes y el control natural presente. Por los resultados de las diferentes épocas de

siembra, se seleccionaron los siguientes tratamientos para la extensión de los mismos en las siembras del tercer año las aplicaciones alternas de las combinaciones de *Bacillus subtilis* (solución bacteriana) y Oxícloruro de Cobre 50 PH (Bs-Químico), la de *B. subtilis* con los derivados del Nim (Bs-ON-NN) y Oxícloruro de Cobre 50 PH + Mancozeb 80 PH, recomendada en la práctica para el control de enfermedades en estas condiciones (Químico II).

### Tercer Año

Al realizar los ensayos finales para puntualizar las diferencias entre tres de las variantes más promisorias (Bs- Químico, Bs-ON-NN y Químico II), se encontró que los tratamientos seleccionados no presentaron diferencias significativas en el control del patógeno *P. cubensis* durante las siembras de primavera y verano (Figura 2) y se produjo una disminución de las medias de infección alcanzadas con respecto a las del testigo en los años anteriores, por lo que se considera que los tratamientos son adecuados para incluirlos en la lucha contra la enfermedad.



Tratamientos con las mismas letras son estadísticamente iguales al 0,05 % según la prueba de Tukey

**Figuras 2.** Acción de los tratamientos frente a *Pseudoperonospora cubensis* en la siembra de primavera y verano del tercer año

## Análisis económico

La tendencia actual en el manejo de enfermedades es ir a la búsqueda de alternativas que sustituyan al control químico. En el cultivo protegido la producción de pepino tiene una duración de 100 días, relacionadas con sus cinco fases de desarrollo. En la Tabla 6 se muestran los fungicidas autorizados para el cultivo del pepino según el Programa de Defensa para Casas de Cultivos en la Campaña 2009, que considera productos a emplear, precios, dosis, términos de carencia y costo de aplicación para una hectárea.

Los productos utilizados para la prevención y el control de esta enfermedad son en su mayoría importados y tienen un alto costo en el mercado internacional. Teniendo en cuenta el número de aplicaciones programado para cada producto y su costo de aplicación en una hectárea, el monto total de las aplicaciones de fungicidas para el control del mildiu veloso durante todo el ciclo productivo sería de \$ 513,46 USD, con un costo equivalente en moneda nacional, ya que estos son subsidiados por el Estado Cubano.

Analizando el término de carencia de los productos (tiempo en días transcurridos desde la última aplicación y la cosecha) y el número de aplicaciones programadas para el cultivo (19) durante los 100 días del ciclo, podemos observar que en el período de cosecha intensivo a realizar (cada dos días) en las casas de cultivo protegido, la utilización de estos fungicidas se vería limitada por el tiempo de residualidad, que va desde

**Tabla 6.** Programas de Defensa para Casas de Cultivos. Campaña 2009. Grupo Empresarial de Cultivos Varios

Fungicidas	Precio (USD)	Dosis L ó kg/L	Término de carencia (días)	Costo de aplicación (USD)	# t	Costo No de aplicación (USD)
Mancozeb 80 PH	4,086	3	7	12,26	4,00	49,04
Ridomil Gold Combi GD45	13,57	2,5	20	33,92	2,00	67,84
Verita GD (4,44+66,7)	18,52	3	7	55,55	2,00	111,1
Cuproflow 37,75 SC (Oxicloruro de cobre)	5,783	3	NA	17,35	6,00	104,1
Sereno GD (10+50)	24,082	1,5	7	36,12	2,00	72,24
Positron Duo 69 PH	13,894	2,5	7	34,74	1,00	34,74
Cosmos SC 62,5	9,3	4	7	37,2	2,00	74,4
Total	89,235			227,14	19,00	513,46

Leyenda: NA = no aplicable # t = No. de tratamientos

siete hasta 20 días, excepto en el caso del Oxiclورو de cobre que no presenta términos de residualidad para el cultivo. Tales aplicaciones sistemáticas traen consigo aumentos en los costos de producción, contaminación ambiental y daños a la salud humana.

Los resultados de esta investigación muestran nuevas estrategias de lucha para el control de la enfermedad mildiu vellosa, basadas en la aplicaciones alternas de la solución bacteriana de *Bacillus subtilis*, los bioproductos del Nim (NeoNim 60 CE y OleoNim 80 CE) y de *B. subtilis* con el fungicida de contacto Oxiclورو de Cobre 50 PH. E.

En la Tabla 7 se aprecia que para la elaboración de un litro de la solución bacteriana, se necesita un litro de medio Boniato, con un valor de \$ 0,052 USD/L y 0,90 \$ MN/L y se aplica en dosis de 20 L/ha (Castellanos *et al.*, 1996). En el caso de los productos derivados del Nim inscritos en el Registro Oficial de Plaguicidas (CNSV, 2007), el OleoNim 80 CE alcanza un costo de \$ 1,30 USD y 32,00 \$ MN/L, se utiliza a dosis de 1 L/ha y presenta un periodo de residualidad de cinco días. El NeoNim 60 CE tiene un costo de \$ 2,50 USD/L y 60,00 \$ MN/L, se aplica a dosis de 1,5 L/ha y tiene cinco días de residualidad entre una aplicación y otra.

Al realizar una programación de las aplicaciones alternas de *B. subtilis*, NeoNim y OleoNim, teniendo en cuenta el costo de la aplicación por hectárea y el número de las aplicaciones por fungicida, el costo de aplicación sería de \$ 21,39 USD y 371,4 MN para todo el ciclo del cultivo y en el caso de *B. subtilis* y Oxiclورو de Cobre sería de \$ 40,92 USD y 40,08 MN (Tabla 7). Al analizar las diferencias en los costos de aplicación entre el Programa de Defensa y las aplicaciones de *B. subtilis*, NeoNim y OleoNim para el control de *P. cubensis* en casas de cultivo protegido, observamos que se reducen los costos de las aplicaciones en 492,07 USD (95 %) y 141,06 pesos (27 %) en moneda nacional (Tabla 8), en el caso de las aplicaciones de *B. subtilis* y Oxiclورو de Cobre, también se reducen en 472,07 USD (92 %) y en moneda nacional en 473,38 pesos (92 %) en comparación con lo establecido en Programa de Defensa para el cultivo. Se logra una disminución de las aplicaciones en un 50 % evitando la utilización de fungicidas de alta residualidad, para solo mantener el uso del Oxiclورو de Cobre que no tiene términos aplicable para el cultivo del pepino.

**Tabla 7.** Precios, dosis y término de carencia de *B. subtilis*, OleoNim y NeoNim

Productos	Precio (USD)	Precio (MN)	Dosis (L ó Kg/L)	Término de Carencia (días)
<i>Bacillus subtilis</i>	0,05	0,90	20	NA
OleoNim 80 CE	1,30	32	1	5
NeoNim 60 CE	2,50	60	1,5	5

**Tabla 8.** Diferencias en los costos de aplicación entre el Programa de Defensa y el empleo de (*B. subtilis*, NeoNim y OleoNim) y (*B. subtilis* y Oxiclورو de Cobre) para el control de *P. cubensis* en casas de cultivo protegido

Estrategias	Programa Defensa	Bs-ON-NN	Dif	Bs-Químico	Dif
# t	19	12	7	12	7
Costo	(USD)	513,46	21,39	40,92	472,54
	(MN)	513,46	371,4	141,06	473,38

Bs-ON-NN = (*B. subtilis*, NeoNim 60 y OleoNim 80)

# t = No. de tratamientos

Bs-Químico = (*B. subtilis* y Oxiclورو de Cobre)

Costo = Costo total de las aplicaciones

Los productos derivados del Nim son de producción nacional y presentan una gran versatilidad por su utilización para el control de varias plagas en el cultivo como lepidópteros, trips, ácaros, nemátodos, por lo que su uso sería una protección de amplio espectro, al incluir además el control del hongo *P. cubensis*. La solución bacteriana de *B. subtilis* es de fácil obtención, al utilizar como materia prima para la elaboración del medio de cultivo, el boniato un producto agrícola asequible en cualquier lugar del país y de bajo costo, esto llevaría a la sustitución por concepto de importaciones. Desde el punto de vista ecológico la utilización de productos de origen biológico y botánico, que incluye la solución bacteriana de *Bacillus subtilis* y los bioproductos del Nim (NeoIm 60 CE y OleoIm 80 CE, como alternativas dentro del programa de lucha para el manejo de la enfermedad mildiu veloso en pepino bajo cultivo protegido, permite disminuir la aplicación de fungicidas y los residuos en las producciones incrementando la calidad de estas, también evitaría dificultades como el resurgimiento de plagas primarias y secundarias y el desarrollo de resistencia genética, al no presentar un mecanismo específico de acción; por estos motivos disminuiría la contaminación del medio ambiente y afectaciones a la salud humana.

### CONCLUSIONES

- ◆ La solución de *Bacillus subtilis* y los bioproductos del Nim (OleoNim 80 CE y NeoNim 60 CE) mostraron un efectivo control en la inhibición de la geminación de los conidios del hongo *Pseudoperonospora cubensis*.
- ◆ Los bioproductos del *Bacillus subtilis* y derivados del Nim (NeoNim 60 CE y OleoNim 80 CE) aplicados solos resultaron efectivos en la lucha contra el patógeno *Pseudoperonospora cubensis* en las siembras efectuadas.
- ◆ Los tratamientos basados en las combinaciones de (*B. subtilis*, NeoNim 60 y OleoNim 80), (*B. subtilis* y Oxiclورو de Cobre) aplicados de forma alterna cada siete días, ejercieron un buen control del patógeno igual que el testigo comercial de producción (Oxiclورو de Cobre y Mancozeb).
- ◆ Las aplicaciones alternas de (*B. subtilis*, NeoNim 60 y OleoNim 80) y (*B. subtilis* y Oxiclورو de Cobre), constituyen estrategias fitosanitarias y ecológicas, eficientes y más económicas para el control del mildiu veloso en casas de cultivo protegido.

### RECOMENDACIONES

Integrar los bioproductos del Nim y la solución bacteriana de *Bacillus subtilis* dentro del programa de lucha para el manejo de la enfermedad mildiu veloso causada por el hongo *Pseudoperonospora cubensis* en pepino bajo cultivo protegido.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achimu, P. y E. Schollosser (1992): Effect of Neem extracts *Azadirachtina indica* ( A. Juss) against downy mildew (*Plasmopara viticola*) of grapevine. En: Kluberg, H. (Ed) Proc 1st Works. Practice Orientd Results on use and Production of Neem ingredients. Trifolio- M GmbH, Druck Grafic, Giessen, Germany, 99-107.
- Agrios, G. (1997): Plant Pathology 4th ED. Academic Express, San Diego.635 p.
- Arysta, V.S. (2008): Utilización del biofungicida Serenade en el control de enfermedades de importancia económica en frutales. [en línea] Disponible en: [http://mazingersisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_agronomicas/monte\\_alegre/j/5.html](http://mazingersisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/monte_alegre/j/5.html). [Consulta: 24 Oct 2008].
- Bandin, W. (1995): Principios de producción y protección integrada en Hortalizas. FAO, 125 p.
- Batista, J; L. Zambolim; D. J Tessmann; T. Brandão Usan; J, R. Veissanm.; M. Caixeta (2004): Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. Fitopatologia bras., 29 (4). Brasilia.
- Boucher, J. (2009): Scouting for downy mildew on cucurbit crops. [en línea] Disponible en: [www.hort.ucorn.edu/IPM/veg/htms/scouting\\_for\\_downy\\_mildiu.pdf](http://www.hort.ucorn.edu/IPM/veg/htms/scouting_for_downy_mildiu.pdf). [Consulta: 4 de Marzo 2009].
- Carluccio, C.; M. P. Lenscak; M. H. Panelo; S. Cáceres; N. Molina; Siaglia y E. Pernnuzzi, C. (2006): Desarrollo actual de los cultivos protegidos en Republica Argentina. INTA. EEA. Bella Vista. 15p.

- Casanova, A. S.; O, Gómez; F. R. Pupo.; M. Hernández.; M. Chailloux.; T. Depestre; J. C. Hernández; V. Morero; M. León.; A. Igarza.; C. Duarte.; I. Jiménez.; R. Santos; A. Navarro; A. Marrero.; H. Cardoza.; F. Piñeiro.; N. Arozarena.; L. Vilarino; M. I. Hernández.; E. Martínez.; M. Martínez.; B. Muiño.; B. Bernal.; J. M. Salgado; H. Martínez.; A. Socorro; F. Cañet.; J. Fi; A. Rodríguez. (2007): Manual para la Producción Protegida de Hortalizas. LILIANA. 211 p.
- Castellanos, J. J.; P. Oliva; E. Izquierdo; N. Morales (1995): Evaluación de *Bacillus subtilis* como biocontrol del patógeno *Alternaria porri* (Ell.) Cif. en cebolla. En Bioplag 95. (1995, Ciudad Habana, Cuba). INIFAT, 21.
- Castellanos, J. J.; Oliva, P.; Izquierdo, E.; Morales, N. (1996): Sustitución de un fungicida sistémico por *Bacillus subtilis* en el control de *Alternaria porri* (Ell.) Cif en cebolla. XI Forum de Ciencia y Técnica. INIFAT.
- Castellanos, J. J.; L. Ortiz, P. Oliva; J. Fresneda; J. M. Dueñas; S. Fraga y O. Meléndez. (2004): Estudios relacionados con el uso del *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos. Convención Internacional TROPICO 2004. Memorias CD-ROM. ISBN 959-7167-6.
- Ciba-Geygi. (1981): Manual de ensayos de campo: Basilea, Suiza, 11-20.
- CNSV (2007): Listado Oficial de Plaguicidas Autorizados. 422p.
- CNSV- MINAGRI (2002): Programa de defensa fitosanitaria para casas de cultivos protegidos, tomate, pimiento, melón y pepino. Centro Nacional de Sanidad Vegetal. Ministerio de la Agricultura. Departamento de programas de defensa. 52 p.
- Cristóbal, J.; Caamal, L.; Tun, J. M.; Pérez, A.; Latournerie, L.; y Gutiérrez, O. (2006) : Epidemiología del mildiu de las cuurbitaceas *Pseudoperonospora cuebensis* (Berk & Curt) en materiales de melón (*Cucumis melo* L.). Fitosanidad 10 (3): 197-201.
- Del Busto, A.; Capote Y.; León, L. M.; Sabrina L.; Palomino, L. (2005): Estudio de la dinámica de las plagas fungosas en el cultivo del pepino (*Cucumis sativus*, L.), bajo condiciones semicontroladas. Facultad de Forestal y Agronomía. Departamento de Producción Agropecuaria. Universidad de Pinar del Río. Cuba. 60 pp.
- Estrada, J y López, M. T. (1998): El Nim y sus bioinsecticidas, una alternativa agroecológica. INIFAT. La Habana. 24 pp.
- Estrada, J y López, M. T. (2003): Manejo integrado de Plagas. P. 27-36. En: FAO, INIFAT. Manual de Agricultura Orgánica Sostenible. AGRINFOR. 145 pp.
- Hernández, M.; Fuentes, V. R.; Alfonso, M. M.; Aviles, R. y Perera, E. T. (2001): Plaguicidas naturales de origen botánico. INIFAT, Ciudad Habana, 20-22.
- Hernández, M. I.; Chailloux, M.; Ojeda, V. (2006) : Cultivo protegido de hortalizas: Medio ambiente y sociedad. TEMAS de Ciencia y Técnica 10 (30): 25-31.
- Hernández – Castillo, F D. ; Aguirre, Q.; Lira, RH.; Guerrero, E.; Gallego, G. (2008): Bioeficacia de productos orgánicos, biológicos y químicos contra *Alternaria dauci* Kuhn y su efecto en el cultivo de zanahoria. [en línea] Disponible en: <http://www.sdelo.ar/schelo.php>. [Consulta: 23 Nov 2008].
- IHL. (1999): Guía Técnica para la producción protegida de hortalizas en casas de cultivo Tropical con efecto sombrilla. La Habana. 51 p.
- Jeyarajan , R.; Doranswamy, S., Bhaskaran, R., Jayana, S. (1990): Efecto del Neem y otras plantas en el manejo de enfermedades de plantas. Centre for Plant Protection Studies. India.
- Lampkin, N. (1998): Agricultura Ecológica. Ediciones Mundi-Prensa. 125 p.
- Martínez, B.; Barrios, G.; Rovesti, L.; Santos, R. (2007): Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV). Cuba. 526 p.
- McGrath, M. T. (2009): Update on Managing Downy Mildew of Cucurbits. Cornell University Vegetable MD [en línea], Disponible en: <http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/newsArticle>, [Consulta: 4 Nov 2009].
- MINAG. (1996) : Manual para casas de cultivo. Ministerio de la Agricultura. Grupo Técnico Nacional.
- MINAG. (1999): Manual para casas de cultivo protegido. La Habana. Ministerio de la Agricultura. 85 pp.
- MINAG-CNSV. (1999): Instructivo Técnico de Sanidad Vegetal par casas de cultivo de alta tecnología. CIDISAV. 75 p.
- Reynoso, Y.; Casadesús, L.; García, A.; Gutiérrez, J. y Pazos Álvarez, V. (2006): Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. Fitosanidad, 10 (3): 187-191.

- Rodríguez, F.; Stefanova, M. y Gómez, U. (1998): Efecto del biopreparado de *Trichoderma harzianum* (Rifai) contra *Pseudoperonospora cubensis* (Berk y Curt) Rostow y *Erysiphe cichoracearum* DC en pepino (*Cucumis sativus* L.). Fitosanidad 2 (1-2): 41- 43.
- Sánchez, L.; Martínez, B.; Bonora, L.; Muiño, B. L. y Calzadilla, M. (2003): Procedimiento para la obtención de un metabolito biológicamente activo contra *Peronospora tabacina* Adams [en línea] Dirección: [www.ocpi.cu/doc/1996/t12987.pdf](http://www.ocpi.cu/doc/1996/t12987.pdf). [Consulta: 24/4/2003].
- Scholaen, S. (2005): Manejo Integrado de Plagas en Hortalizas. Un Manual para Extensionistas. GTZ GMBH. 87 p.
- Soffia, V. (2008): Utilización del biofungicida Serenade en el control de enfermedades de importancia económica en frutales. [en línea] Disponible en: [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_agronomicas/montealegrej/5.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegrej/5.html). [Consulta: 24 Oct 2008].
- Recibido: 25 de junio de 2012
- Aceptado: 30 de noviembre de 2012