



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Carrera

Efecto de la biofumigación con Brassicáceas sobre especies patógenas de *Fusarium* en tomate

Autor

Miguel Sanz Pérez

Director

M. Sc. Ing. Agr. Jorge G. Lafi

Ponente

Dra. Clara Martí Dalmau

Facultad Ciencias Agrarias/ UNCUYO

2015

# AGRADECIMIENTOS

A Jorge Lafi por haber conducido todo este proyecto y haberlo hecho de la mejor manera posible. Por su dedicación para conseguir la perfección y haber puesto esfuerzo y trabajo para que todo llegara a buen puerto. Por todas las enseñanzas recibidas que hicieron integrarme dentro de la cátedra y aumentar mis conocimientos. Por haber hecho que el proyecto haya sido una buena experiencia y facilite el trabajo.

A la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCUYO por la hospitalidad recibida, por todos los conocimientos adquiridos a través de ellos y por su disponibilidad de ayudar y mejorar siempre.

A Patricia Donoso por ser artífice de que pudiera haber realizado este proyecto en Mendoza. Por su paciencia y alegría a la hora de ayudarme con toda el papeleo que se requiere.

A Merche Rincón por ser la segunda artífice de que el intercambio fuera posible. Por haberme informado de la beca obtenida y por toda su cordialidad recibida ante toda duda preguntada.

A Clara Martí por ayudarme a terminar y corregir el proyecto en el otro hemisferio y compartir su tiempo en que el proyecto mejore.

**EFFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN CON BRASICÁCEAS  
SOBRE ESPECIES PATÓGENAS DE FUSARIUM EN TOMATE**

# RESUMEN

En este trabajo se investigó la biofumigación como alternativa para el control de aislados locales de *Fusarium* sp. patógenos en tomate. Se partieron de plantas con síntomas de marchitamiento avanzado, raíces con pudrición y haces vasculares amarronados, provenientes de una plantación comercial de tomate en invernadero en el Departamento de Pocito, en la provincia de San Juan, Argentina. De ellas, se obtuvieron cinco aislados de *Fusarium* sp y se realizó cultivo monospórico de cada uno de ellos. Estos se identificaron por su morfología, dando lugar a cuatro aislados de *Fusarium oxysporum* y un aislado de *Fusarium solani*. Todos resultaron patógenos de tomate. Sin embargo, uno de los aislados de *Fusarium oxysporum* (F5) y el de *Fusarium solani* (F3) fueron los más virulentos, ya que registraron valores superiores al 80% de incidencia y severidad. Con estos aislados se realizó el ensayo de biofumigación *in vitro* con cinco especies comerciales de Brassicáceas, utilizadas como material biofumigante: rúcula (*Eruca sativa*), berro (*Nasturtium officinale*), coliflor (*Brassica oleraceae* var. *botrytis*), brócoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*) y repollo blanco (*Brassica oleraceae* var. *capitata*). Se probaron dosis de 0, 3 y 5 kg.m<sup>-2</sup>. La coliflor ofreció los mejores resultados para ambos aislados, con inhibiciones de 13,42% para F5 y 15,03% para F3. Para evaluar si a mayores dosis corresponden mayores inhibiciones, se realizó un nuevo ensayo sólo con coliflor variando las dosis, que fueron de 0, 3, 5, 10 y 20 kg.m<sup>-2</sup>. Para *Fusarium oxysporum*, la dosis de 5 y 10 kg.m<sup>-2</sup> mostraron inhibiciones a los tres días de 25,32% y 27,85%, respectivamente. Para *Fusarium solani*, a los tres días, la dosis de 5 y 10 kg.m<sup>-2</sup> mostraron inhibiciones de 27,5% y 29% respectivamente. Las dosis de 20 kg.m<sup>-2</sup> resultaron letales para los ambos aislados. Si bien se obtuvo la inhibición total del patógeno, resulta impracticable a campo o bajo condiciones de invernadero el empleo de dosis de 20 kg.m<sup>-2</sup>.

**Palabras clave:** *Fusarium* sp., biofumigación, tomate, patógenos

EFFECT OF BIOFUMIGATION WITH BRASSICACEAE  
ON SPECIES OF FUSARIUM PATHOGENIC ON TOMATO

# ABSTRACT

This thesis investigates biofumigation as a control alternative of local *Fusarium* isolates, which are pathogens of tomato. Pathogen was isolated from plants showing advanced symptoms of wilt, root rot and brown vascular discoloration, located in a commercial greenhouse in Pocito, San Juan, Argentina. Five isolates of *Fusarium* sp were obtained. Through monosporic culture of each isolate, species of *Fusarium* were identified by their morphology. As a result, four isolates of *Fusarium oxysporum* and one of *Fusarium solani*, were obtained. All of them were pathogenic on tomato plants. However, one of the isolates of *Fusarium oxysporum* (F5) and *Fusarium solani* (F3) were the most virulent, recording values higher than 80% of incidence and severity. An *in vitro* biofumigation assay was performed with these virulent isolates employing five commercial species of Brassicaceae, used as biofumigant material: Arugula (*Eruca sativa*), watercress (*Nasturtium officinale*), cauliflower (*Brassica oleraceae* var. *botrytis*), Broccoli (*Brassica oleraceae* var. *italica*) and white cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata*). Doses of 0, 3 and 5 kg.m<sup>-2</sup> were tested. Cauliflower offered the best results for both isolates, with inhibitions of 13.42% to 15.03% for F5 and F3, respectively. To assess if higher doses are greater inhibitions, a new test was conducted with only cauliflower varying doses, which were 0, 3, 5, 10 and 20 kg.m<sup>-2</sup>. On *Fusarium oxysporum*, the dose of 5 and 10 kg.m<sup>-2</sup> showed inhibition after three days of 25.32% and 27.85%, respectively. On *Fusarium solani*, after three days, the dose of 5 and 10 kg.m<sup>-2</sup> showed inhibitions of 27.5% and 29%, respectively. Doses of 20 kg.m<sup>-2</sup> were lethal for both isolates. Despite achieving total inhibition of the pathogen, it is impracticable under field or greenhouse conditions the use a dose of 20 kg.m<sup>-2</sup>.

**Key words:** *Fusarium* sp., biofumigation, tomato, plant pathogens.

# ÍNDICE

	Página
Agradecimientos .....	<i>ii</i>
Resumen .....	<i>iii</i>
Abstract .....	<i>iv</i>
Índice .....	<i>v</i>
Lista de tablas .....	<i>vii</i>
Lista de figuras .....	<i>viii</i>
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Origen y aspectos botánicos del tomate</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Origen.....	2
1.1.2 Clasificación taxonómica .....	2
1.1.3 Morfología .....	2
<b>1.2 Situación productiva</b> .....	<b>2</b>
1.2.1. Situación mundial .....	2
1.2.2. Situación en Argentina .....	4
1.2.3. Situación en Mendoza y San Juan .....	7
<b>1.3 Las enfermedades de suelo como limitantes del cultivo</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 Problemática del manejo de las enfermedades del suelo y del bromuro de metilo</b> .....	<b>9</b>
<b>1.5 Estudio de <i>Fusarium</i> en tomate. Aislamiento, identificación y pruebas de patogenicidad</b> .....	<b>10</b>
1.5.1 Generalidades de <i>Fusarium</i> y de las especies patógenas en tomate...	10
1.5.2 Aislamiento e identificación de <i>Fusarium</i> .....	18
1.5.3 Forma de determinar la patogenicidad.....	22
<b>1.6 Biofumigación como alternativa al BM. Etapas, técnicas, tipo de materiales biofumigantes y compuestos que intervienen</b> .....	<b>23</b>
1.6.1 Biofumigación como alternativa no química.....	23
1.6.2 Etapas de la biofumigación.....	24
1.6.3 Materiales biofumigantes .....	26
1.6.4 Glucosinolatos, enzima mirosinasa e isotiocianatos.....	28
<b>1.7 Técnicas de biofumigación <i>in vitro</i></b> .....	<b>32</b>
<b>1.8 Combinaciones de la biofumigación con otras prácticas agronómicas</b> ...	<b>33</b>
1.8.1 Solarización .....	33
1.8.2 Biofumigación y <i>Trichoderma</i> sp .....	34
<b>Antecedentes de biofumigación en tomate</b> .....	<b>34</b>
<b>HIPÓTESIS GENERAL</b> .....	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	<b>35</b>

<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	36
<b>2.1 Aislamiento e identificación de especies patógenas de <i>Fusarium</i> en tomate</b> .....	36
2.1.1 Recolección de plantas.....	36
2.1.2 Descripción de síntomas.....	36
2.1.3 Aislamiento y purificación del patógeno.....	36
2.1.4 Obtención de cultivos monospóricos.....	37
2.1.5 Identificación y caracterización de los aislados de <i>Fusarium</i> .....	39
2.1.6 Prueba de patogenicidad.....	39
<b>2.2 Efecto de la biofumigación <i>in vitro</i> sobre aislados de <i>Fusarium sp.</i> patógenos de tomate</b> .....	41
2.2.1 Ensayo exploratorio de biofumigación <i>in vitro</i> sobre los aislados locales más virulentos de <i>F.oxysporum</i> y <i>F.solani</i> .....	41
2.2.2 Ensayo de biofumigación <i>in vitro</i> para la determinación de la mayor dosis inhibitoria de coliflor, sobre ambos aislados del patógeno .....	45
2.2.3 Ensayo de biofumigación bajo condiciones de invernáculo, el material y dosis más eficaces, sobre ambos aislados del patógeno.....	47
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	48
<b>3.1 Aislamiento e identificación de especies patógenas de <i>Fusarium</i> en tomate</b> .....	48
3.1.1 Recolección de plantas.....	48
3.1.2 Descripción de síntomas.....	49
3.1.3 Aislamiento y purificación del patógeno.....	50
3.1.4 Identificación y caracterización de los aislados de <i>Fusarium</i> .....	51
3.1.5 Prueba de patogenicidad.....	53
<b>3.2 Efecto de la biofumigación <i>in vitro</i> sobre aislados de <i>Fusarium sp.</i> patógenos de tomate</b> .....	57
3.2.1 Biofumigación <i>in vitro</i> sobre aislados patógenicos de <i>Fusarium sp.</i> ....	57
3.2.2 Efecto de la biofumigación <i>in vitro</i> sobre aislados de <i>Fusarium sp.</i> con restos de coliflor .....	59
<b>4.CONCLUSIONES</b> .....	62
<b>5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	63
<b>ANEXO 1</b> .....	69

# LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> 20 mayores productores mundiales de tomate.....	3
<b>Tabla 2.</b> Glucosinolatos e ITC en algunas especies de Brassicáceas..	30
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje medio de germinación a los 7 d.....	54
<b>Tabla 4.</b> Incidencia media (%) a los 5 y 7 días de la inoculación.....	55
<b>Tabla 5.</b> Severidad del patógeno.....	55
<b>Tabla 6.</b> Inhibición/Estimulación media a dosis de 3 y 5 kg.m <sup>-2</sup> .....	58
<b>Tabla 7.</b> Inhibición media del crecimiento.....	60
<b>Tabla 8.</b> Producción media de conidios.....	60

# LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b>	Distribución porcentual de la producción de tomate mundial 3
<b>Figura 2.</b>	Rendimiento de tomate para Argentina..... 4
<b>Figura 3.</b>	Producción de tomate para Argentina..... 4
<b>Figura 4.</b>	Regiones productoras de tomate de Argentina..... 5
<b>Figura 5.</b>	Etapas de la biofumigación..... 25
<b>Figura 6.</b>	Reacción química de formación de los isotiocianatos..... 29
<b>Figura 7.</b>	Placa sembrada con medio CLA..... 37
<b>Figura 8.</b>	Raspado de esporodocios..... 38
<b>Figura 9.</b>	Microtubo con discos de micelio de <i>Fusarium</i> sp..... 39
<b>Figura 10a.</b>	<i>Fusarium solani</i> antes de la biofumigación..... 42
<b>Figura 10b.</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> antes de la biofumigación..... 42
<b>Figura 11a.</b>	Coliflor picada antes de ser introducida en el frasco..... 43
<b>Figura 11b.</b>	Tratamientos de berro de 5 kg.m <sup>-2</sup> y 3 kg.m <sup>-2</sup> ..... 43
<b>Figura 12a.</b>	Tratamiento de 3 kg.m <sup>-2</sup> de berro..... 44
<b>Figura 12b.</b>	Tratamiento testigo..... 44
<b>Figura 13 a.</b>	Tratamiento tras sacar los discos..... 46
<b>Figura 13b.</b>	Discos de <i>Fusarium</i> en lactofenol..... 46
<b>Figura 14.</b>	Invernadero donde se recogieron las plantas sintomáticas.. 49
<b>Figura 15a.</b>	Marchitamiento parcial de la planta..... 49
<b>Figura 15b.</b>	Marchitamiento total..... 49
<b>Figura 16a.</b>	Raíces podridas amarronadas y canchros en el cuello..... 50
<b>Figura 16b.</b>	Haces vasculares marrones..... 50
<b>Figura 17a.</b>	Córtex suberificado y pudrición radicular..... 51
<b>Figura 17b.</b>	Raíz amarronada con heridas en algunas partes de la raíz.. 51
<b>Figura 18.</b>	Observaciones <i>F.Oxysporum</i> ..... 52
<b>Figura 19.</b>	Observaciones <i>F.solani</i> ..... 53
<b>Figura 20.</b>	Niveles de la escala de severidad..... 56
<b>Figura 21.</b>	Tratamiento comparado con tratamiento testigo..... 58
<b>Figura 22.</b>	Efecto de la biofumigación <i>in vitro</i> sobre <i>Fusarium</i> sp..... 58
<b>Figura 23.</b>	Tratamiento de 5 kg.m <sup>-2</sup> y testigo..... 59
<b>Figura 24.</b>	Tratamiento de 10 kg.m <sup>-2</sup> y testigo..... 60
<b>Figura 25a.</b>	<i>F.oxysporum</i> después de la resiembra tras la biofumigación..... 61

<b>Figura 25b.</b>	Detalle.....	61
--------------------	--------------	----

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 ORIGEN Y ASPECTOS BOTÁNICOS DEL TOMATE

### 1.1.1 Origen

El tomate comercial, procede de la zona andina de Perú-Bolivia-Ecuador. A partir del siglo XVI se extendió a Europa y ahora se considera como una hortaliza fundamental y de gran uso debido a su gran valor nutricional (Jones *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Clasificación taxonómica

Pertenece a la familia de las *Solanaceae*s. El nombre científico del tomate comercial es *Lycopersicon esculentum*. Es una planta plurianual en su lugar de origen, aunque es cultivada como anual. Las variedades silvestres son especialmente útiles para la mejora genética ya que poseen genes de resistencia a plagas, enfermedades, y también a factores abióticos como el estrés hídrico o la salinidad. Las especies más importantes son las siguientes:

- *L. peruvianum*: tolerante a exceso de humedad, enfermedades fúngicas y nematodos
- *L. hirsutum*: tolerante a bajas temperaturas y al virus del mosaico del tabaco
- *L. cheesmanii*: tolerante a salinidad
- *L. pimpinellifolium*: tolerante a *Fusarium*, *Pseudomonas* y virus. Mejora el color de fruto
- *L. chinielewskii*: alto contenido de sólidos solubles (Arguerich *et al.*, 2011).

### 1.1.3 Morfología

Su sistema radicular consta de una raíz pivotante de unos 80-100 cm de profundidad, con gran cantidad de ramificaciones y muchas raíces adventicias procedentes de la base del tallo. El desarrollo de la raíz pivotante se produce en plantaciones a siembra directa de tomate. Si se hace transplante a raíz desnuda la raíz pivotante se corta dando lugar a un desarrollo de la raíz lateral y fasciculado, con una mayor cantidad de raíces secundarias.

El tallo es anguloso, recubierto de pelos la mayoría glandulares que le dan un olor característico a la planta. Según el tipo de crecimiento del tallo se pueden diferenciar:

- Cultivares de crecimiento indeterminado: en el ápice del tallo se encuentra un meristemo de crecimiento, que permite que el tallo siga creciendo indefinidamente y las inflorescencias se agrupan solo en el lateral.
- Cultivares de crecimiento determinado: el tallo detiene el crecimiento una vez que se forma la inflorescencia terminal. Estas plantas se utilizan normalmente en tomate para industria por su maduración más concentrada.

Las hojas son compuestas, imparipinnadas con 7-9 folíolos lobulados o dentados, de una longitud de 15-30 cm. De inserción alternada en el tallo. También están cubiertas por pelos glandulares (igual que el tallo), aspecto importante a la hora de realizar un tratamiento aéreo y que el mojado sea el adecuado.

Las flores se disponen en racimos simples en la parte inferior, y en cima dicotómica en la parte superior. Generalmente con 3 a 10 flores por racimo, son hermafroditas, regulares y péndulas con polinización autógama, a pesar de ello, el porcentaje de alogamia puede llegar al 5%.

El fruto es una baya carnosa de forma redonda, globosa o piriforme, que cambia según la variedad. De coloración roja en su estado maduro, existen variedades con color diferente como el amarillo o rosado entre otros; la superficie del fruto es lisa y su tamaño varía entre 3-15 cm. Dentro del fruto se diferencian de 2 a 20 lóculos carpelares.

Las semillas son de forma discoidal de 3-5 mm de diámetro, de color ocre, cubiertas por pequeñas vellosidades. En un gramo podemos tener de 300-350 semillas (Arguerich *et al.* 2011).

## **1.2 SITUACIÓN PRODUCTIVA**

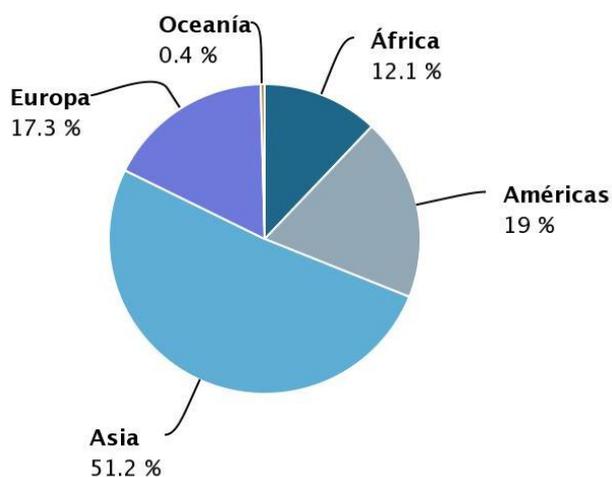
### **1.2.1 Situación mundial**

El tomate es actualmente la hortaliza más difundida a nivel mundial en cuanto a producción, alcanzando en 2013 un total de 163.963.770 toneladas, tanto para tomate destinado a fresco como a tomate para industria. El rendimiento medio mundial fue de 34,7 t/ha. Actualmente, China es el mayor productor mundial con diferencia, con 5.060.000 millones de toneladas. Los restantes mayores productores de tomate son, India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia, Brasil, España y México (FAO, 2013).

**Tabla 1.** 20 mayores productores mundiales de tomate (FAO, 2013).

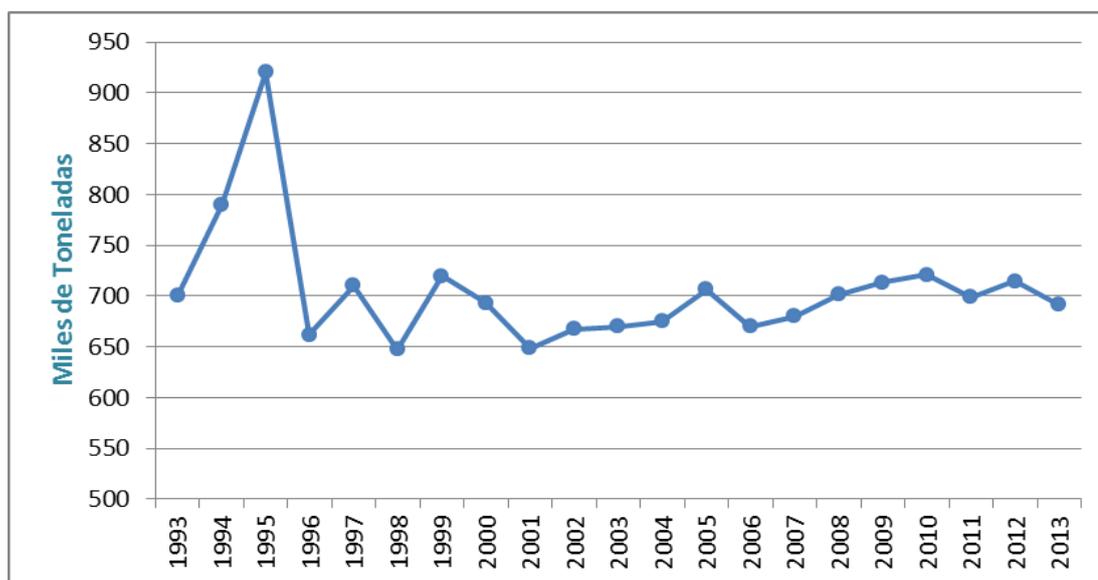
País	Producción (Millones de T)
China	5.060.000
India	182.000
Estados Unidos de América	12.600
Turquía	11.800
Egipto	8,53
Irán	6,17
Italia	4,93
Brasil	4,19
España	3,68
México	3,28
Rusia	2,64
Uzbekistán	2,25
Ucrania	2,05
Portugal	1,74
Nigeria	1,57
Marruecos	1,29
Túnez	1,2
Grecia	1,04
Argelia	0,975
Camerún	0,954

En Asia se concentra el 51,2% de la producción, mientras que en América se da el 19%, en Europa el 17,3%, en África el 12,1% y en Oceanía el 0,4% restante (Figura 1).

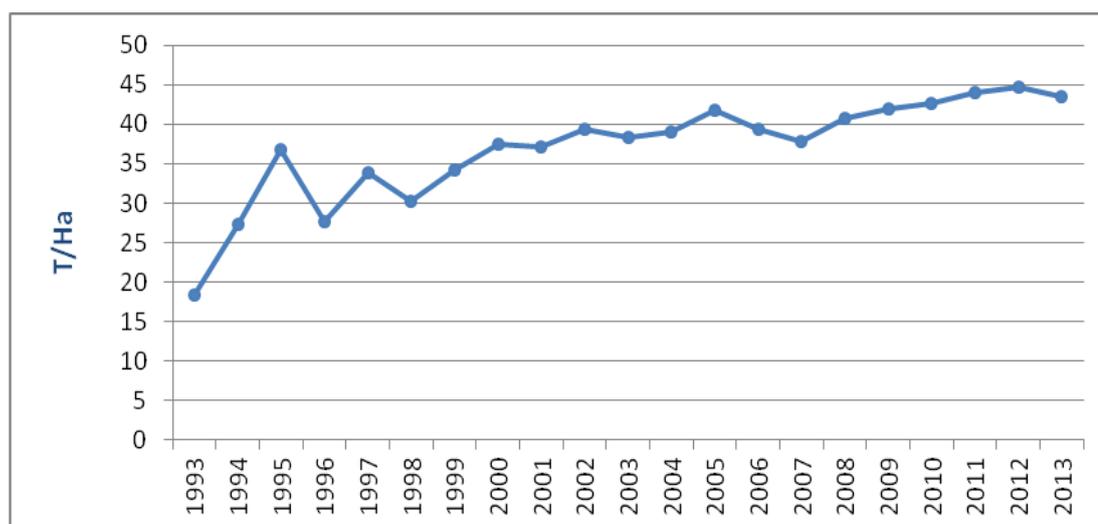
**Figura 1.** Distribución porcentual de la producción de tomate mundial (FAO, 2013)

### 1.2.2 Situación en Argentina

Argentina se encuentra en el puesto 30 a nivel mundial de producción, con un total en 2013 de 691.383 toneladas. Es la segunda mayor productora de América del Sur, por detrás de Brasil, dedicando 15868 hectáreas (FAO, 2013). La producción se ha mantenido estable durante el periodo 1993-2013, con una media de 730.588 toneladas anuales (Figura 2). La superficie ha ido disminuyendo en este último periodo, sin embargo el aumento de los rendimientos, debido fundamentalmente a los progresos tecnológicos en el manejo del cultivo, (Figura 3), ha hecho que la producción permanezca estable (Arguerich *et al.* 2011).



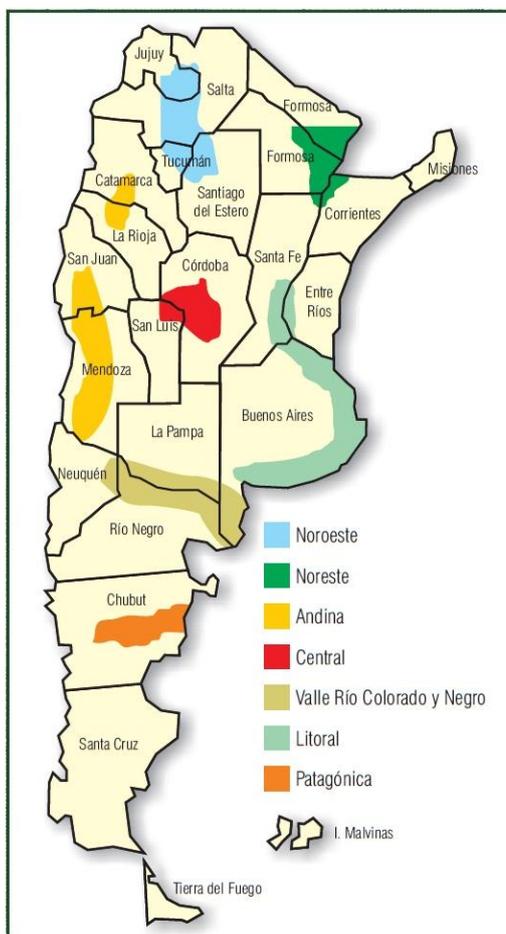
**Figura 2.** Producción de tomate durante el periodo de 1993-2013 para Argentina (FAO, 2013)



**Figura 3.** Rendimiento de tomate durante el periodo de 1993-2013 para Argentina (FAO, 2013)

En Argentina el cultivo de tomate se concentra en los denominados cinturones verdes, zonas de producción cercanas a poblaciones, dividiéndose su producción en seis regiones diferenciadas (Figura 4) (Arguerich *et al.*, 2011):

- Región Noroeste
- Región Central
- Región Andina
- Región Litoral
- Región Noreste
- Región Patagónica



**Figura 4.** Regiones productoras de tomate de Argentina (Arguerich *et al.*, 2011).

Los tipos de tomate cultivados en el país se clasifican principalmente en tres categorías:

- Tomate redondo: su eje transversal es mayor o igual que su eje longitudinal. Tiene cuatro categorías que varían según el calibre de 65-100 mm. Normalmente se dedica para consumo en fresco.
- Tomate perita: eje transversal mayor que el longitudinal. Se divide en tres categorías. Se destina mayoritariamente para industria.
- Tomate cherry: tomates de menos de 5 cm de calibre en forma de cereza (Barón *et al.*, 2000).

Los porcentajes para tomate en fresco de cada tipo en el mercado de Buenos Aires en 2010 fueron 45% de tipo redondo, un 34% de tipo perita, 17% de tomates larga vida y un 4% tipo cherry (Arguerich *et al.*, 2011).

Atendiendo al método de cultivo, la producción de tomate se divide en:

- Producción bajo cubierta

Según el censo nacional agropecuario (C.N.A) del 2002 hay un total de 1.185 ha dedicadas al tomate bajo invernadero. Un 87,7% de la superficie se concentra en las provincias de Buenos Aires y Corrientes con un 34,4% y un 53,3% respectivamente. La producción está destinada al consumo en fresco en épocas que la oferta es limitada y donde el precio es mayor (Corvo, 2005).

- Producción en campo

La superficie dedicada a tomate en campo fue en 2002 de 14.389 ha. Esta superficie se distribuye en 8 provincias, siendo Mendoza la que cuenta con una mayor superficie. Representa un 36,1% del total con 5.201,4 ha dedicadas al tomate (Corvo, 2005).

Teniendo en cuenta el destino del tomate producido, se puede separar entre:

- Industria

En la temporada 2008/2009 se alcanzó un total de 448.000 toneladas en 8.443 hectáreas dedicadas al cultivo del tomate para industria. Se obtuvo un rendimiento promedio de 53,1 T/ha. El 50 % de la producción se obtiene en Mendoza, un 20% en San Juan y un 19% en Río Negro. En los últimos años se ha conseguido un aumento en los rendimientos del 15-20% (Franco, 2009).

- Consumo fresco

Según datos del INTA (2009). La superficie total para fresco en campo fue de aproximadamente 13.000 ha con un rendimiento medio de 45 T/ha y una producción total de 585 mil toneladas. Para tomate en invernadero la superficie total fue 1200 ha con un rendimiento de 90 T/ha y un volumen de 108 mil toneladas.

La superficie se distribuyó de la siguiente manera: 5500 ha en el Noroeste con 250 ha en invernadero, 800 ha en el Noreste todo en invernáculo; 1400 ha en el Gran Buenos Aires casi todo protegido; 1200 ha en Mar de Plata; 1200 ha en Mendoza y 200 ha en la Patagonia.

### 1.2.3 Situación en Mendoza y San Juan

El tomate es una de las principales hortalizas de fruto cultivadas estivalmente en la provincia de Mendoza, con 3.750 ha. La mayor parte de la superficie está en el cinturón verde del centro, que abarca Luján, Guaymallén y Maipú con un total de 1.830 ha; y en el Valle de Uco en las localidades de San Carlos, Tupungato y Tunuyán con 1.028 hectáreas. La zona Norte (Lavalle y Las Heras) tienen dedicadas 454 ha, la zona Este (San Martín, Junín, Rivadavia, Santa Rosa y La Paz) 292 ha y la zona Sur (San Rafael, General Alvear y Malargüe) 146 ha (IDR, 2013).

El tomate destinado a la industria, es el de mayor importancia en la región, concentrando la mayor parte de la producción nacional entre San Juan y Mendoza. En 2013, la producción nacional fue de 420 toneladas, de las cuales, 300 toneladas fueron de la región cuyana. San Juan cuenta con 1100-1300 ha, mientras que en Mendoza hay 3000-3200 ha dedicadas al tomate de industria. Los rendimientos fueron de 90 toneladas por hectárea para la zona de San Juan y de 45-50 toneladas por hectárea para Mendoza (IDR, 2013).

Mendoza aglutina la mayoría de las empresas dedicadas a la transformación del tomate. En los últimos años esta industria se ha ido concentrando ya que el 40% de la producción proviene de solamente tres compañías, mientras que en 2004 contaba con 65 empresas dedicadas a la industrialización del tomate (IDR, 2004).

Debido a la buena calidad del tomate producido en toda la zona, su transformación industrial está adquiriendo gran importancia. Esto provoca que la industria pueda crear productos de mayor calidad por encima de otros países competidores como Brasil o Chile. Además, el precio estable durante los años hace que el agricultor opte por este tipo de cultivo (IDR, 2013).

El tomate destinado al consumo en fresco tiene un precio mayor que el de industria, siendo superior el precio del tomate redondo que el tomate tipo pera, debido, sobre todo, a sus mejores condiciones organolépticas. Sin embargo, la superficie de cultivo a cielo abierto para el tomate redondo ha ido disminuyendo, dando un promedio de 380 ha en los últimos 5 años. Lo que está incrementando es el cultivo en invernaderos, tanto para el redondo como para el perita. Estos invernaderos permiten conseguir unos rendimientos mucho mayores, llegando a 200 T/ha, mucho mayor que los conseguidos en cultivos al aire libre (IDR, 2013).

### 1.3 LAS ENFERMEDADES DE SUELO COMO LIMITANTES DEL CULTIVO

El tomate, como todos los demás cultivos, se ve afectado por diferentes factores que limitan su producción y por ende su rentabilidad. Existen citadas una gran cantidad de enfermedades que afectan al tomate, debidas a hongos, bacterias, virus, viroides, nematodos, fitoplasmas o enfermedades de carácter fisiológico. La lista de estas se encuentra en el anexo I (APS, 2014). Entre los factores más importantes que afectan el desarrollo normal de este cultivo se encuentran las enfermedades de tipo infeccioso provocada por hongos (Hernández *et al.* 2014).

Dentro de los hongos que afectan al tomate, los hongos telúricos o de suelo son uno de los problemas más importantes en la producción, tanto en invernadero como en campo. En invernadero, el hongo encuentra condiciones ideales de temperatura y de humedad para su reproducción y crecimiento. Este problema se puede agravar durante el paso de los años si el productor no sigue pautas de un manejo integrado del cultivo, como pueden ser la rotación de cultivos, el uso de portainjertos resistentes, o la biofumigación, entre otras (Miller *et al.* 1996).

En los últimos años se han incrementado los casos de infecciones por hongos telúricos. La intensificación y repetición continua del cultivo provoca aumentos poblacionales de los patógenos fúngicos de suelo. Los factores que llevaron a esta intensificación fueron la aparición de híbridos vigorosos y muy productivos que incrementaron la producción notablemente. Se dejó de hacer rotaciones que incluían cereales en invierno y la repetición del cultivo del tomate se hacía cada 3- 4 años (Tello y La Casa, 1990). El historial de los cultivos anteriores tiene una gran importancia, ya que la repetición de un mismo cultivo hortícola durante años aumenta la población de nematodos u hongos como *Verticillium spp.* o *Fusarium spp.* debido a que permanecen viables en el suelo durante varios años.

Económicamente, los patógenos del suelo representan una gran parte del costo de producción del cultivo, ya que para realizar la desinfección del suelo, los tratamientos son caros y no presentan una gran efectividad. Además, productos altamente efectivos como el bromuro de metilo están prohibidos o están siendo revisados.

Los patógenos de suelo más importantes en cultivos establecidos de tomate son los siguientes (Villapudua, 1987):

- Marchitez del tomate: *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*
- Pudrición de corona y raíz: *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici*
- Marchitez por *Verticillium*: *Verticillium dahliae* y *Verticillium albo-atrum*
- Marchitez sureña: *Sclerotium rolfsii*
- Moho blanco: *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*
- Pudrición de raíces: *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*
- Pudrición de suelo: *Rhizoctonia solani*
- Damping off: producido por *Fusarium* spp., *Phytium* spp. y *Rhizoctonia solani*

#### **1.4 PROBLEMÁTICA DEL MANEJO DE LAS ENFERMEDADES DEL SUELO Y DEL BROMURO DE METILO**

El bromuro de metilo (BM) es uno de los fumigantes químicos de utilización generalizada para cultivos como el tomate, pimiento, tabaco, fresa, uva, flores o melón, que se ha empleado durante largo tiempo y de forma masiva para combatir enfermedades del suelo, nematodos o malas hierbas. Se trata de un biocida que destaca por su amplio espectro de acción frente a los patógenos vegetales y posee una gran efectividad en cuanto a penetración y difusión en el suelo (Bello *et al.*, 2013). El BM es un gas utilizado para la desinfección del suelo, se aplica inyectándolo al suelo o sustrato y cubriéndolo con un plástico para facilitar la retención de los gases. Sin embargo entre un 50-95% se libera a la atmósfera.

La problemática del BM se debe a la destrucción que provoca en la capa de ozono. Cuando los gases liberados llegan a la capa de ozono, éstos son descompuestos por la radiación solar y libera un radical de bromo. Este radical de bromo, se une con un átomo de oxígeno rompiendo por tanto la molécula de ozono (O<sub>3</sub>). Tras varias reacciones, el radical de bromo se libera nuevamente, destruyendo el ozono a gran velocidad. El BM es 50 veces más destructor que los clorofluorocarbonos (CFC) (Carrasco y González, 2003). Sumado al daño producido en la capa de ozono, el BM posee un alto grado de toxicidad ocasionando un peligro para los operarios encargados de manejar el producto, reduciendo la biodiversidad biológica, contaminando el aire en zonas cercanas a la aplicación y contaminando el agua en zonas con niveles freáticos altos (Carrasco y González, 2003).

La 10ª Reunión del Protocolo de Montreal estableció para los países desarrollados un programa en el que se acordó la reducción del uso agrícola del BM, hasta su supresión total en 2005. Por lo tanto, tras su eliminación, los investigadores se centraron en encontrar alternativas para el control de plagas y enfermedades de las plantas. Además se exige que éstas no tengan un impacto negativo en el medio ambiente y que además sean económica y socialmente viables (Bello *et al.*, 2013).

No existe una opción única que sustituya al BM, ya que depende del suelo, del patógeno y el cultivo. Lo mejor es un sistema de manejo integrado del cultivo. Para ello, es importante que las distintas prácticas regulen de forma eficaz y económica los patógenos que se controlaron con el BM, garantizando su viabilidad a largo plazo (Bello *et al.*, 2013).

Como alternativas químicas se señalan el Metam-Sodio, Dazomet o Disulfuro de carbono entre otras. Otras prácticas agronómicas son de tipología física como la solarización y la vaporización del suelo u orgánica como la biofumigación. Las técnicas biológicas son también una de las posibles herramientas (Carrasco *et al.*, 2001; Bello *et al.*, 2013).

A corto plazo, se puede utilizar la combinación de alternativas químicas con otras no químicas, sin embargo, se recomienda que a largo plazo se utilicen técnicas más respetuosas con el medio ambiente (UNEP, 1999).

Numerosas exposiciones han mostrado iniciativas que han tenido similar eficacia que el BM. Es importante seguir en la búsqueda de éstas y mostrar su aplicación en las distintas regiones. Para ello, una buena manera es a través de pequeños folletos que se difundan entre los usuarios anteriores del BM. Otra manera, es la realización de talleres en diversas zonas, para mostrar las técnicas seguidas para su realización en cultivos específicos (UNEP, 1999).

## **1.5 ESTUDIO DE *Fusarium* EN TOMATE. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD**

### **1.5.1 Generalidades de *Fusarium* y de las especies patógenas en tomate**

*Fusarium sp.* es uno de los géneros de hongos más conocido y estudiado mundialmente por la patogenicidad que conlleva para muchas de las especies cultivadas, por su distribución mundial y por las pérdidas económicas que genera. Algunas especies producen toxinas que pueden afectar a hombres y animales (Booth, 1971).

*Fusarium* sp se clasifica taxonómicamente dentro del Reino Fungi, división Deuteromycota, también conocida como Hongos imperfectos o mitospóricos debido al enfoque exclusivo en la reproducción asexual de estos microorganismos. Además, se encuentra dentro del orden Moniliales y familia Tuberculariaceae. (Barnet y Hunter, 1998).

Se puede encontrar disperso en tierra, agua y aire (Booth, 1971) y las enfermedades que provocan algunas de sus especies generan marchitamiento vascular, manchas necróticas en hojas, pudrición de raíz y tallos, pudrición de frutos, granos y semillas, etc. (Arveláez, 2000).

Dentro de la misma especie puede existir lo que muchos autores denominan formas especiales, y a su vez dentro de estas formas especiales, se pueden encontrar diferentes razas fisiológicas (Booth, 1971; Tello y La Casa, 1990; Leslie y Sumerrell, 2003). Se denominan **formas especiales** a las cepas del hongo que atacan a una determinada especie vegetal, o a lo sumo a un número de especie vegetales del mismo género. Se denominan **razas fisiológicas** a la especialización sobre distintas variedades de la misma especie. Se pueden poner como ejemplo *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* que afecta al tomate y *Fusarium oxysporum* f.sp *cepae* que afecta a cebolla (Tello y La Casa, 1990).

Como se citó, para el cultivo del tomate hay una gran cantidad de enfermedades citadas que se exponen en el Anexo 1. Éstas pueden ser causadas por nematodos, hongos, bacterias, virus, viroides, fitoplasmas o pueden ser fisiológicas. Entre las enfermedades que son provocadas por hongos, una de las más importantes y que está presente en todos los suelos en producción intensiva de tomate es la fusariosis, provocada por tres patógenos: *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* y *Fusarium solani* f.sp *eumartii*. (Jones et al., 2001; APS, 2015).

- ***Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***

Esta subespecie provoca lo que se denomina la fusariosis vascular del tomate o marchitez vascular del tomate. Se describió por primera vez en Inglaterra en 1895 por G.E. Masee. Es una enfermedad de importancia mundial, ya que ha sido descrita por lo menos en 32 países diferentes. Afecta tanto a la producción en invernadero como en campo en zonas de clima cálido. Fue la enfermedad del tomate más común y destructiva hace 30 años, llegando a eliminar la producción de zonas tomateras como Florida. Aunque, la aparición de variedades resistentes ha

sido una buena herramienta para combatirla (Jones *et al.* 2001). Sin embargo, éstas no ejercen un control total del patógeno, debido a la aparición de nuevas razas fisiológicas. Además, en los últimos años se está produciendo un mayor cultivo de variedades locales que no contienen estos genes de resistencia, por lo que se deben tomar otras medidas para que la enfermedad no repercuta en la producción (Borrero *et al.* 2004). Se debe tener en cuenta que variedades resistentes pueden presentar síntomas del patógeno tras ataques severos de nematodos del género *Meloidogyne* spp. o cuando la planta ha sufrido de asfixia radicular. No hace falta que sean nuevas razas del patógeno (Blancard, 1996).

En la actualidad se conocen tres razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* que afectan al tomate: R1, R2 y R3. En 1945 se descubrió R2 en Ohio, cuando cultivares resistentes a R1 fueron afectados por el hongo. Posteriormente, el cruzamiento de *Lycopersicon pimpinellifolium* x *Lycopersicon esculentum* permitió encontrar nuevos cultivares resistentes. R3 fue encontrada en Queensland, Australia en 1982, al afectar variedades resistentes a R1 y R2 (Borrero *et al.*, 2004). R1 y R2 están ampliamente distribuidas y es común encontrarlas en las principales zonas productoras de tomate como Marruecos, Israel, México, Brasil o España; mientras que R3 hasta el momento ha sido encontrada en Australia, México, Florida y en California (Jones *et al.*, 2001; Borrero *et al.*, 2004). Una de las razones de la aparición de nuevas razas parece ser que es la presión de selección que se genera con el monocultivo de tomate y la utilización de variedades resistentes al patógeno (Tello y La Casa, 1988 a).

Este hongo puede atacar a la planta en cualquier estadio de desarrollo, antes de la emergencia, en estado de plántula y cuando la planta ya es adulta, en el momento de fructificación y maduración del fruto (Tello y La Casa, 1990).

**Síntomas:** las plántulas infectadas alcanzan escaso desarrollo. Las hojas se vuelven flácidas y desarrollan epinastia, y algunas pueden amarillear. El tejido vascular toma coloración castaño oscura, se ensancha la base de los tallos afectados, y las plantas normalmente se marchitan y mueren. En plantas adultas los síntomas se manifiestan durante el intervalo de tiempo que va entre la floración y la maduración del fruto. El síntoma inicial es el amarilleamiento de las hojas más viejas, éste puede afectar a solo un sector de la planta, y con frecuencia los folíolos de un lado amarillean antes que los del otro. La amarillez afecta de forma gradual a mayor parte del follaje, y esta va acompañada por la marchitez de la planta en las horas más cálidas del día. La marchitez se va extendiendo hasta que la planta

colapsa y muere. El tejido vascular de la planta enferma tiene una coloración castaño oscuro. Esta coloración se extiende hacia el extremo apical del tallo conforme avanza la enfermedad siendo especialmente notable en la inserción del peciolo al tallo. La infección del fruto ocurre de forma ocasional y se detecta por la presencia de coloración marrón en su tejido vascular (Jones *et al.*, 2001).

*Desarrollo de la enfermedad:* el patógeno inverna en el suelo en cualquiera de sus formas de esporas, aunque generalmente se encuentra en forma de clamidiosporas. Se propaga a corta distancia a través del agua y de la maquinaria agrícola y a grandes distancias mediante la utilización de semillas o trasplantes afectados. Una vez que ha llegado el patógeno es frecuente que permanezca en el suelo indefinidamente si no se realiza ninguna acción con vistas a erradicarlo. La penetración del hongo a la planta se produce a través de los tubos germinativos de la espora o del micelio que entran a través de las puntas de las raíces, a partir de heridas de éstas, por ejemplo producidas por nematodos; o a nivel de donde se forman las raíces adventicias. El micelio se propaga intercelularmente en la raíz hasta que llega a los vasos xilémáticos. Una vez en los vasos xilémáticos el hongo produce microconidios que son llevados hacia la parte superior de la planta por la savia bruta. Cuando cesa el ascenso, la espora germina y produce el micelio que a su vez vuelve a producir microconidios que se desplazan por los siguientes vasos, colonizando una mayor parte de los haces vasculares de la planta. Se provoca una alteración en el transporte del agua de la planta debido a la obstrucción de los vasos por el micelio. Esto hace que los estomas se cierren, las hojas marchiten y la planta consecuentemente muera (Agrios, 1985).

*Epidemiología y condiciones predisponentes:* es una enfermedad de climas cálidos y prevalece en suelos ácidos y arenosos. Se trata de un hongo telúrico que permanece en los suelos durante varios años. Los factores que favorecen la aparición son una temperatura óptima del suelo y el aire de 28°C, una humedad del suelo óptima para el crecimiento vegetal, plantas pre-adaptadas con bajos niveles de N, P, y alto de K, bajo pH del suelo, días cortos y baja intensidad de luz. La virulencia del patógeno se ve incrementada por micronutrientes, fósforo y nitrógeno amoniacal; y decrece con el nitrato (Jones *et al.*, 2001).

*Métodos de manejo:* como métodos culturales se aconseja la utilización de cultivares resistentes a las R1 y R2. También se encuentran algunos cultivares con resistencia a R3. Se recomienda aumentar el pH del suelo a valores de 6,5-7 y utilizar nitrato en vez de nitrógeno amoniacal. Las rotaciones de cultivo de 5-7 años

hacen descender significativamente el inóculo del patógeno. Asimismo, se debe evitar inundar la parcela para que no se disperse el hongo y realizar un control de material vegetal que ingresa, así como de la maquinaria agrícola utilizada para las labores (Jones *et al.*, 2001). Una de las técnicas que más se está utilizando últimamente para el control de *Fusarium*, de otras enfermedades o de nematodos en tomate es el injerto con portainjertos resistentes y la parte aérea con la variedad comercial. Es una técnica que, además de ser eficaz en el control de parásitos y enfermedades del suelo, aumenta el vigor, la producción y el rendimiento de las plantas injertadas (Mitidieri *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2015).

Como métodos físicos se citan la esterilización del suelo con vapor de agua y la solarización. En la primera, la mano de obra, el agua y el combustible resultan sumamente costosos, por lo que limitan su aplicabilidad, además de ser una técnica lenta y de manejo difícil. Sin embargo, no hay que descartar posibles adelantos para mejorar la eficiencia y los costos (Carrasco, 2003). La solarización es un método económico y cuidadoso con el medio ambiente cuando se utilizan plásticos biodegradables. Como inconvenientes presenta que para que sea efectivo se necesitan suelos poco profundos y suficiente radiación solar. Eso provoca que no se puede dar en algunas épocas del año ni en ciertos lugares de producción (Bello *et al.*, 2013).

Dentro de los métodos químicos para la fumigación del suelo se emplean algunas sustancias como el Dazomet, Metam-Sodio, clorpiricrina o el dicloropropeno 1-3, sin embargo, su costo elevado y su moderada eficacia hace que no sea una de las opciones más aconsejables, así como la actual tendencia a la menor utilización de agroquímicos en la producción agrícola. Otro método es la aplicación de fungicidas principalmente el Carbendazim, que presenta la desventaja de ser ineficaz por su dificultad de aplicación, ya que el producto no entra en contacto fácilmente con las raíces y presenta una baja sistemia (Carrasco, 2003).

Una de las maneras de fumigar el suelo que es respetuosa con el medio ambiente es la biofumigación, que está basado en la acción fumigante derivado de la descomposición de la materia orgánica y en especial de la familia de las *Brassicaceae*. Sus costos son relativamente bajos y su efectividad contra algunos patógenos del suelo ha sido igual que la conseguida por el bromuro de metilo. Sin embargo, se utilizan una gran diversidad de materiales biofumigantes y sus efectos contra distintos patógenos del suelo son variables. Por lo tanto, es necesario un mayor estudio para poder mejorar la eficiencia en el control de enfermedades y

conseguir material biofumigante que nos asegure éxito en el manejo (Bello *et al.*, 2013). Su combinación con la solarización o con la acción de hongos antagonistas aumenta su eficiencia (Bello *et al.*, 2013; Perniola *et al.*, 2014).

Con respecto a los métodos biológicos de control, se está estudiando con buena perspectiva la lucha biológica con *Bacillus subtilis* (Morsy, 2009) o con *Pseudomonas fluorescens* (Kamilova, 2006).

- ***Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici***

Este hongo es otra forma especial de la especie *Fusarium oxysporum* y provoca la podredumbre del cuello y de las raíces del tomate. La primera vez que se inventarió fue en 1969 en Japón y más tarde en 1971 en Florida. En los siguientes años se fue describiendo su presencia en otros sitios como Israel, Francia o España (Tello y La Casa, 1988 b). Es un problema serio para los productores de tomate ya que puede reducir significativamente la producción, tanto en invernadero como en cultivo a campo. No se conocen razas fisiológicas del patógeno, sin embargo se conocen nueve grupos de compatibilidad vegetativa (GCV), que demuestra la gran variabilidad genética dentro de esta forma especial (Szczechura *et al.*, 2013).

*Síntomas:* se produce un marchitamiento, irreversible, generalizado para toda la planta, que se combina o no con un amarilleamiento de las hojas más viejas. En algunas ocasiones, se produce amarilleamiento de las hojas basales y se extiende hacia las hojas apicales y la planta detiene su crecimiento pero sin llegar a la muerte.

El sistema radicular presenta pudriciones de color marrón que en los casos más graves llega a afectar la totalidad del sistema radicular. Puede darse que la epidermis radicular no presente síntomas de podredumbre y sin embargo en la médula se encuentre una podredumbre húmeda de color marrón intenso.

El cuello de la planta muestra una podredumbre marrón que rodea más o menos esta zona de inserción del tallo y la raíz. Hay veces que la epidermis parece intacta, pero al hacer un corte transversal se observa una podredumbre marrón/chocolate que afecta a la médula y que puede avanzar unos centímetros por el tallo. Como continuación de esta podredumbre, el xilema puede aparecer con una necrosis llegando hasta los 50 cm de altura (Tello y La Casa, 1988 b).

*Desarrollo de la enfermedad:* este hongo tiene una mayor variedad de especies hospedadoras que *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Se nombran los siguientes:

*Capsicum frutescens*, *Solanum melongena*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Trifolium* spp., *Vicia faba*, *Cucumis* spp., *Beta vulgaris* y *Spinacia oleracea*. (Szczuchura *et al.*, 2013).

Si la infección ocurre justo después de plantar, los síntomas no se muestran hasta antes de cosechar. El patógeno se introduce en el huésped a través de heridas o agujeros naturales ocasionados por la aparición de raíces nuevas. En el caso de producción sin suelo, el patógeno puede infectar al tomate mediante la diseminación de microconidios por el aire (Szczuchura *et al.*, 2013). El hongo se introduce por las raicillas absorbentes y progresa lentamente hacia la radícula y las raíces laterales, primero mediante hifas intercelulares a través del córtex, y después a través del xilema (Jones *et al.*, 2001).

*Epidemiología y condiciones predisponentes*: se han encontrado esporas del hongo en las cubiertas de paja colocadas entre las hileras de tomate en invernadero y en las pilas de desecho de plantas de tomate podridas al aire libre. La gran concentración de clamidosporas en el suelo constituye el inóculo que infecta los cultivos (Jones *et al.*, 2001). Las plantas infectadas pueden ser fuente de propágulos aéreos, que entran en la planta a través de heridas en el follaje. También se pueden difundir en el cultivo a través del contacto radicular entre plantas de tomate ya que su movimiento en el suelo es mínimo (Szczuchura *et al.*, 2013). La propagación vía aérea reinfecta y ayuda al desarrollo de la enfermedad en el suelo (Szczuchura *et al.*, 2013).

El patógeno se ve favorecido por temperaturas bajas de 10 – 20° C al contrario que la fusariosis vascular. Un bajo pH del suelo, nitrógeno amoniacal y suelos inundados favorecen el desarrollo de la infección. Los microconidios se forman en los tejidos necróticos infectados y se diseminan por el aire. La diseminación a grandes distancias se produce por trasplantes infectados, semilla infectada o maquinaria agrícola (Zhang *et al.*, 1995).

*Métodos de manejo*: resulta difícil porque el patógeno coloniza rápidamente suelos esterilizados y permanece en el suelo durante periodos largos de tiempo. Por lo tanto, un manejo integrado de la enfermedad se ve como la mejor manera de manejo.

Como métodos culturales se recomienda mantener el pH del suelo en valores de 6-7 y eliminar la utilización de nitrógeno amoniacal. También es importante realizar un control de la maquinaria utilizada en las labores del cultivo. Se recomienda hacer

rotaciones con plantas no hospederas del patógeno. El uso de plántulas o semillas libres del patógeno ayuda a controlar el desarrollo de la enfermedad. Los cultivares resistentes están en desarrollo, aunque ya hay alguna variedad comercial disponible con la resistencia incorporada (Zhang *et al.*, 1995). Como se mencionó para la fusariosis vascular, el uso de un portainjerto resistente injertado con la variedad comercial deseada logra un buen control de la enfermedad (Mitidieri *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2015). El cultivo en lana de roca con una solución nutritiva conocida también genera un buen control de la enfermedad (Kamilova, 2006).

Como método químico se pueden utilizar fumigantes del suelo como Metam-sodio o Agrocelhone, mezcla de 1-3 Dicloropropeno y cloropricina (Calonge y Vespasiano, 2014). Aunque tienden a ser poco efectivos, comparado a los costos que conlleva su uso (Zhang *et al.*, 1995).

Como en la fusariosis vascular, la biofumigación aparece como una buena alternativa para el control de patógenos de *Fusarium* spp. ya que, además de ser una técnica barata y fácil de manejar en campo, no produce repercusiones al medio ambiente y consigue un buen control, si se eligen bien los materiales y dosis; y se realiza correctamente en campo (Bello *et al.*, 2013).

Con respecto al control biológico, se han obtenido buenos resultados mediante el uso de *Pseudomonas fluorescens*, debido a que ejerce una presión competitiva fuerte (Kamilova, 2006).

- ***Fusarium solani* f.sp. *eumartii***

Fue descrita por primera vez en 1915 por Carpenter en Pennsylvania causando la marchitez de la patata. En 1975 se hizo el primer reporte de la enfermedad afectando al tomate en Australia, causando la llamada pudrición de la raíz. En 1991 se descubrió su presencia en California, EEUU y se ha encontrado también en Brasil, Japón, Egipto y Chile (Gonzalez *et al.*, 2004; Romberg y Davis, 2006; Nakayama *et al.*, 2010). En un principio se pensaba que eran diferentes formas especiales las que producían la enfermedad en patata y tomate, sin embargo Romberg y Davis (2006) certificaron que *Fusarium solani* f.sp. *eumartii* produce los daños en ambas especies. Es una enfermedad grave que puede causar detención en el desarrollo de la planta y su posterior muerte. Cabe destacar que otros agentes como *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* son capaces de producir también pudrición de raíz en tomate (El Mohamedy *et al.*, 2014).

*Síntomas:* se produce una mancha marrón oscura de 1-2,5 cm en la raíz principal o en las secundarias. A menudo, la mancha necrótica rodea la totalidad de la raíz infectada. La lesión se origina principalmente en las primeras capas del suelo. Internamente se produce un amarronamiento de los haces vasculares que se puede extender según la severidad de la infección. Pueden producirse síntomas aéreos como clorosis internerval y manchas necróticas en las hojas jóvenes. (UC IPM, 2013).

*Ciclo de la enfermedad:* el hongo permanece en suelos infestados durante años, además puede haber una infección aérea por medio de partes aéreas de tomate infectadas (Nakayama *et al.*, 2010).

*Métodos de manejo:* como en los otros casos, se recomienda un manejo integrado de la enfermedad. Presenta los mismos métodos que los citados anteriormente. Los últimos estudios muestran una posibilidad de control biológico positivo con *Bacillus subtilis* y *Trichoderma viridae* donde se obtuvieron buenos resultados tanto en control de *Fusarium solani* como en los parámetros de rendimiento y calidad de los frutos (Morsy *et al.*, 2009). González *et al.* (2004) postulan que el uso de *Trichoderma* spp. y *Paenibacillus lentimorbus* puede ser una buena estrategia dentro de un manejo integrado del cultivo, ya que se consiguieron buenos niveles de control del patógeno, además de una estimulación de la parte radical de las plantas, mientras que tratamientos químicos con Bromuro de Metilo no consiguieron una efectividad total contra la enfermedad.

El-Mohamedy *et al.* (2014) sugiere que un buen método para el control de hongos del suelo del tomate como *Fusarium solani* es la inducción de resistencia a éstos mediante la adición de compuestos químicos como el ácido salicílico, ácido sórbico o sales de potasio, además incrementa la cantidad y calidad de la cosecha posterior. No se han encontrado estudios de la respuesta de este patógeno a la biofumigación.

### **1.5.2 Aislamiento e identificación de *Fusarium***

Cuando se encuentran plantas con síntomas de una enfermedad, es necesario conocer el patógeno que le afectó; para ello se necesita aislarlo del material vegetal y purificarlo. Después, se procede a describirlo e identificarlo. Una vez que el hongo ha sido purificado e identificado se colecciona para luego realizar con él pruebas, por ejemplo de virulencia, o también en este caso, el efecto que provoca la biofumigación sobre él.

Agrios, (1985) explica algunos preparativos que se deben llevar a cabo a la hora de realizar un aislamiento correcto. Se deberá tener todo el material, cajas de Petri, tubos de ensayo, pipetas, etc., correctamente esterilizado. Se deberá eliminar o reducir notablemente los contaminantes de superficie que pudieran interferir con el aislamiento del patógeno; para luego proceder a la esterilización superficial del tejido. Los compuestos esterilizantes que más se utilizan son hipoclorito de sodio al 5-6%, empleado para los tejidos o la mesa de trabajo; alcohol etílico al 95%, utilizado para las hojas y cloruro mercuríco en la proporción de 1:1000 para las hojas también durante un intervalo de 15-45 segundos. Los tejidos deben pasarse después por agua estéril tres veces. Por último, se deberá tener preparado el medio de cultivo que se vaya a utilizar para hacer crecer el patógeno. Pueden utilizarse una gran cantidad de medios y por lo común son bastante específicos para ciertos patógenos.

Leslie y Sumerrell (2003) dan las pautas a seguir para conseguir un aislamiento exitoso de *Fusarium* spp. Hay que tener en cuenta, que es común recuperar más de una especie de *Fusarium* de material vegetal infectado, sin embargo, no todas ellas son patógenas sino que son saprofitas y tienen un rol secundario en la enfermedad, o simplemente no tienen acción patógena sobre la planta. Por eso, trabajar con material enfermo que no esté muy dañado ayuda a no encontrar otros hongos saprofitos, incluidas otras especies de *Fusarium*, que invaden el material dañado por el patógeno real.

El tipo de enfermedad con el que se trabaje, indicará el procedimiento para aislar el patógeno. La parte de la planta afectada por la enfermedad, es donde más probabilidades de aislarlo tendremos. Como regla general, se intentará aislar el patógeno a partir de la zona de avance del hongo. Se debe realizar una observación profunda del material dañado, a partir de cortes en las partes afectadas para ver el posible avance del hongo en las partes internas de la planta. Por ejemplo, si trabajamos con enfermedades vasculares como las ocasionadas por *F. oxysporum* se debe realizar un corte longitudinal del tallo hasta encontrar la zona de avance del amarronamiento de los haces vasculares y a partir de esa zona aislar el patógeno (Leslie y Sumerrell, 2006).

La manera de conseguir un cultivo puro de *Fusarium* sp es a partir de una spora germinada. El cultivo monospórico reduce considerablemente la variación de los caracteres morfológicos del hongo, facilitando la identificación de especies. Se realiza una dilución 1:10 del hongo hasta que con microscopio veamos la cantidad

de esporas necesarias. Esa dilución se vierte en una placa con Agar-Agua 0,05% (AA) y se deja una noche a T° ambiente para que las esporas germinen. Con la dilución se busca conseguir 50-200 esporas germinadas por placa. En el microscopio se identifica y marca las esporas germinadas y con una aguja estéril se pasará el trozo de agar que contiene la espora a una placa con Agar-Patata-Glucosa (APG) (Leslie y Sumerrell, 2006).

La identificación y caracterización tradicional de especies de *Fusarium* se efectúa a través de la morfología del patógeno. Para ello, se utilizan diversos tipos de medios de cultivo, entre los que principalmente se destacan: APG (Agar patata glucosado), SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar) y CLA (Agar hojas de clavel). Los caracteres morfológicos observados en estos medios son: presencia o ausencia de macro o microconidios y su morfología; tipo y morfología del conidióforo; presencia o ausencia de esporodoquios y su color; presencia o ausencia, morfología y ubicación de clamidosporas y otros caracteres secundarios como el color inferior de la colonia y la tasa de crecimiento (Booth, 1977; Leslie y Summerell, 2006).

En la caracterización de macroconidios se usa CLA para promover la formación de esporodoquios en las hojas de clavel, cuando se incuba a  $25\pm 1$  °C, con fotoperiodo de 12 h de luz blanca y 12 h de luz negra. Los esporodoquios se presentan como una masa gelatinosa de color variado y están constituidos por macroconidios. Las características más importantes de este tipo de esporas son tamaño, longitud y forma general tomando en cuenta el grosor del conidio, la curvatura o no de la parte dorsal y ventral de la espora y la forma de las células apical y basal. Las partes terminales de la espora puede ser curvadas o no. Existen cuatro tipos de forma distintos para la célula apical: tipo gancho, tipo papilado, tipo romo o tipo cónico y cuatro formas para la célula terminal: forma de pie, forma de pie alargado, sin muescas o con muescas (Leslie y Summerell, 2006).

Para la caracterización de los microconidios se utiliza medio SNA donde hay una mayor producción de éstos. No todas las especies de *Fusarium* producen microconidios, por lo que la presencia o no es un carácter identificativo. Como para los macroconidios, el carácter más importante es el tamaño. La cantidad de septos pueden ser de 0 o 1. La forma del microconidio es otro carácter identificativo importante. Los microconidios pueden estar agrupados formando falsas cabezas o cadenas. Otro carácter a tener en cuenta es el tipo de célula conidiógena donde se producen los microconidios. Éstas pueden ser de dos tipos: monofiálide o polifiálide, según el número de aberturas por célula a través del cual se producen conidios. La

longitud de las fiálides es otro carácter identificativo. Las clamidiosporas son otro carácter identificativo para las especies de *Fusarium*. Éstas pueden ser individuales, dobles, agrupadas o formando cadenas. Tardan unas 6 semanas en producirlas y pueden ser encontradas en micelio aéreo o incrustadas en el agar. La localización de éstas es también un carácter identificativo.

Como caracteres secundarios identificativos están la pigmentación que produce el hongo en medio APG crecido a una temperatura de 25°C y 12 horas de luz blanca y 12 de luz negra, y el ratio de crecimiento del hongo en medio APG (Booth, 1977; Leslie y Summerell, 2006).

Características morfológicas de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*:

- *Fusarium oxysporum*: macroconidios se encuentran generalmente en esporodoquios. De 27-60 x 3-5 $\mu$ , rectos o sensiblemente curvados, relativamente estrechos. Normalmente formados por tres septos, la célula apical es de tipo gancho y la célula basal en forma de pie o tipo pie alargado.

Los microconidios son de forma oval-elípsoidal, cilíndrica, rectas o curvadas. De 5-12 x 2.2-3.5 $\mu$  de dimensiones. Sin septos y están formados en monofiálides laterales cortas, formando falsas cabezas.

Las clamidiosporas son globosas formadas individualmente o por parejas, se encuentran en ramificaciones laterales cortas.

La pigmentación puede ser blanca, salmón, de grisáceo a morado o violeta. *F.o.f.sp.lycopersici* y *F.o.f.sp.radicis-lycopersici* son indistinguibles morfológicamente a pesar de que producen enfermedades diferentes. Se necesita de marcadores moleculares (RAPD) para poder realizar la diferenciación de las dos formas especiales (Carbonell *et al.*, 1994).

- *Fusarium solani*: los esporodoquios pueden ser crema, azul o verdes y contienen numerosos macroconidios. Los macroconidios son relativamente largos, robustos y rectos con el punto más estrecho alrededor del centro de la espora, formada por un número variable de septos, desde 1 septo a 10 septos. La célula apical es tipo romo y la terminal puede ser en forma de pie, normalmente con terminación redondeada.

Los microconidios son cilíndricos a ovales con 0, 1 o incluso 2 septos. De 8-16 x 2-4 $\mu$  de tamaño. Se forman en monofilídes laterales largas formando falsas cabezas

Las clamidiosporas son globosas, con paredes lisas o rugosas, individuales o en parejas en ramificaciones laterales cortas.

La pigmentación del micelio es grisáceo-blanco a azul o azulado-marrón. (Boothe, 1977; Leslie y Summerell, 2006).

### **1.5.3 Forma de determinar la patogenicidad**

La manera de confirmar que un hongo aislado afecta negativamente al cultivo es mediante una prueba de patogenicidad. Para su realización deben considerarse entre otros factores, la forma de inoculación del patógeno, concentración del inóculo, y edad de la planta a la que se le inocula y tiempo en el que se muestran los síntomas tras la inoculación.

Como forma de inoculación se ha probado la inmersión de raíces en una solución de patógeno (Cruz-Alcala *et al.*, 2000; Carrillo-Fasio *et al.*, 2003; Hernández *et al.* 2014), el crecimiento de la planta en sustrato infectado con una cantidad de patógeno conocida (Palmero *et al.*, 2008) y la inmersión de semillas en una suspensión conocida de conidios del patógeno (Apodaca *et al.*, 2001). Se han utilizado plantas en etapas distintas de crecimiento, utilizando desde plántulas de 25 días de edad (Cruz-Alcala *et al.*, 2000; Carrillo-Fasio *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2014), plantas con 2 hojas verdaderas (Palmero *et al.*, 2008) o también se han utilizado semillas sin germinar (Apodaca *et al.*, 2001).

De especial interés es la metodología utilizada por Apodaca *et al.* (2001), debido a su rapidez en la toma de resultados (5-7 días), su facilidad de aplicación (inmersión de semillas en una suspensión de conidios del patógeno conocida) y la especificidad del método para *Fusarium*.

## **1.6 BIOFUMIGACIÓN COMO ALTERNATIVA AL BM. ETAPAS, TÉCNICAS, TIPO DE MATERIALES BIOFUMIGANTES Y COMPUESTOS QUE INTERVIENEN.**

### **1.6.1 Biofumigación como alternativa no química**

Como se citó anteriormente, después de la retirada en 2005 del Bromuro de metilo, la biofumigación pasó a considerarse como una alternativa importante, y con posibilidades de desarrollarse. No se debe pensar en la biofumigación como una herramienta para sustituir al Bromuro de Metilo, sino que se debe plantear como un método agroecológico, englobado en un grupo de técnicas ya sean físicas, biológicas, culturales o químicas, para conseguir eficiencia en el control de distintos patógenos del suelo, es decir, un manejo integrado del cultivo (Mitidieri *et al.*, 2009).

Las ventajas son: técnica de fácil aplicación al ser parecida a la de incorporar abono verde al suelo; no dañar el medioambiente y unos costes reducidos (Bello *et al.*, 2013).

El primero en citar el concepto de biofumigación fue Kirkegaard (1993) cuando utilizó el término de "*Biological fumigation*" al exponer el poder biocida de los isotiocianatos. Este autor, indica que éstos son formados tras la hidrólisis de los glucosinolatos presentes en las distintas especies de la familia de las Brassicáceas. Este mismo autor probó que el aumento de producción del trigo se debió a esta acción inhibitoria de patógenos telúricos y además, a que la descomposición de la materia orgánica incorporada al suelo generó una mejor estructura del mismo. Esto favoreció un mayor crecimiento radicular y por lo tanto una mayor absorción de agua y nutrientes, contribuyendo a un aumento en los rendimientos del cultivo. Este autor indica que el metam-sodio, fumigante químico de amplio espectro, tiene como materia activa al metil-isotiocianato, un tipo de isotiocianato. Existen muchas variedades de isotiocianatos, y las Brassicáceas contienen la mayor cantidad de precursores de éstos en los glucosinolatos (Kirkegaard, 1993).

La práctica de la biofumigación no conlleva sólo el uso de las Brassicáceas, sino que otros autores la definen como una técnica basada en la descomposición de materia orgánica, indiferentemente de su origen y sus características. Por ejemplo, Bello *et al.*, (1997a) expone que la biofumigación es una técnica que permite utilizar la materia orgánica y los residuos agrarios, así como los productos de su descomposición en el control de los patógenos de origen edáfico. Esto presenta la ventaja de ofrecer otra salida para muchos de los subproductos derivados de las

industrias agrarias como la cáscara de arroz, el orujo de las bodegas, los residuos de fermentación de las cervecerías o el salvado de trigo procedente de la producción de harinas refinadas.

### **1.6.2 Etapas de la biofumigación**

La biofumigación implica la biodescomposición de la materia orgánica fresca, en condiciones de anaerobiosis y constituye una herramienta más para el control de patógenos (Bello *et al.*, 2013). Esta biodescomposición implica distintos procesos en el suelo que producen un cambio en las condiciones edáficas. Es importante destacar los siguientes aspectos del proceso:

- La descomposición implica un aumento en el nivel de microorganismos existentes en el suelo debido al aporte de carbono y nitrógeno del material biofumigante. Esto provoca el crecimiento de una población de microorganismos saprofitos entre los cuales habrá organismos antagonistas como por ejemplo, *Trichoderma* o *Aspergillus*. La proliferación de una mayor diversidad de microorganismos provoca mayor competencia por oxígeno y nutrientes, que hace que las poblaciones de patógenos bajen y ayude a conseguir un equilibrio biológico en el suelo.
- Durante esta biodescomposición se liberan gases volátiles como: amonio, fenoles, ácido sulfhídrico o isotiocianatos, que tienen carácter biocida e incrementan en gran medida la eficacia del método.
- La anaerobiosis produce una inhibición de los patógenos del suelo que necesitan oxígeno para sobrevivir. Estas condiciones se consiguen al regar hasta saturación tras incorporar el material biofumigante y sellar el suelo para evitar que los gases volátiles generados emerjan, perdiendo así su efecto (Segura, 2010).

Se pueden diferenciar tres etapas (Segura, 2010): durante el proceso (Figura 5)

#### **Etapas 1**

Tiene una duración de 2-3 días. Se producen dos situaciones que van a marcar el éxito de la técnica. Una de ellas es el incremento de microorganismos saprofitos debido a la cantidad de materia orgánica fresca presente en el suelo. Este crecimiento provoca una competencia entre ellos por conseguir nutrientes y oxígeno. El oxígeno no es renovado ya que el suelo está sellado, y por lo tanto es un factor limitante para el crecimiento microbiano. Esto hace que por competencia de oxígeno se produzca control sobre patógenos del suelo. La otra situación de éxito viene dada porque los microorganismos saprofitos producen gases volátiles

biocidas, como el amonio. Además, el nivel poblacional y la cantidad de gases producidos son máximos, y por lo tanto es en esta etapa donde se produce el control de los patógenos del suelo.

### Etapa 2

La población de microorganismos se normaliza y sobreviven los saprófitos que van a descomponer la materia orgánica y a competir por los nutrientes con los patógenos. La cantidad de oxígeno empieza a incrementar ya que por percolación se pierde el agua y se pierden además parte de los gases generados.

### Etapa 3

En esta etapa se produce la regulación de la población de microorganismos del suelo, que implica tanto un mayor nivel poblacional de saprófitos por el incremento de materia orgánica, como una mayor diversidad de especies.

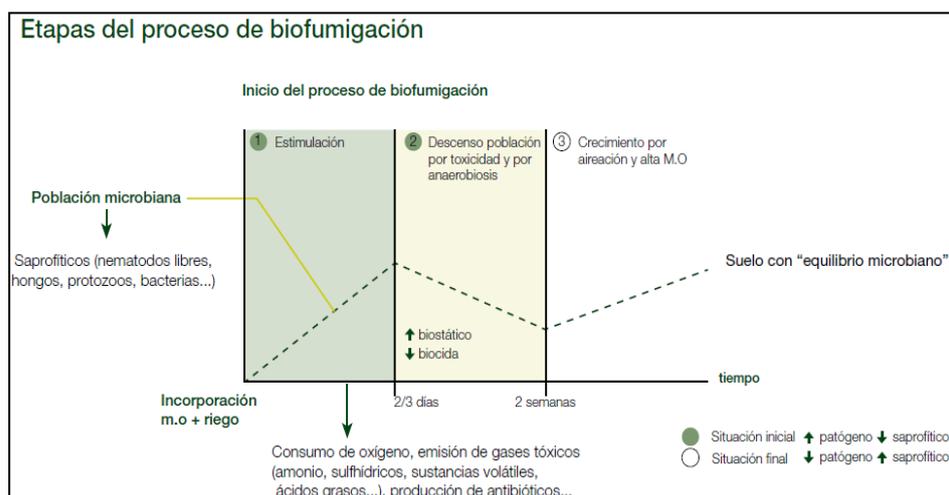


Figura 5. Etapas de la biofumigación (Segura, 2010).

### Técnica de realización

Varios autores (Michel *et al.*, 2007; Segura, 2010; Iriarte *et al.*, 2011 y Bello *et al.*, 2013), describen el manejo técnico que ha de hacerse para conseguir la máxima eficiencia del método:

- Disposición y dosis: el material biofumigante a utilizar se dispone en el suelo. En cultivos en hileras ya sea en invernadero o en campo, el material biofumigante también se dispondrá en las hileras. La dosis a aportar va a depender del grado de infestación del suelo, el material utilizado y el patógeno principal a controlar. Se selecciona a partir de estudios previos realizados para condiciones similares. Se han probado dosis eficaces de 30 y 50 t.ha<sup>-1</sup>, aconsejándose no sobrepasar las 100 t.ha<sup>-1</sup> debido a la dificultad de encontrar el material vegetal y al gran volumen que se tiene que manejar para realizar el método.

- Trozado e incorporación al suelo: una vez dispuesto el material, éste se debe enterrar en el suelo. En el caso de que se utilice algún tipo de Brassicácea previamente habrá que picarla para favorecer la producción de los ITC's (isotiocianatos). Para ello, se emplea un motocultor de manera que el rastreo quede bien picado y enterrado. La profundidad de esta labor debe ser de unos 30-35 cm, aunque se puede realizar a la profundidad máxima del apero.
- Sellado: tras el enterrado, se debe realizar rápidamente el sellado para evitar que se liberen las sustancias volátiles biocidas y se produzca descomposición aerobia, donde este tipo de sustancias no se producen. Para ello, se riega el suelo a saturación (o al menos capacidad de campo) y se cubre la zona tratada con un plástico transparente de 50-100 micras de espesor. Previo al riego es conveniente pasar un rodillo liso para dejar la superficie homogénea y facilitar la colocación del plástico. La utilización de plástico es opcional. Si se decide no utilizar el plástico, entonces habrá que mantener el suelo al menos en capacidad de campo, durante el tiempo de tratamiento para evitar la salida de gases.
- Fase final: terminado el tratamiento, se saca el plástico y se deja airear por determinado periodo de tiempo. Se realiza una pequeña siembra de un cultivo indicador como puede ser lechuga o cebolla, que indica que los gases fitotóxicos ya han desaparecido y no van a causar fallos en la germinación del cultivo comercial.

### 1.6.3 Materiales biofumigantes

Se han probado distintos tipos de restos de cultivos, subproductos de industrias agrarias y Brassicáceas como material biofumigante para el control de ciertos patógenos:

#### - Restos de cultivo

Regalado y colaboradores (2006) consiguieron controlar la población de *Meloydogine incognita* en un cultivo de tomate con restos del mismo cultivo, obteniendo un menor índice de nodulación y un incremento en la actividad biológica del suelo. Vilaseca y colaboradores. (2006) trabajaron para controlar el virus del mosaico del tomate, utilizando como material biofumigante restos de cultivo de tomate infectado con el virus. Tras 6 semanas de biofumigación a 25° C se consiguió erradicar el virus.

#### - Subproductos agrarios

Otra alternativa como material biofumigante son los residuos producidos por la industria agraria. Los residuos agroindustriales son una excelente fuente de materia

orgánica, y en lugar de representar un factor de contaminación ambiental, deben recuperarse mediante procesos sencillos de reciclado para su posterior empleo en la agricultura. Esto provocará un ingreso extra a la industria y reducirá el impacto ambiental que provocan estos residuos (Bello, 1997b).

Un ejemplo fue el estudio de Kuter *y colaboradores*. (1988) donde utilizaron los lodos de depuradoras municipales para preparar compost y luego utilizarlo para el cultivo de plantas ornamentales. Con un compostaje adecuado, controlando factores como la temperatura y el tiempo de compostaje consiguieron buen control de *Phytium spp.* y *Rhizoctonia solani*. Estos fangos necesitan un buen tratamiento, con un control de calidad adecuado, que permita asegurar que no exista una reintroducción de patógenos con la aplicación del compost elaborado. López-Pérez *y colaboradores*. (2003) utilizaron para la biofumigación compost derivado de residuos de la industria del champiñón. En los tratamientos experimentales se observó que el índice de nodulación causado por *Meloidogyne incognita* fue mucho menor al testigo y fue igual a los tratamientos químicos con Bromuro de Metilo y Metam-Sodio.

#### - **Brasicáceas**

Se ha realizado una mayor investigación en la utilización de las Brasicáceas para realizar la biofumigación. Esta familia tiene una particularidad que la hace especialmente efectiva en el control de patógenos del suelo. En sus tejidos se encuentran gran cantidad de glucosinolatos, que son los precursores de los isotiocianatos, la materia activa que realiza el control patogénico. Como se ha comentado anteriormente, el Metam-Sodio posee como materia activa un tipo de isotiocianato que son los metil-isotiocianatos.

Se citan tres formas de realizar la biofumigación con Brasicáceas (Kumar, 2005):

- Restos de cultivo
- Una torta o harina de semillas
- Productos derivado como por ejemplo el aceite de colza como tratamiento de preemergencia

Algunos estudios prueban la efectividad de esta familia contra diversas especies del género *Fusarium* sp. Iriarte *y colaboradores*. (2011) consiguieron inhibiciones de hasta el 83% de *Fusarium oxysporum* f.sp *cepae*, que afecta a cebolla, con una dosis de repollo de 3 kg.m<sup>-2</sup> en el mes de abril. Sin embargo, este autor recomienda seguir el estudio de la carga de inóculo en el suelo y la dosis óptima de material

biofumigante para poder proponer la biofumigación como técnica para el control del patógeno de cebolla.

Hubo reducción significativa de *F.solani* y *F.oxysporum* en el cultivo de sandía, mediante la combinación de biofumigación con brócoli a una dosis de 10 kg.m<sup>-2</sup> y solarización. Además, incrementó el rendimiento, se cosecharon frutos de mayor tamaño, de mayor firmeza y redujo la población de nematodos (López *et al.*, 2014). Mitidieri y colaboradores, (2009) estudió la acción de la biofumigación con la adición de colza a razón de 0,49 kg peso seco.m<sup>-2</sup> y brócoli a 2,43 kg PS.m<sup>-2</sup> a los dos años. En estos estudios se consiguió una eficacia en el control de *F.solani* y de nematodos en el cultivo del tomate a una profundidad de 10 cm de suelo. Este control también se mostró eficaz 24 meses después de realizar el último tratamiento con brócoli. Además, se obtuvieron rendimientos por encima de otros tratamientos como la solarización o la adición de estiércol el primer año y colza el segundo año.

#### - Factores importantes de la biofumigación

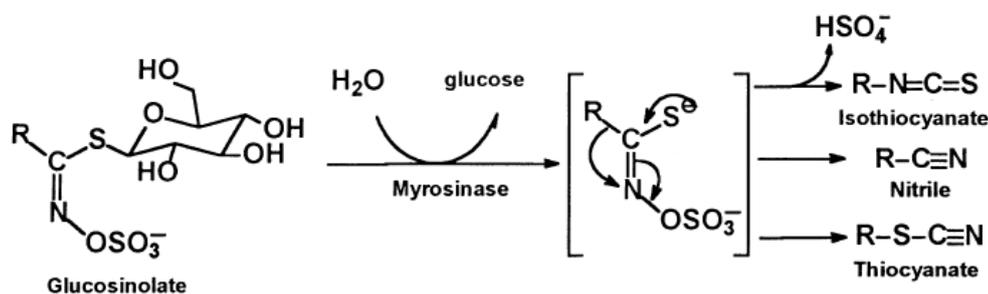
Se debe conocer la relación C/N del material biofumigante. Una relación demasiado baja hace que los microorganismos no puedan obtener energía para metabolizar el amonio y los nitratos, por lo que estos se acumulan pudiendo causar fitotoxicidad. Se ha demostrado que para no tener problemas, el material debe tener una relación 8-20 C/N (Bello *et al.*, 2013).

Hay que poner especial cuidado en el material elegido, ya que uno de los problemas de la biofumigación es la heterogeneidad y el nulo análisis compositivo que se les da a este tipo de materiales. Algunos autores (Bello *et al.*, 2013) advierten que algunas enmiendas orgánicas tienen el potencial para acumular compuestos perjudiciales y aumentar el nivel de inóculo del patógeno edáfico, por lo que se debe hacer una normalización de la composición de las enmiendas y un adecuado control de calidad.

#### 1.6.4 Glucosinolatos, enzima mirosinasa e isotiocianatos

La relación entre los glucosinolatos, la enzima mirosinasa y los isotiocianatos es la encargada de controlar algunos patógenos de origen edáfico. Los glucosinolatos no tienen toxicidad para los patógenos del suelo, sin embargo, los productos de su hidrólisis por la enzima mirosinasa en presencia de agua, sí que ejercen acción inhibitoria (Brown y Morra, 2005).

Los glucosinolatos se clasifican como S-glucósidos. Son el resultado del enlace de un azúcar reductor y el azufre de una molécula que no tiene carácter de hidrato de carbono (conocida como aglucona), estos compuestos son no volátiles y carecen de fragancia. Los glucosinolatos se sintetizan y almacenan en las vacuolas de las plantas como precursores relativamente estables de los isotiocianatos. Los glucosinolatos son solubles en agua debido a que la molécula de glucosa imparte características hidrofílicas a diferencia de los isotiocianatos que presentan propiedades hidrofóbicas. Los glucosinolatos se hidrolizan cuando el tejido del vegetal se rompe a consecuencia de un daño mecánico, entonces la enzima mirosinasa se pone en contacto con el sustrato y libera moléculas de glucosa, de bisulfato y de la correspondiente aglucona. Posteriormente, esta última experimenta un acomodo intramolecular que genera isotiocianatos, nitrilos, metilisotiocianatos, metilnitrilos y tiocianatos, los cuales son responsables del aroma y olor típico de estos productos (Figura 6). Los glucosinolatos intactos tienen actividad biológica limitada, pero aumentan su actividad cuando son hidrolizados a isotiocianatos (Campas-Baypoli *et al.* 2009).



**Figura 6.** Reacción química de formación de los isotiocianatos. Foto extraída de: (Brown y Morra, 2005)

Existen varios tipos de glucosinolatos que se acumulan en las vacuolas de las células. Alrededor de seis tipos son los más comunes en las Brassicáceas. Según especie y variedad, la cantidad y el tipo de glucosinolatos varía, por lo que hay especies más efectivas para el control de patógenos y existen especies que ejercen control sobre un patógeno específico. La cantidad de glucosinolatos difiere según las partes de la planta. En el sistema radicular se concentran los glucosinolatos que dan lugar a los isotiocianatos más tóxicos. Sin embargo, son los menos volátiles por lo que hay un menor contacto con los organismos del suelo. Los isotiocianatos formados a partir de los glucosinolatos del tallo, hojas y flores son más volátiles y ejercen una mayor acción inhibitoria al tener un mayor contacto (Kumar, 2005).

Clarckson y colaboradores, (2014) clasifican algunas especies de Brassicáceas con sus tipos de glucosinatos mayoritarios y sus productos de hidrólisis (Tabla 2).

**Tabla 2.** Glucosinatos y sus ITC's formados en algunas especies de *Brassicaceae*s. (Clarckson *et al.* 2014)

Especie	Glucosinolato	Isotiocianato
<b><i>Sinapis alba</i></b>	Sinalbin	4-hidroxibenzil ITC
<b><i>Brassica nigra</i></b>	Sinigrin	2-propenil ITC
<b><i>Brassica juncea</i></b>	Sinigrin	2-propenil ITC
<b><i>Raphanus sativus</i></b>	Glucorafenin	4-metilsulfonil-3-butenil ITC
<b><i>Eruca sativa</i></b>	Glucoerucin	4-metiltiobutil ITC

Brown y Morra, (2005) citan una serie de factores que intervienen en el proceso de conversión del glucosinolato a isotiocianatos y otros compuestos, para conseguir la máxima eficacia en el control de los patógenos.

Estos factores son:

- Periodo de persistencia en el suelo

El periodo de permanencia de los isotiocianatos en el suelo es muy reducido y por lo tanto su impacto ambiental es nulo. Por contrapartida, esta rápida pérdida hace que el contacto con los patógenos del suelo sea menor y pierda eficacia. El tipo de material biofumigante también determina la menor o mayor permanencia de estos compuestos en el suelo. Si se utiliza material fresco hay una pérdida más rápida que si se utilizan soluciones acuosas. Esto es debido a la adsorción de estos ITC con la mayor cantidad de carbono orgánico (Brown y Morra, 2005).

- Volatilización

Una de las principales vías por la que los ITC se pierden es la volatilización. Esto representa un problema debido a la poca difusión que tiene el ITC en el suelo y el posible peligro para la salud al encontrarse una gran cantidad de estos gases en la atmósfera. Sin embargo, no hay mucho peligro para la salud, ni para el medio ambiente ya que se produce una fotodegradación total a las 41 h (Brown y Morra, 2005).

- Materia orgánica

Está demostrado (Brown y Morra, 2005), que hay una menor efectividad de los ITC en suelos debido a la adsorción de estos con otros constituyentes del suelo. La mayor o menor reacción va a estar determinada a la cantidad de materia orgánica

del suelo. Esto se debe a la reacción de los ITC con algunos compuestos predominantes de los suelos orgánicos como son alcoholes, fenoles, tioles, ácidos carboxílicos y aminas

- Temperatura

Se ha visto que temperaturas elevadas incrementan la cantidad de ITC en la fase gaseosa, así como de otros compuestos volátiles como el tiometano o el dimetil sulfuro. Sin embargo, también se produce un incremento de la pérdida de estos productos en el suelo (Brown y Morra, 2005). Una mayor temperatura también supone un mayor poder fumigante (Gamliel y Stapleton, 1993).

- Agua

Los ITC se distribuyen en las tres fases del suelo, ya que son solubles en agua, y también pueden ser retenidos por la matriz sólida del suelo. Un mayor contenido de humedad edáfica incrementa el tiempo de permanencia en el suelo, minimizando las pérdidas, y por tanto, aumentando la efectividad. Por lo que se piensa, que un suelo con elevada cantidad de humedad y a temperaturas bajas puede tener un mejor efecto patogénico (Brown y Morra, 2005).

- Textura del suelo

Está demostrado que los suelos de textura fina, tienen una mayor pérdida de ITC debido a la adsorción por las arcillas. Suelos con textura gruesa presentan una pérdida intermedia, mientras que en suelos francos se producen las menores pérdidas. Sin embargo, el factor que realmente determina la pérdida de los ITC es la cantidad de materia orgánica que tiene el suelo, ya que las pérdidas entre distintas texturas no son realmente grandes, en comparación con las que se producen con el carbono orgánico (Brown y Morra, 2005).

- pH

Se probó que en el rango de pH de los suelos agrícolas no se altera el tiempo de residencia de los ITC ni de su efectividad (Borek *et al.*, 1995).

- Actividad microbiana en el suelo

No se han encontrado evidencias de que el cambio en la población microbiana del suelo altere el rango de permanencia de los ITC. Aunque se conoce que algunos microorganismos son capaces de degradar algunos nitrilos alifáticos y algunos aromáticos.

El desarrollo de especies que contengan una gran cantidad de glucosinolatos es una de las vías para mejorar esta técnica cultural, conjuntamente a la prospección y selección de especies que contengan un tipo especial de glucosinolato que actúe para un patógeno específico (Brown y Mora, 2005). Se piensa que se puede aumentar el contenido de glucosinolatos agregando precursores sintéticos de los ITC. Añadiendo metil jasmonato y ácido salicílico, se consiguió aumentar el contenido de glucosinolatos en hojas tras hacer una aplicación foliar de estos compuestos.

En cuanto a la concentración de glucosinolatos que se deberían incorporar, hay varios trabajos que nos dan una idea. Se sabe que el rango de metil-ITC que se necesita para hacer un control sobre los patógenos del suelo es 517-1294 nmol metil-ITC/g de suelo. Estos valores vienen dados por las dosis utilizadas de un fumigante químico de la familia de los sodio metil carbamatos. A partir de este dato, se puede extrapolar la cantidad mínima de glucosinolatos que deben tener los materiales biofumigantes para poder ser efectivos. La harina de colza tiene 40-50  $\mu\text{mol GCL.g}^{-1}$  tejido y las harinas de mostaza contienen 250  $\mu\text{mol GCL.g}^{-1}$  tejido, ambas con una eficiencia de conversión a ITC como máximo de un 20%. Con una enmienda de 2% de peso de harina respecto peso de suelo, podemos llegar al rango comercial de contenido en ITC, 1000 nmol metil-ITC/g de suelo (Brown y Mora, 2005). Otros autores explican que, la liberación de isotiocianatos llega solo a un 50% respecto a la cantidad de isotiocianatos potenciales que podrían ser liberados en la biofumigación "tradicional". Por eso, la extracción de glucosinolatos y de la enzima mirosinasa es un campo que puede ser interesante de desarrollar para lograr la máxima efectividad (Bellostas *et al.*, 2007).

### **1.7 TÉCNICAS DE BIOFUMIGACIÓN *IN VITRO***

Para probar el efecto que tiene una determinada especie vegetal sobre los aislados patogénicos telúricos existen técnicas *in vitro* que permiten medir su efecto inhibitorio. De esta manera, si los resultados son satisfactorios, las pruebas se pueden llevar a condiciones de invernadero. Todas las metodologías consultadas coinciden en enfrentar al patógeno y a los gases volátiles producidos en la biofumigación, en recipientes de volumen conocido y cerrados herméticamente. El material vegetal se trocea y se deposita en un recipiente añadiendo agua. Se coloca un trozo de micelio del hongo de diámetro conocido en una placa de Petri con medio APG adicionado de estreptomina. Se enfrenta esta placa a los gases formados en la biodescomposición. Se sella el recipiente con cinta adhesiva y se

mide diariamente el avance del hongo (Zurera *et al.*, 2007; Shaban *et al.*, 2011; Perniola *et al.*, 2012; Perniola *et al.*, 2014).

En la cátedra de Fitopatología de la Universidad de Cuyo se habían realizado ensayos previos de biofumigación *in vitro*, se utilizó la misma metodología utilizada en éstos debido a sus buenos resultados. Esta metodología es la de Villapudua y Munnecke (1988) donde utilizaron discos de 6 mm de diámetro del patógeno *Fusarium* crecido en APG dispuesto en el centro de una caja de Petri con 5 mL de APG. La caja de Petri se invirtió y se encajó en la embocadura de un frasco que contenía el material a ensayar mezclado con agua estéril a razón de 13 mL.g<sup>-1</sup>. Se selló el frasco con cinta y se incubaron a 23°C durante 6 días, el tiempo que le costó al tratamiento control a llegar al borde de la placa. Midieron diariamente el crecimiento micelial del hongo.

## **1.8 COMBINACIONES DE LA BIOFUMIGACIÓN CON OTRAS PRÁCTICAS AGRONÓMICAS**

### **1.8.1 Biosolarización**

La biosolarización es una técnica biológica para el control de patógenos del suelo fundamentada en la acción fumigante de las sustancias volátiles resultantes de la biodescomposición del material vegetal fresco y/o estiércol fresco. Se utiliza el calor de la radiación solar, con el fin de controlar los organismos patógenos del suelo (INIA, 2013).

La biosolarización surge de la combinación de dos métodos: biofumigación y solarización. Esta técnica se recomienda para sitios dónde la solarización no es eficaz (Villalobos, 2013). Esta combinación es efectiva ya que potencia la liberación de los gases volátiles (Mitidieri *et al.*, 2009), y presenta una mejor respuesta inhibitoria para nematodos que tratamientos que sólo utilizan la incorporación de materia orgánica. Produce un mayor incremento de la temperatura del suelo haciendo que la aplicación de materia orgánica pueda ser menor (Stapleton y Gamliel *et al.*, 1993; Bello *et al.*, 2013).

La combinación de biofumigación con brócoli más solarización, controló poblaciones de *Fusarium* spp. y nematodos en sandía, aumentando considerablemente el rendimiento y el peso del fruto respecto del testigo y del tratamiento con solarización (López *et al.*, 2014). Además, se redujo la necesidad de fertilizantes a base de fósforo y potasio. La biosolarización se mostró más rápida

en la eliminación del virus del mosaico del tomate que la biofumigación, tardando dos semanas menos en controlar el patógeno (Vilaseca *et al.* 2006).

### **1.8.2 Biofumigación y *Trichoderma* sp.**

Recientemente se hizo un estudio sobre la posibilidad de combinar *Trichoderma* sp. hongo antagonista de varios patógenos del suelo, con la biofumigación (Perniola, 2014). La biofumigación puede tener acción selectiva ya que la resistencia a los ITC's de *Sclerotinia* o *Pythium* son treinta veces menor que *Trichoderma* sp. (Segura, 2010).

Se comprobó que la combinación del antagonista *Trichoderma* sp. y biofumigación con *Brassica juncea* producía un efecto sinérgico en el control de *Fusarium graminearum* al reducir el crecimiento micelial del mismo, significativamente más que los tratamientos por separado (Perniola, 2014).

#### **Antecedentes de biofumigación en tomate**

No existen muchos trabajos publicados para la biofumigación en tomate. En España se encuentran dos trabajos; uno donde se utilizaron restos de cosecha del propio tomate para el control del virus del mosaico del tomate (Vilaseca *et al.*, 2006) y otro donde se emplearon restos vegetales de diferentes cultivos, y la adición de estiércol para el control de nematodos (Regalado *et al.*, 2006). En EEUU también se han realizado estudios en este ámbito, utilizando restos de cinco cultivos distintos para ver su respuesta al control de nematodos. (López-Pérez *et al.*, 2010). En Argentina un estudio utilizó restos de colza y restos de brócoli para determinar su efecto sobre parámetros fisicoquímicos y biológicos del suelo, evaluando la respuesta en *Fusarium solani* y en la población de nematodos (Mitidieri *et al.*, 2009). A nivel local en Mendoza y San Juan (Argentina) no existen estudios que evalúen el efecto de la biofumigación sobre patógenos de suelo en el cultivo del tomate.

Por este motivo el objetivo de este trabajo es ampliar el conocimiento del control que pueden ejercer algunas especies de *Brasicáceas* sobre el desarrollo de los patógenos edáficos y contribuir con una herramienta de bajo impacto ambiental al manejo integrado de las enfermedades del cultivo de tomate.

## **HIPÓTESIS GENERAL**

La biofumigación con Brassicáceas cultivadas es eficaz contra especies locales de *Fusarium* spp. patógenas en tomate.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la biofumigación con Brassicáceas cultivadas sobre especies de *Fusarium* spp. patógenas en tomate.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener aislados de *Fusarium* spp patógenos de tomate, a partir de plantas sintomáticas cultivadas en la región.
- Determinar el efecto de la biofumigación con partes aéreas de distintas especies de Brassicáceas cultivadas en la zona sobre aislados locales de *Fusarium* sp patógenos en tomate

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES PATÓGENAS DE *Fusarium* EN TOMATE**

#### **2.1.1 Recolección de plantas**

En el mes de septiembre de 2014 se visitaron distintas explotaciones comerciales destinadas al cultivo de tomate de los oasis hortícolas del centro y norte de la provincia de Mendoza y del sur de la provincia de San Juan (Argentina). En las visitas se buscaron plantas adultas con síntomas de marchitamiento de hojas y podredumbre de raíces. *In situ* se corroboró la afección de los haces vasculares mediante corte longitudinal del tallo. Las plantas seleccionadas se trasladaron en contenedores refrigerados al laboratorio de la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNCUYO.

#### **2.1.2 Descripción de síntomas**

Una vez en laboratorio, se efectuó una descripción detallada de los síntomas macroscópicos de las plantas seleccionadas. Se describió también los síntomas internos haciendo cortes longitudinales con un bisturí en cuello y raíz. Se tomaron fotos del plano general de la planta y de los detalles de las partes afectadas

#### **2.1.3 Aislamiento y purificación del patógeno**

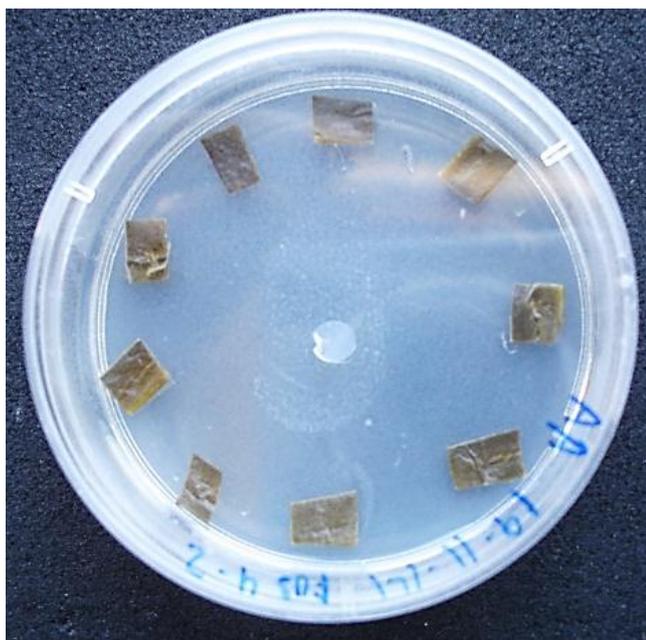
Se siguieron los procedimientos marcados por Leslie y Summerell (2006). Para ello, en los tejidos afectados se buscó y muestreó la parte de avance del hongo con el propósito de evitar la presencia de saprófitos que pudiesen aparecer en zonas más afectadas y necrosadas. Se cortaron trocitos de 5 mm de largo por 3 mm de ancho. Este material se lavó con agua 7 veces para limpiar toda impureza. Luego, en cámara de flujo laminar, el material se esterilizó superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio comercial (60 g.L<sup>-1</sup>) al 5% durante tres minutos. Posteriormente, se colocaron 5 trocitos en placas de Petri conteniendo medio APG (Agar Patata Glucosado – Britania) al 2% a pH 5,5. Las placas se incubaron en cámara de cultivo a 25±1 °C, durante 5 días.

Diariamente se observó la aparición de colonias fúngicas. Pasados tres días se constató mediante observación microscópica la presencia de *Fusarium* spp. Todas las colonias identificadas de este hongo se repicaron y purificaron mediante corte con bisturí de punta de hifas, que se colocaron en placas de Petri conteniendo APG 2% a pH 5,5 al que se había adicionado estreptomycin y neomicina, inhibidores del

crecimiento bacteriano. Estas placas se identificaron y se incubaron a  $25\pm 1$  °C en cámara de cultivo.

#### 2.1.4 Obtención de cultivos monospóricos

La obtención de un cultivo monospórico requiere de un procedimiento metodológico para conseguir identificar, individualizar y separar conidios de *Fusarium* sp. En cada una de las colonias purificadas, se empleó el procedimiento de Leslie y Summerell (2006). Para ello, en el centro de una placa de Petri de 5 cm de diámetro, conteniendo medio Agar Hojas de Clavel (CLA), se colocó un trozo de micelio del hongo en crecimiento activo. En los bordes de la caja se dispusieron sobre el agar aproximadamente 10 trozos de hoja de clavel estériles, rodeando al hongo (Figura 7). Para cada aislado de *Fusarium* spp purificado se efectuaron dos repeticiones. Para promover la formación de esporoquios, las placas fueron incubadas a  $25\pm 1$  °C, durante dos semanas, con alternancia de luz (12 h luz negra / 12 h luz blanca).



**Figura 7.** Placa sembrada con medio CLA.

Posteriormente, en cada aislado se cogió parte de los esporoquios con asa acodada estéril (Figura 8) y se suspendió en 10 mL de agua destilada estéril. Se tomó 1 mL de suspensión de macroconidios y se volcó a una placa de Petri conteniendo medio Agar Agua (AA), dispersando ese volumen uniformemente por toda la placa. Luego, se retiró el exceso de suspensión y se incubó la placa durante 12 a 16 horas en forma inclinada.

Pasado este tiempo, con la ayuda de un microscopio (40X a 100X), se identificaron y rotularon en cada placa 5 ó 6 macroconidios germinados, que se traspasaron

individualmente con sacabocados a una placa con medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar). Esta se incubó en cámara de cultivo a  $25\pm 1^{\circ}$  C con alternancia de luz (12 h luz blanca / 12 h luz negra). Finalmente, para conseguir el cultivo monosporico puro, a las 72 h se escogió una colonia por aislado y se repicó a una placa conteniendo SNA. Ésta se incubó a  $25\pm 1^{\circ}$  C con alternancia de luz (12 h luz blanca y 12 h luz negra).



**Figura 8.** Raspado de esporodoquios.

Después de un seguimiento diario del crecimiento miceliar, a los cinco días, con un sacabocados de 3 mm de diámetro se procedió a cortar varios discos del micelio del hongo, que fueron colocados para su conservación y colección en pequeños microtubos con 2 mL de agua estéril (Figura 9). Los aislados así coleccionados se mantuvieron a  $5\pm 1^{\circ}$  C hasta el momento de uso para estudios posteriores.



**Figura 9.** Microtubo con discos de micelio de *Fusarium* sp.

### **2.1.5 Identificación y caracterización de los aislados de *Fusarium***

En la identificación de los diferentes aislados de *Fusarium* puros se siguió el procedimiento de Leslie y Summerell (2006).

Para la caracterización de los esporodoquios y macroconidios se utilizó medio CLA de la misma manera como se procedió en el apartado anterior. Para la observación de otras características como presencia y morfología de microconidios, clamidosporas y tipo de fiálides, se utilizó además de CLA el medio SNA. Para ello, las placas se incubaron durante 15 días a  $25\pm 1^{\circ}$  C con alternancia de luz (12 h luz blanca/12 h luz negra). Para la caracterización de la coloración del micelio se utilizó medio APG al 2% y pH 7. Se colocó un disco del patógeno en crecimiento activo en el centro de una placa de Petri y se incubaron a  $25\pm 1^{\circ}$  C con alternancia de luz (12 h luz blanca/12 h luz negra).

### **2.1.6 Prueba de patogenicidad**

Con el propósito de determinar la patogenicidad en tomate de los aislados de *Fusarium* coleccionados se realizó una prueba de patogenicidad. Se utilizó la metodología de Apodaca y colaboradores (2001), que además permite clasificar los aislados según su virulencia. La inoculación del patógeno se hizo a través de una suspensión de conidios a una concentración de  $1,75 \cdot 10^4$  conidios.mL<sup>-1</sup> utilizando semillas de tomate de la variedad Río Grande sensible a *Fusarium* spp. Para comprobar la selectividad del método sobre tomate se empleó un aislado de

*Fusarium oxysporum* f.sp *cepae*, virulento en ajo y cebolla, pero no patógeno de tomate; procedente de la colección de la cátedra de Fitopatología.

#### - Preparación de las suspensiones

Los aislados obtenidos se dejaron crecer en medio APG 2% a pH 5,5 durante 10 días a  $25 \pm 1$  ° C. Posteriormente, en cada aislado se virtió una alícuota de agua estéril a la placa de Petri y con un asa de Drigalski se raspó el micelio superficial para producir la liberación de los conidios. Se sacó 1 mL de suspensión con una micropipeta y se introdujo en un tubo con 9 mL de agua estéril. Se homogenizó la dilución y se hizo el conteo de conidios en cámara de Nebauer. Cada suspensión se ajustó a una concentración de  $1,75 \cdot 10^4$  conidios.mL<sup>-1</sup>. Se realizó este procedimiento para todos los aislados.

#### - Inoculación de semillas y evaluación

Las semillas se lavaron con agua y se esterilizaron con NaClO comercial al 4% durante 3 minutos. Se enjuagaron con agua destilada estéril y se introdujeron en los tubos con la suspensión de conidios de  $1,75 \cdot 10^4$  conidios.mL<sup>-1</sup>. Se dejaron en inmersión durante 30 minutos. Por cada aislado de *Fusarium* se dispuso en una placa de Petri con medio AA 10 semillas distribuidas en forma de círculo y a igual distancia entre ellas. Todos los tratamientos se incubaron a  $25 \pm 1$ °C.

#### - Variables evaluadas

**% de germinación:** mediante la fórmula:

$$\text{Porcentaje de germinación} = \left( \frac{x}{N} \right) \times 100$$

x= número de semillas germinadas

N=número de semillas totales

**Incidencia:** a los cinco y siete días se relevó la incidencia (I) de la enfermedad medida mediante:

$$I = (n/N) \cdot 100$$

n= número de plántulas con síntomas de enfermedad

N=número de semillas totales

**Severidad:** evaluada a los siete días, siguiendo la siguiente escala según el grado de infección de la plántula:

- 0 = sin síntomas visibles
- 1 = puntos necróticos aislados en el hipocótilo y/o en los cotiledones
- 2 = oscurecimiento en la base del hipocótilo
- 3 = lesión necrótica de 1-5 mm en el hipocótilo
- 4 = lesión necrótica de 6-10 mm en el hipocótilo
- 5 = lesión necrótica mayor de 11 mm en el hipocótilo o muerte de plántula

- **Análisis estadístico**

Para el estudio de patogeneidad de los diferentes *aislados de Fusarium* se empleó un Diseño completamente aleatorizado (DCA) con 4 repeticiones. Las variables analizadas se sometieron a análisis de la varianza y prueba de comparación de medias (Test LSD-Fisher;  $\alpha=0,05$ ), previa comprobación de normalidad y de homocedasticidad, supuestos de este tipo de análisis paramétrico. Se empleó el software StatGraphics Centurion vXVI (2012).

## **2.2 EFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN *IN VITRO* SOBRE AISLADOS DE *Fusarium sp*, PATÓGENOS DE TOMATE**

### **2.2.1 Ensayo exploratorio de biofumigación *in vitro* sobre los aislados locales más virulentos de *F.oxysporum* y *F.solani***

- **Elección del material biofumigante**

Las especies elegidas como material vegetal biofumigante fueron:

- **Repollo blanco** (*Brassica oleraceae* var. *capitata*)
- **Coliflor** (*Brassica oleraceae* var. *botrytis*)
- **Brócoli** (*Brassica oleraceae* var. *italica*)
- **Berro** (*Nasturtium officinale*)
- **Rúcula** (*Eruca sativa*)

Estos materiales se consiguieron en el mercado de Mendoza, empleando solamente la parte aérea. Existen varias razones por las que se eligió utilizar la parte aérea en este trabajo. Por un lado, si bien se conoce que los isotiocianatos formados a partir de glucosinolatos de raíz son más tóxicos, éstos también son los menos volátiles (Kumar, 2005). Otra consideración es que en biofumigaciones a campo el material a utilizar puede estar en la misma finca o puede comprarse, para luego ser molido e incorporado al suelo; donde la parte aérea de estas especies representa el mayor volumen de material incorporado. Además, con las dosis frecuentemente empleadas (ver apartado 1.2), sería imposible biofumigar considerando solo la parte radical.

Cabe destacar que si bien existen otras especies de Brassicáceas con mayor contenido de glucosinolatos, y por ende con mayor potencial biofumigante, éstas no son cultivadas comercialmente en la zona y corresponden a especies como *Sinapis alba* (mostaza blanca) o *Brassica juncea* (mostaza india), solo presentes en forma de mala hierba (Kirkegaard, 1993).

#### - Elección de la dosis

Se testaron dos dosis de material biofumigante, 3 y 5 kg.m<sup>-2</sup> que equivalen a un tratamiento *in situ* de 30 y 50 t.ha<sup>-1</sup> respectivamente. La elección de estas dosis de aplicación se basan en los buenos resultados obtenidos por Iriarte y colaboradores (2011) y Lafi y colaboradores (2014) para el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* en cebolla utilizando repollo como biofumigante.

#### - Aislados patogénicos

Se escogieron los dos aislados que causaron mayor incidencia y severidad de enfermedad en la prueba de patogenicidad del ensayo anterior. Estos fueron F3 (*Fusarium solani*) (Figura 10a) y F5 (*Fusarium oxysporum*) (Figura 10b). Los aislados se hicieron crecer durante 7 días en medio APG al 2% y pH 5,5, adicionado con estreptomycin y neomicina (Shaban *et al.*, 2011), a 25±1 °C, 50% de humedad y con alternancia de luz (12 h luz blanca / 12 h luz negra).

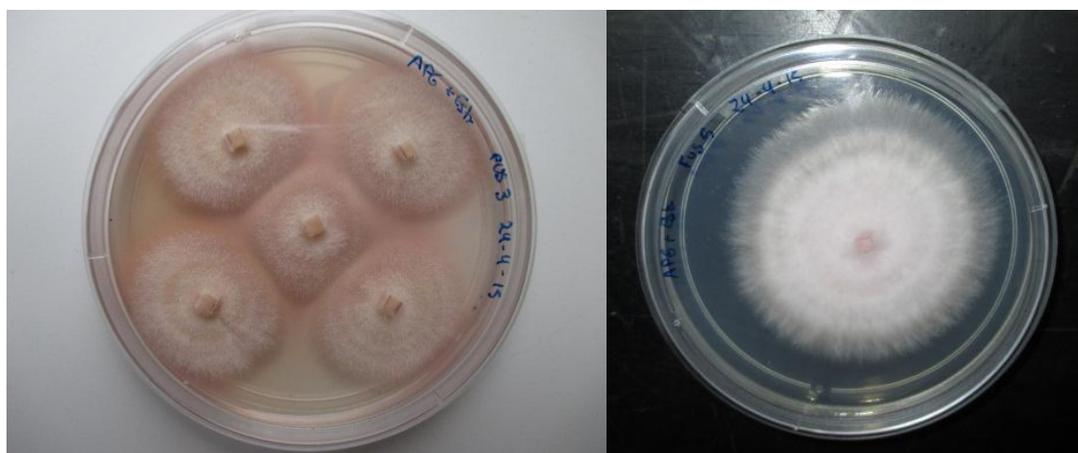


Figura 10 a y b. *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* antes de la biofumigación

### - Técnica de biofumigación

El ensayo se realizó siguiendo la técnica de Villapudua y Munnecke (1988) modificada, en la cual el hongo se enfrenta a los gases tóxicos formados en la hidrólisis de los glucosinolatos en presencia de agua y anaerobiosis.

Se utilizó un DCA empleando los cinco materiales biofumigantes mencionados en el apartado 1.1, con tres dosis: 0, 3 y 5 kg.m<sup>-2</sup>, sobre los dos aislados del patógeno. Para cada tratamiento se efectuaron 4 repeticiones.

Se emplearon frascos de vidrio de 5 cm de diámetro y 15 cm de altura. Se llenaron los frascos con la cantidad de agua destilada correspondiente según el tratamiento (13 mL de agua destilada estéril por gramo de material biofumigante) y se esterilizaron en autoclave a una presión de 1,2 atm durante 20 minutos.

Se prepararon placas de Petri de 5 cm de diámetro conteniendo 5 mL de medio APG al 2% pH 5,5 adicionado con estreptomycin y neomicina. Estas placas se rotularon en la parte inferior con dos ejes perpendiculares y se reservaron hasta el momento de su uso.

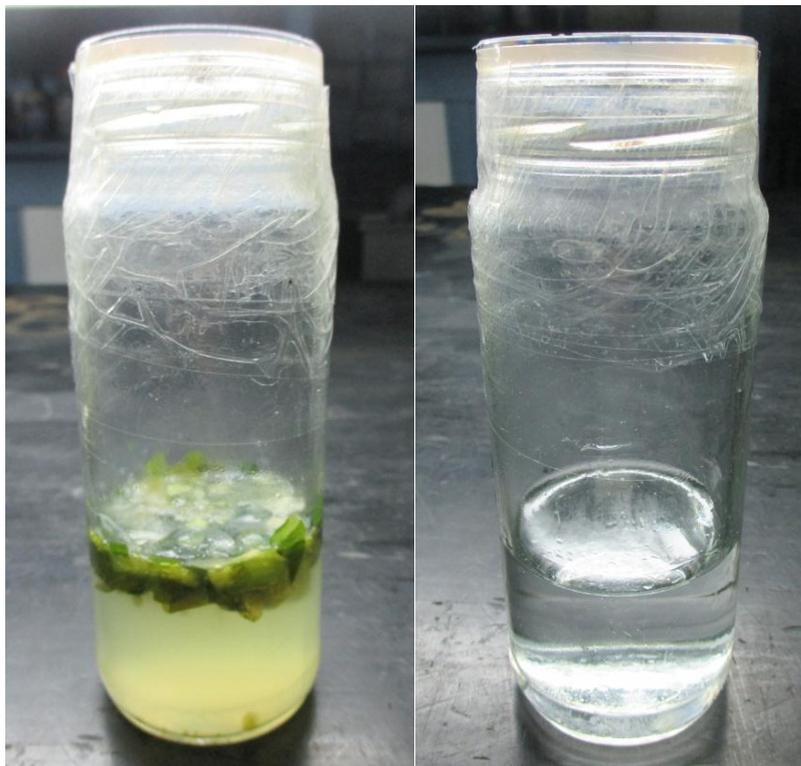
Se procedió al picado, pesado y posterior envasado del material vegetal. Se picó a un tamaño similar a la capacidad de corte del rotovator (Figura 11a). La cantidad de material añadido a cada frasco correspondió a la equivalente de 3 kg.m<sup>-2</sup> y 5 kg.m<sup>-2</sup>, según tratamiento (Figura 11b).<sup>7</sup>



**Figura 11 a y b.** Coliflor picada antes de ser introducida en el frasco. Tratamientos de berro de 5 kg.m<sup>-2</sup> (izq.) y 3 kg.m<sup>-2</sup> (der.)

Con un sacabocados, se cortaron discos de 5 mm de diámetro conteniendo al patógeno en crecimiento activo; y se colocaron en el centro de las placas de Petri rotuladas. Finalmente, la parte basal de la placa (con el medio y el disco) se utilizó como tapa del frasco que contenía el material biofumigante. Para sellar la unión se empleó cinta adhesiva, dándole vueltas para evitar pérdidas de gases y asegurar el

sellado (Figura 12a y b). Diariamente, con rotulador se marcó el crecimiento de la colonia del patógeno sobre los cuatro ejes.



**Figura 12 a y b.** Tratamiento de 3 kg.m<sup>-2</sup> de berro y el tratamiento testigo correspondiente.

#### - Variable evaluada

Se registró diariamente el diámetro de la colonia del hongo sobre ambos ejes y se calculó el diámetro medio. En base a éste se calculó el porcentaje de inhibición a las 96 h, mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{X-Y}{X} \times 100$$

Donde:

X= diámetro medio en mm del tratamiento testigo a las 96 h

Y= diámetro medio en mm del tratamiento a las 96 h

#### - Análisis estadístico

La variable estudiada se sometió a análisis de la varianza y prueba de comparación de medias (Test LSD-Fisher;  $\alpha=0,05$ ), previa comprobación de normalidad y de homocedasticidad, supuestos de este tipo de análisis paramétrico. Se empleó el software StatGraphics Centurion vXVI (2012).

### 2.2.2 Ensayo de biofumigación *in vitro* para la determinación de la mayor dosis inhibitoria de coliflor, sobre ambos aislados *Fusarium* sp.

#### - Elección de las dosis

Dado que la coliflor mostró la mayor eficacia en la biofumigación *in vitro*, se realizó un ensayo para evaluar la dosis de aplicación que producía la mayor inhibición de los aislados escogidos de *Fusarium* sp. Las dosis ensayadas fueron: 0 (testigo), 3, 5, 10 y 20 kg.m<sup>-2</sup>.

#### - Técnica de biofumigación

Se utilizó la metodología de biofumigación *in vitro* de Villapudua y Munnecke (1988) modificada, explicada en el apartado 7 de la introducción.

Se utilizó un DCA empleando coliflor como material biofumigante con cinco dosis: 0, 3, 5, 10 y 20 kg.m<sup>-2</sup>, sobre los dos aislados de *Fusarium*. Para cada tratamiento se efectuaron 4 repeticiones.

#### - Variables relevadas

Las variables estudiadas en este ensayo fueron: inhibición del patógeno y cantidad de conidios producidos por mm<sup>2</sup>.

#### Inhibición del patógeno

Al igual que en el anterior apartado, se registró diariamente el diámetro de la colonia del hongo sobre ambos ejes y se calculó el diámetro medio. Luego, en base a éste se calculó el porcentaje de inhibición a los 96 h, mediante la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{X-Y}{X} \times 100$$

Donde:

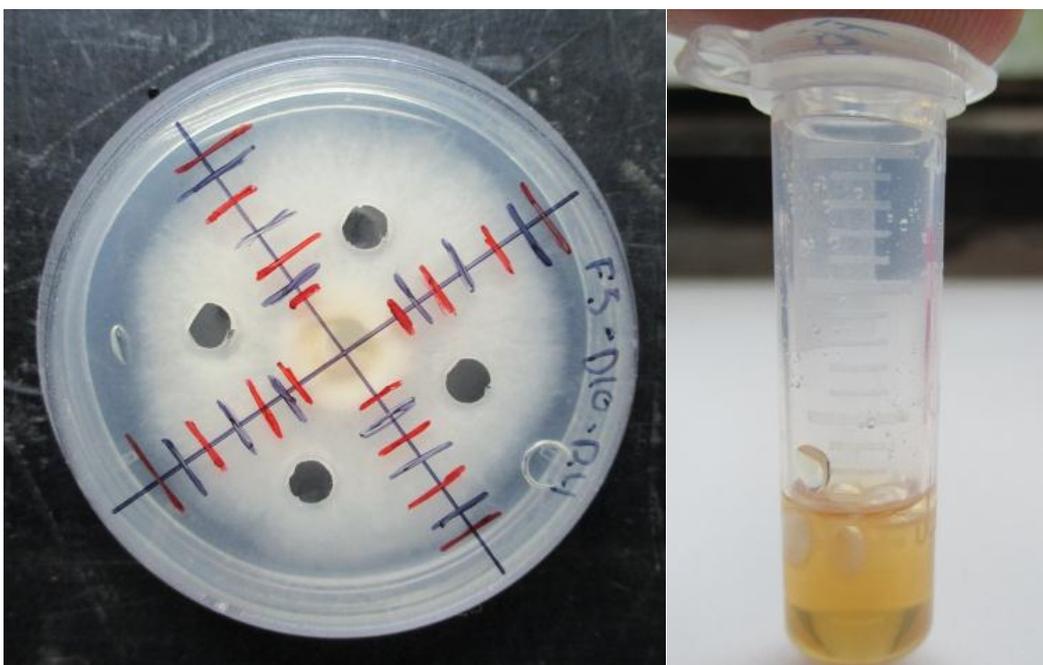
X= diámetro medio en mm del tratamiento testigo

Y= diámetro medio en mm del tratamiento

### Cantidad de conidios.mm<sup>-2</sup>

Para evaluar el efecto de la biofumigación sobre la producción de conidios del hongo, se prepararon microtubos con 500 µl de lactofenol, que detiene la actividad del hongo y lo preserva. Se prepararon tantos microtubos, como tratamientos y repeticiones se utilizaron en la biofumigación.

Tras terminar el ensayo de medición de diámetros del hongo, la placa de Petri se separó del frasco y se cortaron 4 discos de 3 mm a igual distancia del centro del hongo (Figura 13a) y se introdujeron en los microtubos con lactofenol para posterior conteo de conidios(Figura 13b).



**Figura 13 a y b.** Tratamiento tras sacar los discos. Discos de *Fusarium* en lactofenol.

Cada microtubo se agitó en vórtex durante 30 segundos, de manera de homogenizar la suspensión de conidios. Posteriormente, de esta, se tomaron 100 µl con micropipeta y se efectuó el conteo en cámara de Neubauer. A partir de la lectura se calculó el número de conidios por mm<sup>-2</sup>.

En los casos de los tratamientos con inhibición total, se verificó si la biofumigación tuvo carácter fungistático o fungicida. Para ello, se pasaron los discos totalmente inhibidos a una placa de Petri con medio APG al 2% y pH 5,5 y se dejó a 25 ± 1°C, con alternancia de luz (12 h luz blanca/12 h luz negra) y se dejó crecer durante 7 días para constatar si el hongo reanudaba el crecimiento.

- **Análisis estadístico**

Las variables estudiadas se sometieron a análisis de la varianza y prueba de comparación de medias (Test LSD-Fisher;  $\alpha=0,05$ ), previa comprobación de normalidad y de homocedasticidad, supuestos de este tipo de análisis paramétrico. Se empleó el software StatGraphics Centurion vXVI (2012).

**2.2.3 Ensayo de biofumigación bajo condiciones de invernadero, empleando el material y las dosis más eficaces, sobre ambos aislados del *Fusarium*.**

El ensayo de biofumigación bajo condiciones de invernáculo no se realizó conforme a los resultados obtenidos en los ensayos de los apartados 1 y 2.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES PATOGENAS DE *FUSARIUM* EN TOMATE**

##### **3.1.1 Recolección de plantas**

En el Departamento de Pocito, Provincia de San Juan ( $31^{\circ}39'17''\text{S}$ ,  $68^{\circ}34'46''\text{O}$ ) se encontró un invernadero con plantas adultas de tomate del cultivar Bigua F1 (De Ruitter) con crecimiento de tipo indeterminado (Figura 14) con síntomas de marchitamiento parcial (Figura 15a) y total (Figura 15b), acompañados de clorosis y decaimiento foliar con estado de clorosis mayor las hojas basales. Se seleccionaron un total de 5 plantas enfermas.

Cabe destacar que en los oasis de Mendoza, por la época de muestreo, no se encontraron plantas adultas con síntomas de la enfermedad; ya que en la mayoría de las explotaciones comerciales se estaban efectuando las labores para el transplante.



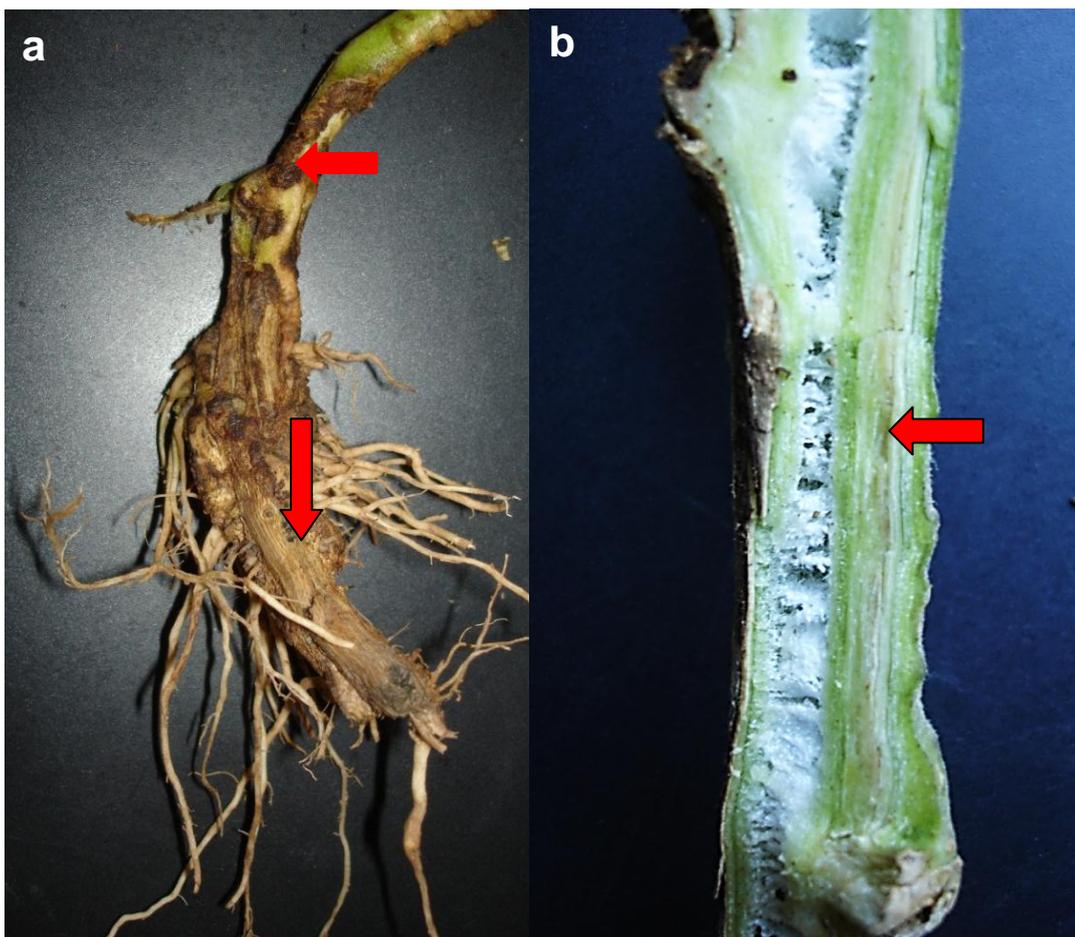
**Figura 14.** Invernadero donde se recogieron las plantas sintomáticas.



**Figura 15 a y b.** Marchitamiento parcial de la planta. Marchitamiento total.

### 3.1.2 Descripción de síntomas

En las plantas recolectadas se observó: raíces podridas amarronadas y canchales en el cuello de la planta (Figura 16a). Raíces con podredumbre corchosa y córtex suberificado. En el corte transversal del tallo y cuello de la planta se encontraron haces vasculares amarronados (Figura 16b).



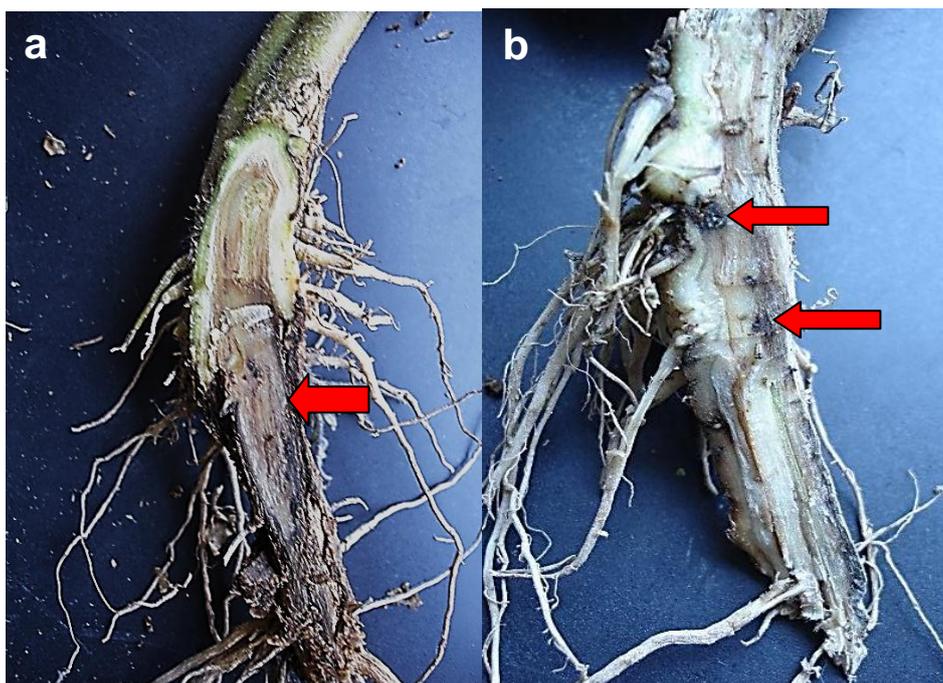
**Figura 16 a y b.** Raíces podridas amarronadas y canchros en el cuello. Haces vasculares marrones.

Los síntomas apreciados, coinciden con los expuestos por distintos autores (Zhang *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2001) para la fusariosis en tomate provocada por *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* o *Fusarium solani*.

### 3.1.3 Aislamiento y purificación del hongo

Del material vegetal recolectado se obtuvieron cinco aislados puros monospóricos de *Fusarium* sp, identificados como F1, F2, F3, F4 y F5.

F1 se aisló a partir de córtex suberificado y raíces con pudrición corchosa (Figura 17a); F2 y F3 procedieron de haces vasculares amarronados en el cuello de la planta muestreada. F4 y F5 se aislaron a partir de raíces corchosas de otra planta que también presentó el córtex totalmente marrón y heridas en los puntos de inserción de las raíces (Figura 17b).

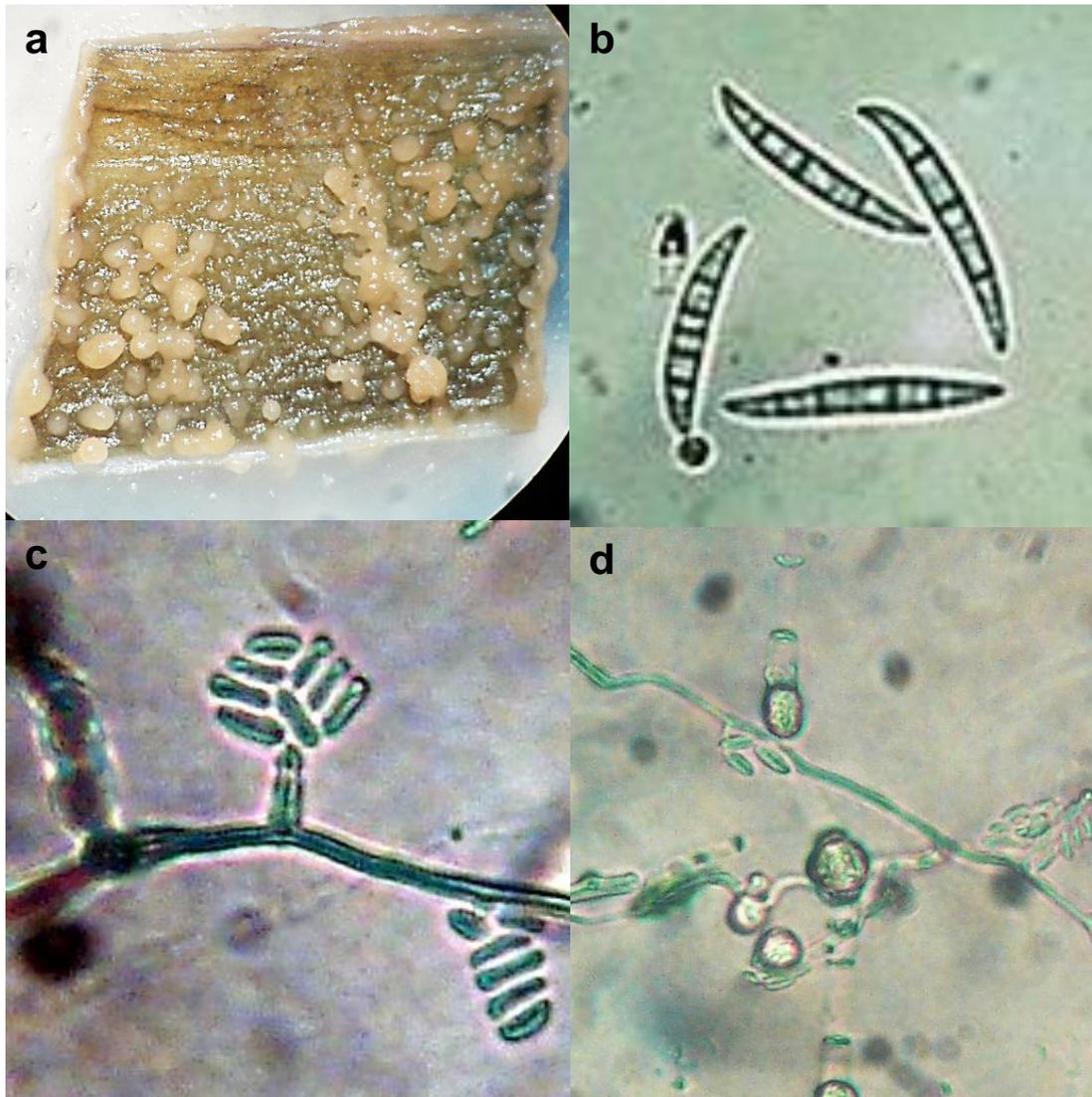


**Figura 17 a y b.** CórteX suberificado y pudrición radicular. Raíz amarronada con heridas en algunas partes de la raíz.

### 3.1.4 Identificación y caracterización

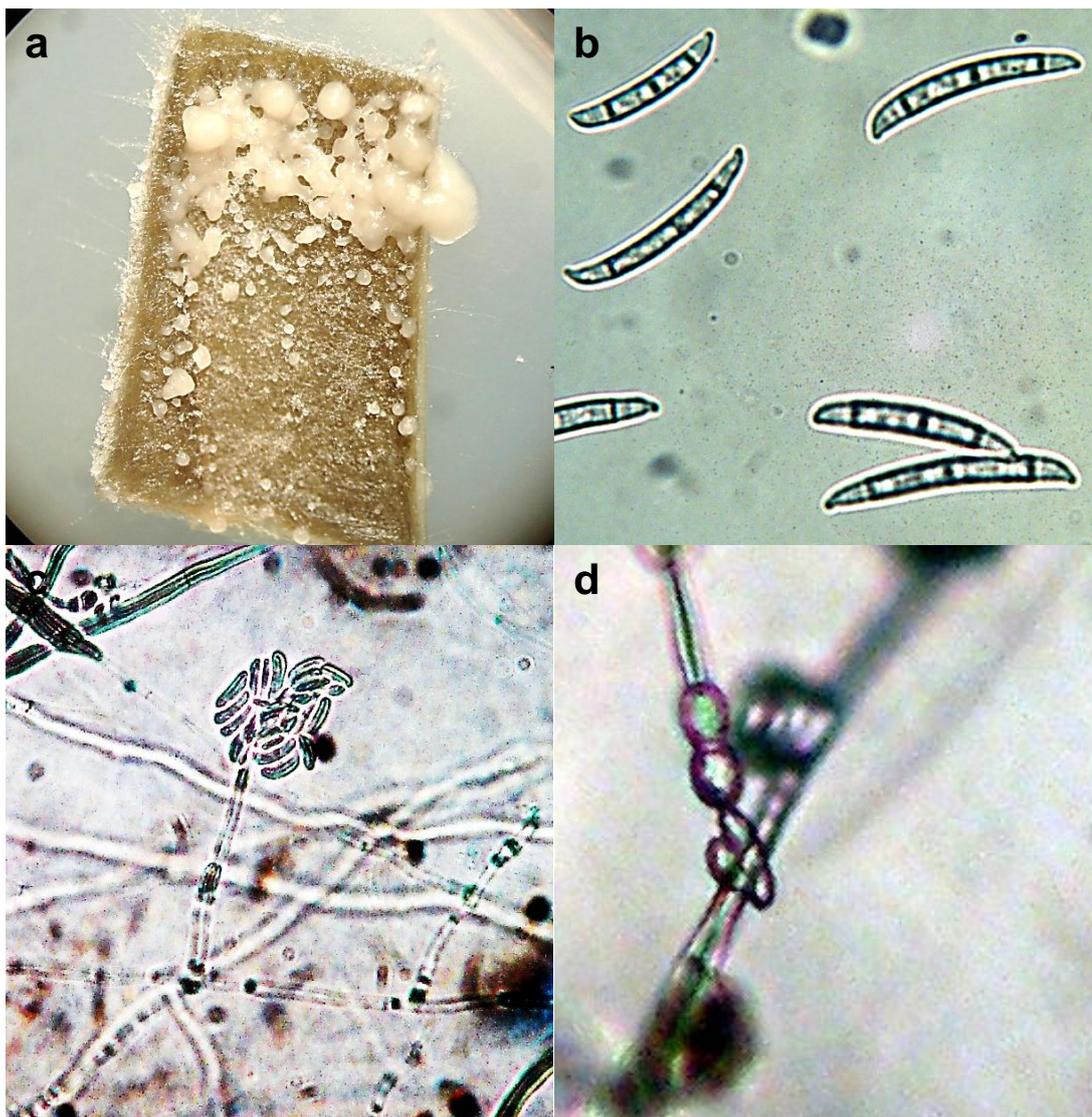
Cuatro de los aislados monospóricos purificados (F1, F2, F4 y F5) fueron identificados como *Fusarium oxysporum* y el restante (F3), como *Fusarium solani*.

Las características que se observaron en los aislados de *Fusarium oxysporum* coinciden con las citadas por Leslie y Summerell (2006) y Booth (1977). Los esporodocios formados en CLA fueron abundantes y de color naranja pálido (Figura 18a). Los macroconidios, con una longitud media de 45  $\mu\text{m}$ , presentaron su parte dorsal curva y la ventral recta, entre tres y cinco septos en general, la célula apical de tipo gancho y la basal con forma de punta (Figura 18b). Los microconidios, ovales y sin septos, se encontraron agrupados en falsas cabezas sobre monofialides cortas (Figura 18c). Se formaron gran cantidad de clamidosporas de paredes gruesas, simples o dobles, dispuestas de manera intercalar o terminal (Figura 18d). Los aislados presentaron colonias en APG con coloración micelial blanca en los bordes y salmón claro en el centro.



**Figura 18 a, b, c y d.** Observaciones de *Fusarium oxysporum*: a) esporodoquios (bajo lupa), b) macroconidios, c) microconidios en falsas cabezas sobre monofialide corta y d). clamidosporas (b, c y d corresponden a observaciones microscópicas).

El otro aislado se identificó como *Fusarium solani* de acuerdo a la caracterización de Leslie y Summerell (2006) y Booth (1977). En CLA se encontraron abundantes esporodoquios de color crema (Figura 19a), con macroconidios largos, con 4-5 septos en general, de forma ligeramente curvada, con la célula apical de tipo redondeada y la basal con forma de pie (Figura 19b). Se observaron microconidios elipsoidales largos, con 0 ó 1 septo, agrupados en falsas cabezas sobre monofialides largas (Figura 19c). Se hallaron clamidosporas simples o dobles, de forma globosa (Figura 19d). El hongo presentó micelio con coloración blanquecina en APG.



**Figura 19 a, b, c y d.** Observaciones de *Fusarium solani*: a) esporoquios (bajo lupa), b) macroconidios, c) microconidios en falsas cabezas sobre monofialide larga y d). clamidosporas (b, c y d corresponden a observaciones microscópicas).

### 3.1.5 Prueba de patogenicidad

#### - Porcentaje de germinación

En el porcentaje medio de germinación a los 7 d no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ( $p_v=0,9350$ ), con una media general del 89,6 % (Tabla 3). A pesar de ello, el porcentaje de germinación fue menor en los tratamientos con el patógeno respecto al testigo, pero sin haber diferencia significativa. Esto puede deberse a que el hongo coloniza la semilla antes de que pueda germinar, coincidiendo con otros autores que señalan la capacidad de *Fusarium* de infectar semillas e inhibir su germinación (Jones *et al.*, 2001).

**Tabla 3.** Porcentaje medio de germinación a los 7 d.

Aislados	Germinación Media (%)
F1	87,5
F2	87,5
F3	90
F4	90
F5	90
Testigo	92,5
<i>F. O. f.sp cepae</i>	90

### - Incidencia

Respecto a la incidencia de la enfermedad en las semillas germinadas, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, tanto a los 5 d como a los 7 d. A los cinco días se clasificaron los tratamientos en tres grupos según la incidencia mostrada. Como era de esperar, el primer grupo conformado por el testigos y el tratamiento con *F. o. f.sp. cepae*, no mostró prácticamente incidencia (0% y 15% respectivamente), corroborando de esta manera la especificidad del método ya expuesta anteriormente por Apodaca y colaboradores (2001). Cabe destacar que la pequeña incidencia encontrada en formas especiales que no atacan a tomate han sido reflejadas por otros autores y pueden deberse a pequeñas lesiones sobre el hipocotilo, dada la gran concentración de patógeno inoculado (Apodaca y Sanchez, 1999; Apodaca *et al.*, 2001). El segundo grupo, formado por F1 y F4, mostró una incidencia media del 57,5% y el tercer grupo, constituido por F3 y F5, es el que causó la mayor incidencia con una media del 86,5%. Como se citó, a los siete días también se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, la menor incidencia para todos los tratamientos con patógeno fue del 92,5% (Tabla 4). Esto denota la importancia del seguimiento diario del ensayo de patogenicidad y la determinación del momento oportuno de evaluación, de manera de poder diferenciar los aislados en un rango amplio de incidencias, como ocurre a los 5 d. Caben destacar los aislados F3 y F5, que obtuvieron los mayores niveles de incidencia a los 5 d, manifestando mayor agresividad que el resto de los aislados ensayados. Los niveles de incidencia obtenidos coinciden con los de Apodaca y colaboradores (2001). Estos datos confirman la patogenicidad de los aislados obtenidos en las plantas de tomate.

**Tabla 4.** Incidencia media (%) a los 5 y 7 días de la inoculación.

Aislados	Incidencia Media a 5 días (%)	Incidencia Media a 7 días (%)
F1	57,5 b	97,5 bc
F2	67,5 bc	92,5 b
F3	90 c	100 c
F4	57,5 b	97,5 bc
F5	82,5 c	100 c
Testigo	0 a	0 a
<i>F. o. f.sp cepae</i>	15 a	15 a

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (Test LSD-Fisher  $\alpha$ ;=0,05).

#### - Severidad

Los niveles de severidad observados en este estudio a partir de la metodología de Apodaca *et al.* (2001) se muestran en la figura 20

Se encontraron diferencias significativas entre los aislados. Se distinguieron tres grupos según el grado de severidad observado. El primer grupo formado por el testigo y el tratamiento con *F.o. f.sp. cepae* no mostró prácticamente severidad. El segundo grupo formado por F1 y F4 mostró una severidad media de 3,675 y el tercer grupo formado por F3 mostró la mayor virulencia con 4,725. Los aislados F2 y F5 mostraron severidad intermedia entre estos dos últimos grupos (Tabla 5). Se observa que F3 (*Fusarium solani*) es el aislado más virulento debido a los valores de incidencia y severidad obtenidos, seguido por el aislado F5 (*Fusarium oxysporum*).

**Tabla 5.** Severidad del patógeno siguiendo la escala de 0 a 5 siendo 0= no incidencia del patógeno y 5= grado máximo de virulencia.

Aislado	Severidad Media
F1	3,85 b
F2	4,025 bc
F3	4,725 c
F4	3,5 b
F5	4,075 bc
Testigo	0 a
<i>F.o.f.sp. cepae</i>	1,45 a

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (Test LSD-Fisher  $\alpha$ ;=0,05).



**Figura 20. a, b, c, d, e, f y g.** Indican nivel 0, 1, 2, 3, 4, 5a y 5b en la escala de severidad.

## 3.2 EFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN *IN VITRO* SOBRE AISLADOS DE *FUSARIUM* SP PATÓGENOS DE TOMATE

### 3.2.1 Biofumigación *in vitro* sobre aislados patogénicos de *Fusarium* sp.

Se encontraron diferencias significativas entre los materiales biofumigantes utilizados para ambas dosis y los aislados empleados (Tabla 6). En la Figura 22, se presentan ordenados de menor a mayor inhibición las combinaciones Aislado-Material-Dosis. La mayor inhibición de *Fusarium solani* fue producida por el repollo, a dosis de 3 kg.m<sup>-2</sup> con un valor medio del 19%; sin embargo, en el caso de *Fusarium oxysporum* este mismo material resultó ser el que más estimuló el crecimiento del patógeno. Si bien se esperaban valores de inhibición más altos, la coliflor resultó el mejor biofumigante de todas las Brassicáceas ensayadas, al inhibir un 13,4% y 15%, tanto a *F.oxysporum* como *F. solani* respectivamente. La coliflor fue el único material que consiguió inhibir *F.oxysporum* (Figura 21), sin embargo no mostró diferencias significativas en la inhibición de *F. solani* con respecto al repollo. Para los aislados de *F. solani*, no se observaron diferencias en la inhibición del crecimiento según las dosis de coliflor utilizadas. Contrariamente, en el caso de *F. oxysporum* se logró mayor inhibición al utilizar la dosis mayor.

Iriarte y colaboradores (2011) ya habían comprobado la eficacia del repollo como material biofumigante en el control de *F. oxysporum* f.sp *cepae*, sin embargo, en nuestro trabajo no le produjo inhibición alguna. Lafi y colaboradores (2014) indican que la biofumigación *in vitro* con repollo a 5 kg.m<sup>-2</sup> inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* f.sp *cepae* en un 100% y el de *F. proliferatum* en un 80% y afirman también que la rúcula como material biofumigante provocó la estimulación del crecimiento de estos patógenos de cebolla. Algunos autores exponen la selectividad que presentan los isotiocianatos respecto algunos patógenos (Brown y Morra, 2005), ya que cada Brassicácea tiene un perfil distinto de glucosinolatos y por consiguiente de ITC's formados (Campas-Baypoli *et al.*, 2009). El Berro, la rúcula y el brócoli no consiguieron inhibir ninguno de los patógenos, de hecho, estimularon el crecimiento de estos. Otros autores señalan la eficacia del brócoli como material biofumigante (Mitidieri *et al.*, 2009; López-Pérez *et al.*, 2010) contrariamente, en este trabajo no tuvo eficacia. Este comportamiento podría explicarse principalmente porque la cantidad de glucosinolatos presentes en el brócoli varía según la variedad, las condiciones de cultivo, el clima, el manejo agronómico y el manejo postcosecha (Campas-Baypoli *et al.* 2009).

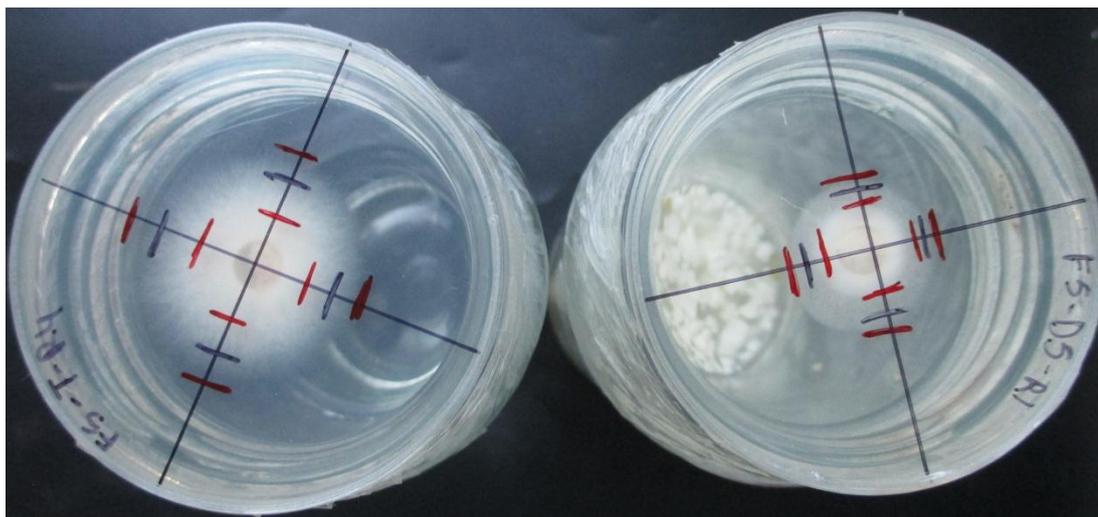


Figura 21. Tratamiento de coliflor a dosis de 5 kg.m<sup>-2</sup> para *F.oxysporum*.

Tabla 6. Inhibición/Estimulación media para los patógenos a dosis de 3 y 5 kg.m<sup>-2</sup>.

Materiales	<i>Fusarium solani</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
	Inhibición/ Estimulación media (%) Dosis 3 kg.m <sup>-2</sup>	Inhibición/ Estimulación media (%) Dosis 5 kg.m <sup>-2</sup>	Inhibición/ Estimulación media (%) Dosis 3 kg.m <sup>-2</sup>	Inhibición/ Estimulación media (%) Dosis 5 kg.m <sup>-2</sup>
Berro	-17.2 a	-0.8 b	-3 c	-7.8 bc
Brócoli	-7.9 ab	1.5 b	-8.3 bc	-18.1 ab
Rúcula	-5.8 ab	-19.7 a	-20.4 ab	-19.12 ab
Testigo	0 b	0 b	0 c	0 c
<b>Coliflor</b>	<b>13.1 c</b>	<b>15 c</b>	<b>2 c</b>	<b>13.4 d</b>
Repollo	19.2c	16.7c	-25.2 a	-26.6 a

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (Test LSD-Fisher  $\alpha$ ;=0,05). Porcentajes con signo negativo significa estimulación del crecimiento respecto al testigo

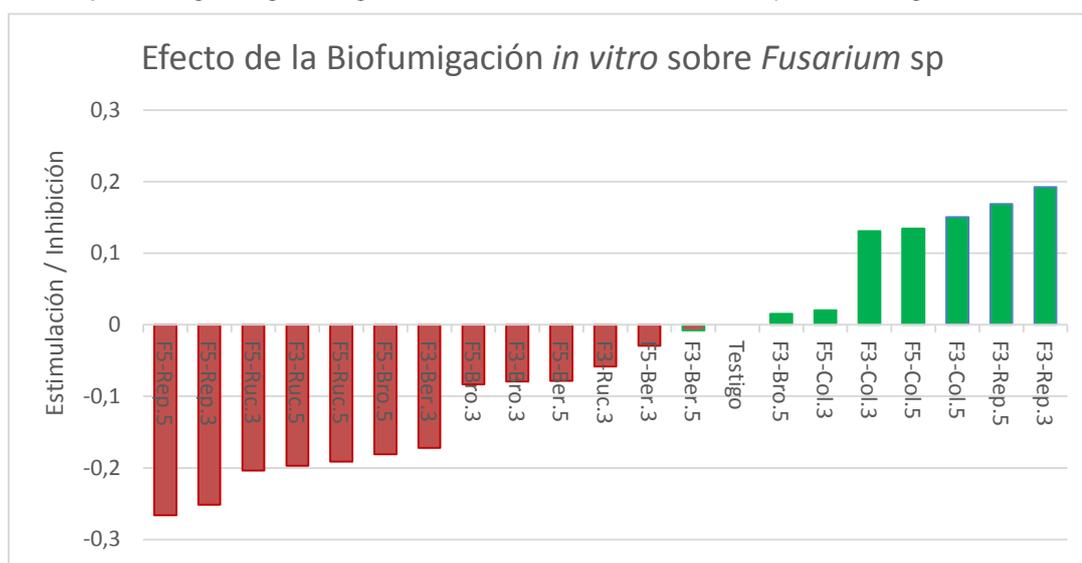
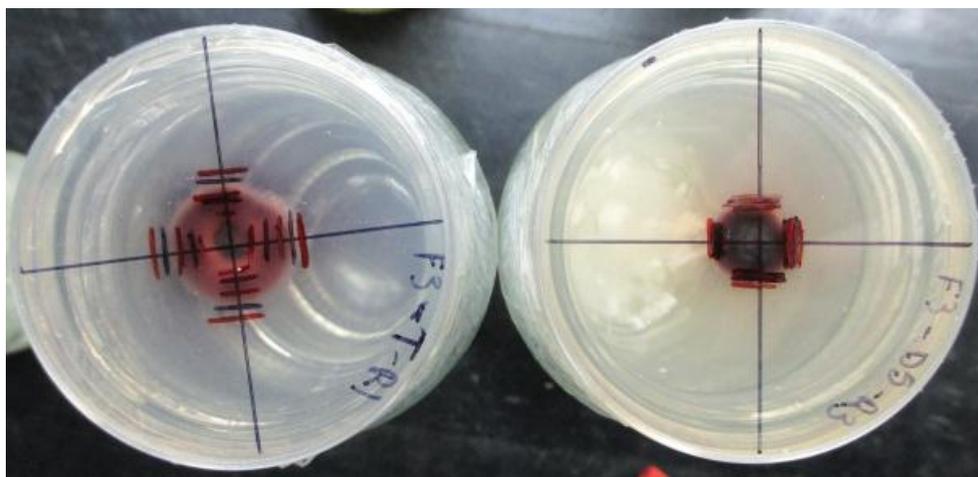


Figura 22. Efecto de la biofumigación *in vitro* sobre *Fusarium sp.*

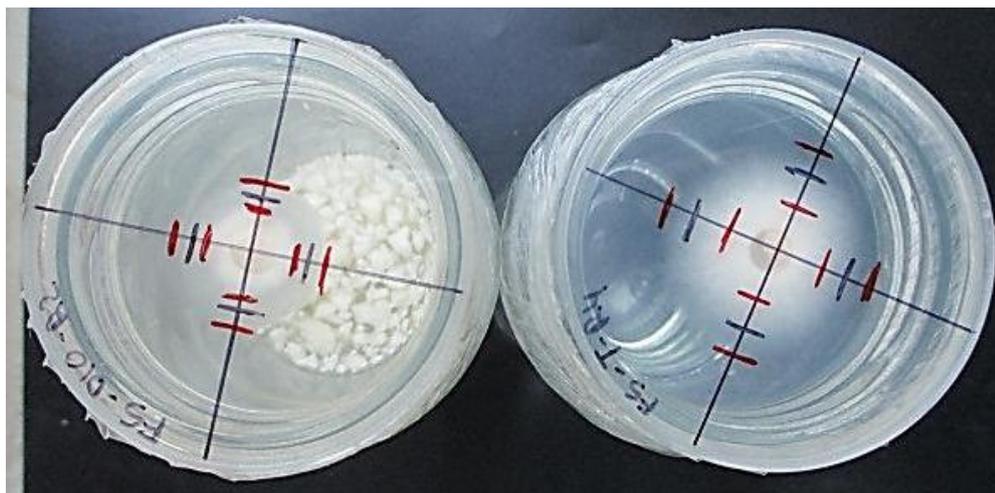
### 3.2.2 Efecto de la biofumigación *in vitro* sobre aislados de *Fusarium sp.* con restos de coliflor.

Se observaron diferencias significativas entre las dosis testadas tanto para la inhibición del crecimiento como para la producción de esporas en los dos patógenos (Tabla 7 y 8). *Fusarium solani* volvió a mostrarse más sensible al tratamiento de biofumigación tanto para la inhibición del crecimiento, como para la producción de esporas (Figura 23). La mayor inhibición fue la conseguida por el tratamiento de 5 kg.m<sup>-2</sup> con una inhibición del 27,5%. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos de 5 kg.m<sup>-2</sup> respecto al testigo y a la dosis de 3 kg.m<sup>-2</sup>. La dosis de 10 kg.m<sup>-2</sup> resultó con características intermedias entre los tratamientos de 3 y 5 kg.m<sup>-2</sup>. Para esta especie se encontraron diferencias significativas en la producción de conidios entre los tratamientos, siendo menor la producción en el tratamiento de 5 kg.m<sup>-2</sup>. No hubo diferencias en este ámbito entre las dosis de 10 kg.m<sup>-2</sup> y el testigo. Analizando la inhibición del crecimiento y la producción de esporas, el tratamiento que mejor actuó para controlar el hongo fue el tratamiento de 5 kg.m<sup>-2</sup>, por detrás del tratamiento de 20 kg.m<sup>-2</sup>, que resultó letal.



**Figura 23** Tratamientos de 5 kg.m<sup>-2</sup> en comparación con tratamiento testigo

Para el caso de *F. oxysporum* no se encontraron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento entre dosis de 5 y 10 kg.m<sup>-2</sup>, la mayor inhibición (21,6 %) se dio con el tratamiento de 10 kg.m<sup>-2</sup> (Figura 24). Como era de esperar, se encontraron diferencias significativas entre estos últimos con el tratamiento testigo.



**Figura 24.** Tratamiento de 10 kg.m<sup>-2</sup> (Izquierda) y testigo (derecha)

Es especialmente llamativo la producción de esporas por *F. oxysporum*, ya que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de 3, 5 y 10 kg.m<sup>-2</sup>, sin embargo la producción fue significativamente mayor que el tratamiento testigo. Se podría inferir que el hongo en factor de estrés aumenta la producción de esporas como manera de supervivencia. En este caso los mejores tratamientos fueron los de 5 y 10 kg.m<sup>-2</sup>.

**Tabla 7.** Inhibición media del crecimiento sobre *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*

Tratamiento	Inhibición media (%) <i>Fusarium solani</i>	Inhibición media (%) <i>Fusarium oxysporum</i>
Testigo	0,00 a	0,00 a
Dosis 3	13,52 b	8,11 ab
Dosis 5	27,50 c	15,43 b
Dosis 10	22,91 bc	21,58 b
Dosis 20	100,00 d	100,00 c

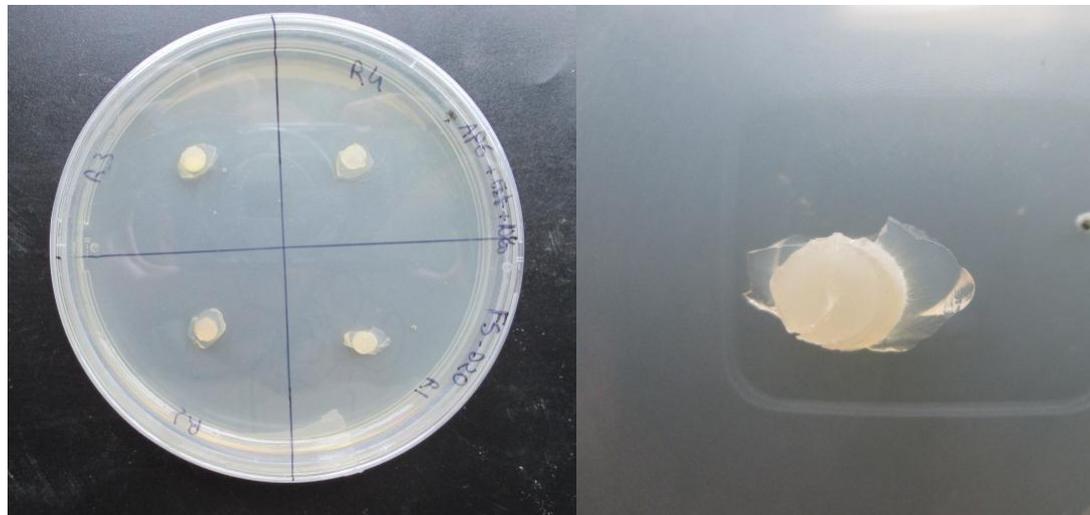
Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (Test LSD-Fisher  $\alpha=0,05$ ).

**Tabla 8.** Producción media de conidios de *Fusarium solani* y de *F. oxysporum* para los distintos tratamientos.

Tratamiento	Cantidad media de Conidios.mm <sup>-2</sup> <i>Fusarium solani</i>	Cantidad media de Conidios.mm <sup>-2</sup> <i>Fusarium oxysporum</i>
Testigo	16203,7 c	40299,2 b
Dosis 3	5772,3 b	97146,9 c
Dosis 5	4872,7 ab	86164,2 c
Dosis 10	15835,1 c	85760,0 c
Dosis 20	0 a	0 a

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (Test LSD-Fisher  $\alpha=0,05$ ).

La dosis de 20 kg.m<sup>-2</sup> resulto letal para los dos patógenos con una inhibición del 100% de su crecimiento. Se comprobó el efecto fungicida, ya que tras la resiembra del patógeno, no se consiguió reavivar el crecimiento en condiciones favorables (Figura 25a y b).



**Figura 25 a y b.** *F.oxysporum* después de la resiembra tras la biofumigación. Detalle

Las dosis de 3, 5 y 10 kg.m<sup>-2</sup> han tenido éxito en otros estudios con *Fusarium* spp. (Iriarte *et al.* 2011; Lafi *et al.*, 2014). Sin embargo, en este estudio no fueron efectivas dando unos pobres resultados en su capacidad de inhibir los patógenos, con valores medios máximos del 27% para *F. solani* y 21% para *F. oxysporum*. Estas dosis no realizan un control eficaz de estos patógenos, ya que se considera que un tratamiento es supresivo cuando la inhibición llega como mínimo al 50% (Mayton *et al.* 1996; Zurera *et al.* 2007). La combinación de la biofumigación con solarización o control biológico puede llegar a ser una buena herramienta para aumentar su eficacia y llegar a controlar el patógeno (Bello *et al.* 2013; Perniola *et al.* 2014).

Para lograr una dosis letal de 20 kg.m<sup>-2</sup> es necesario incorporar una cantidad excesiva de material vegetal. Trasladado al campo, la técnica sería inviable debido a la necesidad de incorporar 200 t.ha<sup>-1</sup> de coliflor, lo que significa casi 10 veces más que el rendimiento medio del cultivo. Por otra parte, sería impracticable por la dificultad del picado e incorporación y porque prácticamente habría que sembrar tomate o transplantarlo sobre una capa de coliflor picada.

Debido a estos resultados, no se lleva a cabo el ensayo de biofumigación en condiciones de invernadero.

#### 4. CONCLUSIONES

- Se identificaron dos especies: *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* y se probó la biofumigación en los aislados patógenos más virulentos.
- En la biofumigación *in vitro*, sobre el rango de Brassicáceas estudiadas, la coliflor resultó ser la más eficaz.
- Se logró inhibición total de *F. solani* y de *F. oxysporum* con dosis de 20 kg.m<sup>-2</sup> de coliflor, pero desde el punto de vista práctico, es inviable realizar biofumigación en condiciones de invernadero o de campo con dosis de 20 kg.m<sup>-2</sup> de coliflor.
- La técnica no debería descartarse y encarar futuros estudios con los aislados de *Fusarium* patógenos en tomate variando el material utilizado en la biofumigación, o combinando especies biofumigantes. También, dado que se han descrito buenos resultados cuando la biofumigación se combina otras labores agroecológicas como la solarización o el control biológico; se sugiere estudiar el efecto de estas combinaciones para aumentar la eficacia contra ambos aislados del patógeno.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G.N. 1985. Fitopatología. Noriega Editores, Editorial Limusa, 2º Edición. 201-221, 339-380 pp.
- APODACA, M.A.; ZABALETA, E.; OSADA, S.; GARCÍA, R.; VALENZUELA, J.G. 2001. Comparación de técnicas para evaluar *in vitro* la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* y efecto de la temperatura. Revista Mexicana de Fitopatología, vol.19. 197-202 pp.
- ARBELÁEZ, G. 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Revista Agronomía Colombiana, vol.17. 11-22 pp.
- ARGERICH, C.; TROILO, L.; RODRÍGUEZ, M.; IZQUIERDO, J.; STRASSERA, M.E.; BALCAZA, L.; DAL SANTO, S.; MIRANDA, O.; RIVERO, M.L.; GONZÁLEZ, G.; IRIBARREN, M.J. 2011. Manual de buenas prácticas agrícolas en la cadena del tomate. Ediciones Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Argentina. 265 pp.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota, USA. 218 pp.
- BARÓN, C.G.; BARÉS, C.; MARADEI, F. 2000. Manejo poscosecha de tomate. Ediciones Mercado Central de Buenos Aires, Argentina. 1-4 pp.
- BELLO, A.; TELLO, J.C.; GONZÁLEZ, J.A. 1997a. Producción de tomate en España sin Bromuro de Metilo. Vida Rural, N°50. 81-84 pp.
- BELLO, A.; GONZÁLEZ, J.A.; TELLO, J. 1997b. La biofumigación como alternativa a la desinfección de suelos. Horticultura General, vol. 17. 41-43 pp.
- BELLO, A.; LÓPEZ-PÉREZ, J.A.; DÍAZ VIRULICHE, L. 2013. Biofumigación y solarización como alternativas al bromuro de metilo. AEC. [[www.geoscopio.com/empresas/aecientificos/intereshtml/biofumigacion/solarizacion.htm](http://www.geoscopio.com/empresas/aecientificos/intereshtml/biofumigacion/solarizacion.htm)]
- BELLOSTAS, N.; SORENSEN, J.C.; SORENSEN, H. 2007. Biofumigation: from the "classical" approach to the use of biorefined glucosinolates as natural plant protection agents. Paper presentado en: Nutrition and Processing Workshop of the International Rapeseed Congress, Wuhan, China. 6 pp.
- BLANCARD, P. 1996. Enfermedades del tomate. Observar, identificar, luchar. Ediciones Mundi-Prensa. 170-172, 179-181 pp.
- BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. Kew. Commonwealth Mycological Institute. 237 pp.
- BOOTH, C. 1977. *Fusarium*: laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 58 pp.

- BOREK, V.; MORRA, M.J.; BROWN, P.D.; McCAFFREY, J.P. 1995. Transformation of the glucosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allyl nitrile in soil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol.43. 1935-1940 pp.
- BORRERO, C.; TRILLAS, M.I.; ORDOVÁS, J.; TELLO, J.C.; AVILÉS, M. 2004. Predictive factors for the suppression of *Fusarium* wilt of tomato in plant growth media. *Phytopathology*, vol.94:1094-1101 pp.
- BROWN, J.; MORRA, M.J. 2005. Glucosinolate-containing seed meal as a soil amendment to control plant pests. Subcontract Report 2000–2002, University of Idaho, Moscow, Idaho. 1–199 pp.
- CALONGE, P.; VESPASIANO, C. 2014. Alternativas al Bromuro de Metilo (BrMe) para la desinfección de suelos y sustratos. Dirección Nacional de Programas de Desarrollo Regional, Argentina. 6 pp.
- CAMPAS-BAYPOLI, O.N.; BUENO-SOLANO, C.; MARTÍNEZ-IBARRA, D.M.; CAMACHO-GIL, F.; VILLA-LERMA, A.G.; RODRÍGUEZ-NÚÑEZ, J.R.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D.I. 2009. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, vol. 59, N° 1. 95-100 pp.
- CARBONELL, C.; CIFUENTES, D.; TELLO, J.; CENIS, J.L. 1994. Diferenciación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* y *F. o. f. sp. radidis-lycopersici* y su detección en planta mediante marcadores RAPD. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, vol.20, España. 919-926 pp.
- CARRASCO, J. 2003. Avances en la sustitución del bromuro de metilo para la desinfección de suelos en la agricultura chilena: Resultados del proyecto demostrativo de alternativas en los cultivos de tomate y pimiento. Serie Actas N° 25. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Chile. 126 pp.
- CARRASCO, J.; ALTAMIRANO, S.; DROGUET, L.; OLAVARRÍA, J.; PASTÉN, F. 2001. Alternativas al bromuro de metilo para la desinfección de suelos en tomate y pimiento. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, San Fernando, Chile. *Boletín INIA*, N° 88. 128 pp.
- CARRASCO, J.; RIQUELME, J. 2003. Biofumigación. Instituto de investigación agropecuaria (INIA). *Boletín INIA*, N°155, Capítulo 4. 41-47 pp.
- CARRILLO-FASIO, J.A.; MONTOYA-RODRÍGUEZ, T.J.; GARCÍA- ESTRADA, R.S.; CRUZ-ORTEGA, J.E.; MÁRQUEZ-ZEQUERA, I.; SAÑUDO-BARAJAS, A.J. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 2. 123-127 pp.
- CLARCKSON, J.; MICHEL, V.; NEILSON, R. 2014. Biofumigation for the control of soil-borne diseases. Focus Group, Soil Borne Diseases. 1-7 pp.
- CORVO, S. 2005. Zonas de producción del cultivo del tomate en la Argentina. Ediciones Secretaría Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Argentina. 15 pp.

- CRUZ-ALCALÁ, A.; MENDOZA-ZAMORA, C.; ROMERO-COVA, S. 2000. Identificación de hongos del suelo que causan pudriciones de raíz y cuello del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el sureste del estado de México, México. Revista Chapingo, Serie Horticultura, vol. 6, N°1. 25-32 pp.
- EL-MOHAMEDY, R.S.R., JABNOUN-KHIAREDDINE, H., DAAMI-REMADI, M. 2014. Control of root rot diseases of tomato plants caused by *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* using different chemical plant resistance inducers. Tunisian Journal of Plant Protection, vol. 9: 45-55 pp.
- FRANCO, D. 2009. Tomate industrializado. Alimentos Argentinos. Ediciones Secretería Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Argentina. 26-31 pp.
- GAMLIEL, A.; STAPLETON, J.J. 1993. Effect of chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms, and lettuce growth. Plant diseases, vol. 77. 886-891 pp.
- GONZÁLEZ, R.; MONTEALEGRE, J.; HERRERA, R. 2004. Biological control of *Fusarium solani* in tomato by the bioantagonist *Paenibacillus lentimorbus* and *Trichorema* spp. Ciencia e investigación agrarian, vol.31, N°1. 21-28 pp.
- HERNÁNDEZ, R.; LÓPEZ, A.; BORREGO, F.; ESPINOZA, J.; SÁNCHEZ, D.; MALDONADO, I.E.; LÓPEZ, L.A. 2014. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, vol. 5, N° 7. 1169-1178 pp.
- IDR, 2014. Estimación de la superficie hortícola invernada cultivada en Mendoza. Temporada 2013-2014.[[http://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2013/09/InformeHortInv2013\\_14.pdf](http://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2013/09/InformeHortInv2013_14.pdf)]
- INIA. 2013. Biosolarización. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ficha Técnica N°2, Chile. 2 pp.
- IRIARTE, L.E.; SOSA, M.C.; REYBET, G.E. 2011. Efecto de la biofumigación con repollo sobre el control de *Fusarium oxysporum* en suelo. RIA, vol. 37, N°3. 231-237 pp.
- JONES, J.B.; STALL, R.G.; ZILLER, T.A.; JONES, J.P. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. The American Phytopathological Society (APS), Edición Mundi-Prensa. 14-15 pp.
- JONES, J.P.; ZITTER, T.A.; MOMOL, T.M.; MILLER, S.A. 2015. Diseases of tomato (*Solanum lycopersicum* L.).[en línea] APS publications. [<http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Tomato.aspx>] [consulta: 24 julio 2015]
- KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L.V.; SHAPOSHNIKOV, A.I.; MAKAROVA, N.; LUGTENBERG, B. 2006. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. Molecular Plant-Microbe Interactions, vol.19, N°10. 1121-1126 pp.
- KIRKEGAARD, J. A.; GARDNER, J.; DESMARCHELIER, J. M.; ANGUS, J. F. 1993. Biofumigation using Brassica species to control pest and diseases in

Horticulture and Agriculture. En: N. WRATHER, N.; MAILES, J. (Ediciones, Proc. 9th Australian Research Assembly on Brassicas (Wagga Wagga). 77-82 pp.

- KUMAR, P. 2005. Biofumigation. Concept note & compilation of sesión guides on Biofumigation. Inter-country Programme for Vegetable IPM in South & SE Asia Phase II, FAO. 34 pp.
- KUTER, G.A.; HOITINK, H.A.J.; CHEN, W. 1988. Effects of municipal sludge compost curing time on suppression of *Pythium* and *Rhizoctonia* diseases of ornamental plants. Plant Disease, vol. 72. 751-756 pp.
- LAFI, J.G.; TARQUINI, A.M.; GABRIEL, E.L.; DÍAZ NODARO, L.H.; CAMARGO, A.B.; FUSARI, C.M. 2014. Evaluación de extractos de brasicáceas y de biofumigación in vitro sobre *Sclerotium cepivorum*. Libro de Resúmenes del 3<sup>o</sup> Congreso Argentino de Fitopatología / Leonardo Daniel Ploper (Ed.) - 1<sup>a</sup> ed. ISBN 978-987-24373-1-2, p. 378
- LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Ed. Blackwell Publishing Ltd. 5-17, 21-25, 81-85, 113-117, 250-255, 212-218 pp.
- LÓPEZ-ELÍAS, J.; GUERRERO-RUÍZ, J.C.; HUEZ-LÓPEZ, M.A.; JIMÉNEZ-LEÓN, J.; RUÍZ-MENDOZA, J.J. 2014. Biofumigación y solarización del suelo en la producción de sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai). European Scientific Journal, vol.10 N<sup>o</sup>3. 121-131 pp.
- LÓPEZ-PÉREZ, J.A.; ROUBTSOVA, T.; DE CARA GARCÍA, M.; PLOEG, A. 2010. The potential of five winter-grown crops to reduce root-knot nematode damage and increase yield of tomato. Journal of Nematology, vol.42, N<sup>o</sup>2. 120-127 pp.
- MARTINEZ, J.P.; ANTÚNEZ, A.; FUENTES, L.; SALINAS, L.; AYALA, A. 2015. Portainjertos en tomate para la tolerancia a salinidad y patógenos del suelo. INIA, Tierra Adentro, Chile. 31-36 pp.
- MICHEL, V.; AHMED, H.; DUTHEIL, A. 2007. La biofumigation, une méthode de lutte contre les maladies du sol. Revista suiza de Viticultura, Arboricultura y Horticultura, vol. 39, N<sup>o</sup> 2. 145-150 pp.
- MILLER, S.A.; ROWE, R.C.; RIEDEL, R.M. 1996. Fusarium and Verticillium wilts of tomato, potato, pepper and eggplant. Extension FactSheet, Ohio State University extension, EEUU. 3 pp.
- MITIDIERI, M.S.; BRAMBILLA, M.V.; PIRIS, M.; PIRIS, E.; MALDONADO, L. 2005. El uso de portainjertos resistentes en cultivo de tomate bajo cubierta: resultados sobre la sanidad y el rendimiento del cultivo. INTA, Centro Regional Buenos Aires, Argentina. 8 pp.
- MITIDIERI, M.; BRAMBILLA, V.; SALIVA, V.; PIRIS, E.; PIRIS, M.; CELIÉ, R.; PEREYRA, C.; DEL PARDO, K.; CHAVES, E.; GONZÁLEZ, J. 2009. Efecto de distintas secuencias de tratamientos de biofumigación sobre parámetros fisicoquímicos y biológicos del suelo, el rendimiento y la salinidad de cultivos de tomate y lechuga bajo cubierta. Horticultura Argentina vol.28. 5-17 pp.

- MORSY, E.M.; ABDEL-KAWI, K.A. 2009. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. Egypt Journal Phytopathology, vol. 37, Nº 1. 47-57 pp.
- NAKAYAMA, K.; WAKI, T.; AOKI, T.; MORISHIMA, M.; FUKUDA, T. 2010. Pathogenicity of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*, the causal pathogen of foot rot of tomato, on flowers, fruits and stems of tomato plants. Japón, Journal Phytopathology, vol.76: 135–141pp.
- PALMERO, D.; DE CARA, M.; IGLESIAS, C.; SANTOS, M.; DIEZMA, F.; LOMAS, T.; TELLO, J.C. 2008. Evaluación del poder patógeno de especies de *Fusarium* aisladas de aguas de cauces fluviales y fondos marinos de España sobre cuatro especies vegetales. Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas, vol.34. 399-414 pp.
- PERNIOLA, O.S.; STALTARI, S.; CHORZEMPA, S.E.; MOLINA, M.C. 2012. Biofumigación con Brassicáceas: actividad supresora sobre *Fusarium graminearum*. Revista Facultad de Ciencias Agrarias UNCUYO, vol.111, Nº 1. 48-53 pp.
- PERNIOLA, O.S.; STALTARI, S.; CHORZEMPA, S.E.; ASTIZ GASSÓ, M.M.; MOLINA, M.C. 2014. Control biológico de *Fusarium graminearum*: utilización de *Trichoderma* spp. y biofumigación con parte aérea de *Brassica juncea*. Revista Facultad de Ciencias Agrarias UNCUYO, vol.46, Nº 2. 45-56 pp.
- RAMIREZ-VILLAPUDUA, J.; MUNNECKE, D.E. 1988. Effect of solar heating and soil amendments of cruciferous residues on *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* and other organisms. Phytopathology, vol.78. 289-295 pp.
- RED PROVINCIAL DE PRECIOS PAGADOS AL PRODUCTOR, 2014. Tomate para industria y para consumo en fresco. Periodo 1998-2013. Informe de avance 2014. IDR, Argentina. 17 pp.
- REGALADO, R.; BRITO, E.; LÓPEZ-CEPERO, J.; BELLO, A. 2006. Efectos de la biofumigación con residuos de cultivo sobre un suelo de cultivo de tomate. En: VII Congreso SEAE, Zaragoza, Nº82.
- ROMBERG, M. K.; DAVIS, R. M. 2007. Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* from potato and tomato in California. Plant Dis, vol. 91. 585-592 pp.
- SEGURA, A.I. 2010. La biofumigación, método biológico de control de patógenos del suelo. Ficha Técnica PAE num. 11, 1-8 pp.  
  
[[http://www20.gencat.cat/docs/DAR/AL\\_Alimentacio/AL01\\_PAE/08\\_Publicacions\\_material\\_referencia/Fitxers\\_estatics/FichaPAE11\\_Biofumigacion.pdf](http://www20.gencat.cat/docs/DAR/AL_Alimentacio/AL01_PAE/08_Publicacions_material_referencia/Fitxers_estatics/FichaPAE11_Biofumigacion.pdf)]
- SHABAN, W.I.; EL-BAROUGY, E.; ZIAN, A.H. 2011. Control of lupine Fusarium wilt by biofumigation with mustard and canola seed meal. Tunisian Journal of Plant Protection, vol.6. 87-98 pp.
- Statgraphics Centurion. STATGRAPHICS®. Version XVI. 2012. StatPoint Technologies, Inc. www.STATGRAPHICS.com

- STREETS, R.B. 1992. Diagnóstico de enfermedades de las plantas. Manual de campo y laboratorio con énfasis en los métodos más prácticos para identificación rápida. Editorial Hemisferio Sur. 1º edición. 232 pp.
- SZCZECHURA, W.; STANIASZEK, M.; HABDAS, H. 2013. *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* the cause of fusarium crown and root rot in tomato cultivation. Journal of Plant Protection Research, vol. 53, N°2. 172-176 pp.
- TELLO, J.C.; LACASA, A. 1988 a. Evolución racial de poblaciones *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas, vol.14, España. 335-341 pp.
- TELLO, J.C.; LACASA, A. 1988 b. "La podredumbre del cuello y de las raíces", causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, nueva enfermedad en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) españoles. Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas, vol.14, España. 307-312 pp.
- TELLO, J.C.; LACASA, A. 1990. *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral Mediterráneo de España. Fases parasitaria (Fusariosis vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España. Boletín de Sanidad Vegetal, Fuera de Serie, N° 19. 191 pp.
- UC IPM. 2013. Tomato. Fusarium foot rot. En: UC IPM Pest Management Guidelines: Tomato. UC ANR Publication 3470, EEUU.
- UNEP. 1999. Methyl bromide alternatives for North African and Southern European countries. United Nations Environment Programme (UNEP). 244 pp.
- VILASECA, J.C.; FONT, M.I.; JORDÁ, C. 2006. Biofumigación y biosolarización en el control del ToMV: una buena alternativa al Bromuro de Metilo. Agroecología, N°1. 105-115 pp.
- VILLALOBOS, S.; GODOY, H.; MARÍN, J.L.; AGUILAR, E. 2013. Biosolarización. Resultados de investigación sobre el control de *Clavibacter*. Centro de Investigación Regional Centro Campo Experimental, Bajío, México. Ficha Técnica N° 23. 28 pp.
- ZHANG, S.; ROBERTS, P.D.; McGOVERN, R.J.; DATNOFF, L.E. 1995. Fusarium crown and root rot of tomato in Florida. Plant Pathology Department, UF/IFAS Extension. 3 pp.
- ZURERA, C.; ROMERO, E.; PORRAS, M.; BARRAU, C.; ROMERO, F. 2007. Efecto biofumigante de especies de *Brassica* en el crecimiento de *Phytophthora* spp. *in vitro*. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Actas de Horticultura N° 48. 306-309 pp.