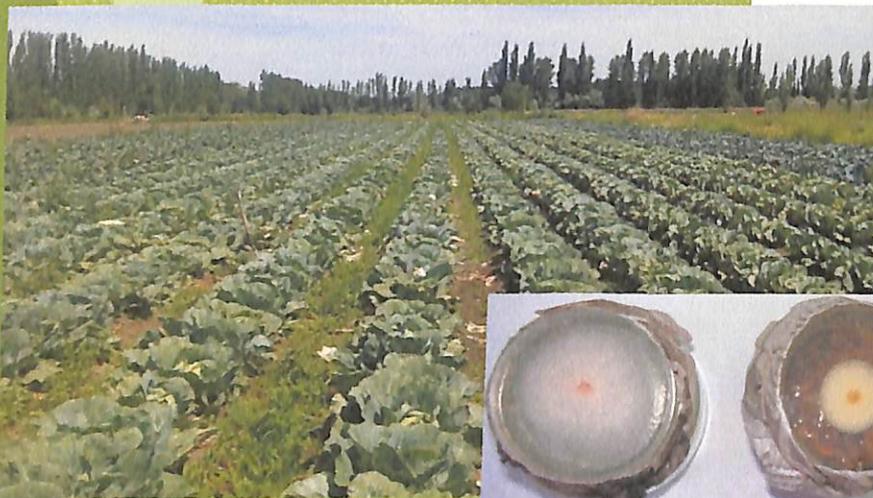




1972

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL AMBIENTE Y
LA SALUD
LICENCIATURA EN SANEAMIENTO Y
PROTECCIÓN AMBIENTAL



“Biofumigación con Brassica, una alternativa agroecológica para el control de Fusarium oxysporum en almácigos de cebolla”

Tesis de grado para obtener el título de Licenciado en Saneamiento y Protección Ambiental

ARIAS, JULIAN ANDRES

29/02/2016



Datos del Tesista:

Nombre: Arias, Julian Andrés

Legajo: 123310

Directora: M. Sc. Graciela Emilce Reybet

Codirectora: Dra. Agr. María Cecilia Lutz

Fecha Aprobación plan de Tesis: 11/2/2015

Fecha Finalización Tesis: 26/2/2016

RESUMEN

La Región Protegida Patagónica es la principal productora y exportadora de cebolla de Argentina. Los problemas sanitarios más importantes son las enfermedades fúngicas del suelo. *Fusarium oxysporum* es uno de los agentes causales del mal de los almácigos. Su control es un desafío ante las restricciones de uso del Bromuro de Metilo y la necesidad de encontrar alternativas efectivas y amigables con el medio ambiente. La biofumigación surge como una técnica ecológica. En este trabajo se evaluó *in vitro* el potencial biofumigante de los residuos repollo, coliflor y brócoli cultivadas en la región frente a dos cepas nativas de *F. oxysporum* (F10 y F4). El repollo mostró la mayor inhibición del crecimiento micelial del patógeno: 44% y 64% para F10 y F4 respectivamente. *In vivo* en macetas inoculadas se evaluó el efecto de residuos de repollo con tres dosis: 0, 3 y 6 Kg/m², dos estados de humedad (fresco y seco) y dos condiciones del suelo (estéril, no estéril). Se determinó la emergencia, sobrevivencia y calidad de los plantines de cebolla a los 75 días desde la siembra. La dosis de 3Kg/m² en suelo estéril registró los mayores porcentajes de sobrevivencia (hasta 60% y 37% para F10 y F4, respectivamente). En suelo no estéril no se observaron diferencias entre las dosis. La emergencia y la sobrevivencia fue afectada negativamente con la dosis de 6 Kg/m². Los plantines que crecieron en suelo no estéril, resultaron con mejores parámetros de calidad.

ABSTRACT

The Patagonian Protected Region is the main onion producer and exporter. Soil Fungic diseases represent the most important sanitary problem. *Fusarium oxysporum* is a pathogen responsible of *damping off*. Its control is a challenge in the face of Methyl Bromide use restriction and the need to find effective and eco-friendly alternatives. Biofumigation arise as an ecological technique. In this work, *in vitro* biofumigation potential of crop residues from cabbage, cauliflower and broccoli against two native races of *F. oxysporum*: F10 and F4 were assessed. Cabbage registered the highest micelial growth inhibition (43.6% and 64% for F10 and F4, respectively). Effect of biofumigation with three doses of cabbage residues (0 Kg/m², 3 Kg/m² y 6 Kg/m²), two cabbage conditions (fresh and dehydrated) and two soil conditions (sterile and non sterile) was assessed *in vivo* on pots. Biofumigation effectiveness was determined by seedling's emergency, survival and quality after 75 days after sowing. In sterile soil, 3 Kg/m² dose showed the highest seedling survival (up to 60% and 37% for F10 and F4, respectively). In non sterile soil no differences were observed. 6 Kg/m² caused deleterious effects on emergency and survival. Seedlings in non sterile soil showed better quality parameters.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

μL: Microlitro

μm: Micrómetro

ACP: Análisis de Componentes Principales

APD: Agar Papa Dextrosa

BIOF: Biofumigación

BM: Bromuro de Metilo

g: Gramos

GLS: Glucosinolatos

GLZ: Modelos Lineales Generalizados

h: Horas

ha: hectárea

HR: Humedad Relativa

ITC: Isotiocianatos

MB: Methyl Bromide

mL: Mililitro

tn: toneladas

PCNB: Pentacloronitrobenceno

ppm: Partes por millón

AGRADECIMIENTOS

Páginas y páginas podrían ser escritas con mis más profundos y sinceros agradecimientos a todos aquellos de quienes aprendí y me acompañaron.

A mis directoras Graciela y Cecilia que con gran dedicación me guiaron a través del camino del arduo pero satisfactorio camino de la investigación.

A Guillermo Sabino quien me acercó a la investigación y brindó, en incontables oportunidades, asesoría estadística.

A toda mi familia y en especial a mis padres que con su esfuerzo fueron (y son) mi soporte vital, apoyándome en todo momento haciendo posible mis logros.

A mi grupo de estudio durante mi carrera: Laura, Sebastián, Marion, Mariela y Silvina sin dudas no estaría donde estoy sin su fiel compañía.

A Juliana, que con paciencia y tolerancia me brindó apoyo y compañía durante todo el proceso que a continuación se resume.

A todos Muchas Gracias.

Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	3
Índice de abreviaturas.....	4
Agradecimientos	5
Introducción General.....	8
Delimitación del problema a abordar	9
Marco teórico.....	10
Mal de los almácigos y podredumbre basal.....	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	11
Métodos de control de <i>F. oxysporum</i>	11
Biofumigación	13
Hipótesis de trabajo	19
Objetivos Generales.....	21
Capítulo 1.....	23
1.1. Introducción	24
1.2 Materiales	25
1.3. Métodos.....	26
Diseño experimental	26
Biofumigación <i>in vitro</i>	27
Análisis estadístico	28
1.4. Resultados.....	28
Efecto de la biofumigación sobre el crecimiento de F10.....	28
Efecto de la biofumigación sobre el crecimiento de F4.....	29
1.5 Discusión	30
1.6. Conclusiones	32
Capítulo 2.....	33
2.1 Introducción	34
2.2. Materiales	35
2.3. Métodos	37
Diseño experimental	37
Desarrollo del experimento	38

Análisis estadístico	39
2.4. Resultados	39
Análisis de Componentes Principales (ACP)	39
Efecto de la biofumigación en la emergencia de plántulas	41
Efecto de la biofumigación en la sobrevida de plantines de cebolla	43
Efecto de la biofumigación sobre la calidad del plantín	44
2.5. Discusión	51
2.6. Conclusiones	52
Consideraciones finales	54
Bibliografía	56
Anexos	62
Anexo A.....	63
Modelo estadístico para el crecimiento miceliar	63
Anexo B.....	65
Temperaturas del suelo registradas durante el ensayo <i>in vivo</i>	65
Anexo C.....	65
Resultados resumidos del análisis del suelo utilizado en el ensayo. Se extrajeron dos muestras.	65
Anexo D.....	66
Modelo estadístico emergencia a los 14 días	66
Modelo estadístico sobrevida relativa a los 75 días.....	67
Modelos lineales generalizados estadísticamente significativos.....	69

INTRODUCCIÓN GENERAL

DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA A ABORDAR

En Argentina, la producción de cebolla ocupa el tercer lugar en importancia, luego del poroto y la papa. Se estima que la superficie total cultivada en el país es de 15.000 a 20.000 hectáreas (ha), lo que representa una producción de 450.000 toneladas (Van Konijnenburg, 2009). La superficie destinada al cultivo incluye cebollas destinadas al consumo en fresco y a la industria (Curcio, 2007). La producción comercial se concentra en tres regiones principales, las cuales se encuentran bien definidas. La región Norte del país que comprende a Santiago del Estero, con unas 3.000 ha de cebolla de día corto, y cuyo destino es el mercado nacional. Las provincias de Mendoza y San Juan, que constituyen la región Oeste, con un total de aproximadamente 7.000 ha de cebolla de día corto e intermedio-largo (Kiehr & Delhey, 2007). Finalmente, la región Sur, que constituye la principal zona productora y exportadora (FunBaPa, 2014), y comprende los valles irrigados del sur de la provincia de Buenos Aires y norte de la Patagonia, así como parte de la zona pampeana. El área sembrada oscila alrededor de las 12.000 a 15.000 ha con fluctuaciones marcadas de un año a otro. El cultivar "Valcatorce INTA", del tipo Valenciana, domina ampliamente la producción. Su destino es tanto el mercado interno como el externo, con Brasil y la Comunidad Europea como principales mercados compradores (Kiehr & Delhey, 2007). En esta zona el volumen exportado en 2013 llegó a 217.519 tn (FunBaPa, 2014).

En la producción de cebolla, las patologías más importantes son el mal de los almácigos y la podredumbre basal del bulbo, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (Hans.) Snyder y Hansen. Éste, es un patógeno de difícil control y está ampliamente difundido en las zonas de producción de cebolla. Afecta la producción, la calidad de los bulbos y su conservación (Kiehr & Delhey, 2007). A nivel mundial y en la Argentina, se utilizó/a el bromuro de metilo (BM) como desinfectante del suelo de amplio espectro para el control de patógenos, sin embargo, su efecto negativo sobre la capa de ozono obligó la limitación paulatina de su uso. En este sentido, en la actualidad, el único fungicida registrado y permitido para cebolla, es el carbendazim (SENASA, 2003, 2005), fungicida que presenta alto riesgo de generación de resistencia sobre los patógenos (FRAC, 2013). A esta situación, se le añade que en la actualidad no existen cultivares de cebolla resistentes a este patógeno.

En este contexto, el manejo del cultivo de cebolla requiere estrategias de control de patógenos que sean sustentables para el agroecosistema, acordes al sistema de producción y a los requerimientos de inocuidad alimentaria que exigen los mercados compradores.

La biofumigación (BIOF) es una enmienda orgánica, que resulta una alternativa a los pesticidas de origen sintéticos. La principal ventaja es a nivel ambiental, ya que revaloriza los residuos generados en la agricultura, y la reducción de los costos productivos, por reducir la utilización de los pesticidas.

MARCO TEÓRICO

Mal de los almácigos y podredumbre basal

La calidad de los plantines de cebolla o bulbos cosechados pueden verse afectados por la presencia de diferentes patógenos del suelo. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* (Hans.) Snyder y Hansen, agente causal del mal de los almácigos y de la podredumbre basal o de disco, es uno de los más importantes de éste cultivo (Iriarte, Sosa & Reybet, 2011). El patógeno produce enfermedad de raíz y de bulbo y se puede manifestar durante el ciclo vegetativo y el almacenaje. En el primer caso, las plántulas afectadas presentan hojas que se van muriendo a partir de la punta. En general, cuando no se efectúan rotaciones y se hace un mal manejo del riego la enfermedad se puede manifestar durante el cultivo. El patógeno puede causar la pérdida de raíces. (Galmarini, 1997). Cuando el ataque es temprano, puede causar la pérdida de plantines en almácigos, donde raramente las plantas puedan llegar a la cosecha (Figura 1) (Valdez, Makuch, Marini, 2004). Cuando la enfermedad se manifiesta durante la conservación, la podredumbre se observa a partir del disco (Figura 2). El micelio avanza invadiendo las catáfilas carnosas produciendo una podredumbre húmeda de color pardusco que avanza de abajo hacia arriba. En los tejidos afectados se observa micelio color blanco del hongo (Galmarini, 1997). Las infecciones en post-cosecha se ven favorecidas por las temperaturas frescas del ambiente de la conservación (28 a 30°C, ventilación de 0,5 a 1 m³/h y humedad relativa 65 a 70%), donde el desarrollo del inoculo acarreado desde el campo se activa (Valdez *et al*, 2004). Cuando el período de conservación es prolongado, la atmósfera interna del bulbo sufre variaciones debido a la respiración y transpiración, y se produce un lento, gradual y sostenido incremento del patógeno, en el tiempo (Pellejo, Pozzo Ardizzi, Ashkar & Lui, 2004)



Figura 1 - Síntomas de *Fusarium* spp. a campo.



Figura 2 - Síntoma de podredumbre basal en el bulbo de cebolla.

Fusarium oxysporum

Fusarium oxysporum es un hongo aerobio de suelo que se presenta como patógeno especializado según la planta hospedante que afecte, dando origen a lo que se denomina *forma especial* (f. sp.), por ejemplo *F. oxysporum* f. sp. *cepae* que afecta a la cebolla. Éste produce colonias de rápido crecimiento en agar papa dextrosa (APD) a 25°C, con una tasa diaria cercana a un centímetro. Este hongo produce micro y macroconidios y se caracteriza por la formación de clamidosporas como estructuras de supervivencia. Las vías de diseminación del patógeno ocurren a través de tejidos infectados o por suelo contaminado, y en menor medida el agua y el aire. La temperatura es uno de los factores ambientales más influyentes sobre este patógeno, siendo la óptima para el desarrollo entre 25 y 30°C. La esporulación ocurre entre 20° y 25°C con 12 h de luz y 12 h de oscuridad. El pH óptimo es de 7,7 y puede desarrollarse entre 2,2 y 9,0 (Garcés de Granada, Orozco de Amezquita, Bautista, & Valencia, 2001).

Métodos de control de *F. oxysporum*

Para el control de las enfermedades ocasionadas por patógenos de suelo, en general, se emplean métodos basados en productos de síntesis química, los que han prevalecido tanto a nivel mundial como en la Argentina (Iriarte *et al*, 2011). El bromuro de metilo (BM) fue masivamente utilizado para la desinfección de suelos. Este producto es un biocida de amplio espectro que se caracteriza por su alta efectividad en cuanto a penetración y difusión en la matriz del suelo. Sin embargo, no es retenido en su totalidad, y entre 50-95% pasa en forma de emisiones gaseosas a la estratosfera, donde se liberan átomos de bromo que reaccionan con el ozono, dando lugar a una reacción en cadena que contribuye a la disminución de la capa de ozono. Este fenómeno incrementa la penetración de rayos ultravioletas con los consecuentes riesgos para la salud y el ambiente. Por esa razón es que a partir de principios de la década del '90 se dio lugar a la toma de decisiones que contribuyesen a la eliminación de este producto, apoyándose en acciones reguladoras del tipo gubernamentales (Bello, López-Pérez & Díaz Viruliche, 1997; Bello, López-Pérez & García Álvarez, 2003).

La décima Reunión del Protocolo de Montreal estableció para los países desarrollados un programa en el que se acordó la reducción de forma gradual de los usos agrícolas del BM hasta llegar a su eliminación total para el año 2005 para países desarrollados y para países emergentes el año 2015. En países como Argentina, Brasil, China, Cuba, Guatemala, Marruecos y Uruguay se están desarrollando proyectos de investigación demostrativos para su eliminación total (Bello *et al*, 1997). En Argentina según la resolución 77/2006 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos se prohíbe su uso en fumigación de suelos y sustratos de formulaciones que contengan más del 70% de la sustancia activa BM, Metilbromuro o Bromo Metano (Resolución N°77, 2006).

Arias, Julian Andrés

Idealmente, la alternativa que se proponga a la sustitución de este compuesto debe tener una eficacia similar, no impactar sobre el ambiente, ser económica y socialmente viable (Bello *et al*, 1997). Existen dos tipos de alternativas al BM:

- *Sustancias químicas de síntesis*: Metam sodio, Dazomet y cloropicrina, los cuales plantean serias dudas acerca de su eficacia y su posible toxicidad, acarreando más problemas que los que se quieren solucionar (CASAFE, 2013).
- *Sustancias químicas de origen orgánico y estrategias de manejo alternativo*: se basan en los tratamientos de suelos sin el uso de pesticidas para eliminar malezas y plagas, o aquellos métodos de cultivo de plantas en sustrato sin suelo. Los ejemplos más citados de estas últimas son el uso de enmiendas orgánicas, la rotación de cultivos, las técnicas de control biológico (hongos y bacterias antagonistas), la solarización, tratamiento con vapor (Vilaseca, Font & Jordá, 2006), la obtención de plantas resistentes a plagas y enfermedades (Bello, López-Pérez, Díez-Rojó, López-Cepero & García-Álvarez, 2008), entre los principales.

Alternativas al BM en el marco de la agroecología

La *agroecología* (como ecología de los sistemas agrarios) nace en respuesta a la denuncia de los efectos adversos no contemplados consecuentes de la aplicación de las tecnologías reduccionistas provistas por "revolución verde", hasta mediados del siglo XX (con los pesticidas sintéticos como única herramienta en el manejo de las plagas) (Romero, 2004). Este paradigma tiene como objetivo principal el conocimiento de elementos y procesos claves que regulen el funcionamiento de los agroecosistemas, con el fin de establecer las bases científicas para una gestión eficaz de los sistemas agrarios, en armonía con el ambiente. Dicho conocimiento se proyecta hacia la preocupación por la salud de los ciudadanos, así como del bienestar social y económico de los agricultores, contribuyendo a la vez a propiciar un desarrollo solidario (Bello, *et al*, 2008).

La implementación de este paradigma implica estudiar el sistema agrario bajo los conceptos y criterios de la ecología, por ejemplo en su estructura (incluyendo las relaciones entre los subsistemas aéreo y terrestres) y su capacidad de autorregulación. En la gestión del agrosistema ya caracterizado se prioriza la diversidad, aprovechando los aspectos funcionales de las plantas (por ejemplo, las legumbres como fijadoras de nitrógeno en el suelo), la reducción del riesgo económico que brinda la diversificación del sistema productivo. Es primordial la selección del cultivo adaptado a una región geográfica y no un sistema globalizado que solo se puede mantener con altos costes energéticos (Bello *et al*, 2008).

Arias, Julian Andrés

Las alternativas al BM, del tipo orgánicas constituyen una herramienta multipropósito bajo este paradigma, que, además de ofrecer una reducción de las plagas sin contaminar la atmósfera, cumplen con el reto de revalorizar los residuos que genera la actividad productiva (por ejemplo las enmiendas orgánicas) y, la reducción del consumo energético.

Bajo este paradigma y en el contexto normativo, la biofumigación constituye una herramienta promisorio para el manejo sanitario de patógenos de suelo, cuya potencialidad ya ha sido demostrada en varios sistemas agrícolas (Gimsing & Kirkegaard, 2009).

Biofumigación

El término “biofumigación” fue definido por Kirkegaard, Angus, Gardner, y Cresswell (1993), y fue descrito por primera vez en una revista de impacto internacional en el año 1994. Kirkegaard y Sarwar (1998) definen la biofumigación como: “la supresión de pestes y patógenos del suelo mediante la rotación de cultivos de *Brassica* o verdes”.

El principio de la biofumigación, es la descomposición biológica de la materia orgánica (residuos agrícolas y guanos), que libera compuestos volátiles que propician el control de los patógenos en el suelo. Se ha comprobado que cualquier materia orgánica sirve como biofumigante (Vilaseca *et al*, 2006). Esta alternativa presenta beneficios para controlar diversos patógenos del suelo y a la vez, la de mejorar sus propiedades físico-químicas, haciéndolo así más favorable para el desarrollo de los cultivos.

Los compuestos volátiles liberados en la biofumigación con material vegetal de Brasicáceas corresponden a la familia de isotiocianatos (ITC). Estos se originan a la partir de la hidrólisis de una variedad de compuestos precursores denominados glucosinolatos (GLS), reacción catalizada por la enzima mirosinasa. Ambos precursores se encuentran presentes en los tejidos de las plantas de la familia *Brassicaceae*.

La biofumigación se puede lograr incorporando el tejido seco o fresco de la planta, como también la harina de sus semillas. En este sentido, se ha demostrado que la rotación de cultivo con Brassicas puede ser considerada como biofumigación, ya que los ITC son exudados de las raíces intactas de las plantas (Lu, Gilardi, Gullino & Garibaldi, 2010).

Cuando se incorpora material vegetal que contiene GLS existe un efecto sobre el microorganismo patógeno que se pretende controlar ocasionado por la hidrólisis de los mismos. También tiene un efecto supresor no atribuible a los ITC, sino al aumento de la población de microorganismos antagonistas promovida por la adición de materia orgánica o por la liberación de compuestos químicos tóxicos cuyo origen no es de GLS (Gimsing & Kirkegaard, 2009).

Glucosinolatos, mirosinasa e Isotiocianatos

Los glucosinolatos (GLS) son aniones orgánicos solubles en agua, encontrados en las plantas de dicotiledóneas y especialmente abundantes en el orden Brassicales (Brown & Morra, 1997). Estos compuestos son derivados biosintéticos de aminoácidos (Bellostas, Sorensen & Sorensen, 2004) y no tienen un rol fisiológico primario, pero sí como metabolitos secundarios: almacenan azufre (mayormente en semillas) y forman parte del sistema de defensa pasivo y activo de la planta (Zukalová *et al*, 2002).

La estructura química de estos compuestos corresponde a ésteres β -tioglucósidos N-hidroxisulfato. La característica común es el grupo funcional β -D-tioglucosa, un sulfato unido por un enlace C=N y un grupo lateral (-R) (Figura 3) cuya variación los clasifica en GLS alifáticos, aromáticos e indólicos y al mismo le confiere sus propiedades químicas, actividad biológica y productos de degradación (Cortés Arias, 2011). Existen al menos 120 variedades de GLS (Fan *et al*, 2008).

Generalmente en las plantas, cada genotipo contiene un GLS predominante, aunque su contenido varía con el tipo de tejido (raíces, hojas, flores, frutos, etc.) y el estado fenológico del mismo (Wentzell y Kliebenstein, 2008). En menor medida, afectan a la concentración de GLS la distancia entre plantas, el régimen de humedad, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura durante el ciclo de cultivo (Cortés Arias, 2011).

Los GLS por sí solos, no poseen toxicidad, sino los productos bioactivos de su degradación enzimática. Cuando los tejidos de la planta son fragmentados por daño mecánico, infección o ataque de plagas, los GLS almacenados en las vacuolas se exponen a la enzima mirosinasa que cataliza la hidrólisis. En esta reacción se forma un compuesto intermediario que se reorganizará (dependiendo del pH, el medio de reacción, la presencia de iones férricos) dando lugar a isotiocianatos (ITC), tiocianatos, nitrilos o epitionitrilos y glucosa (Szczyglowska, Piekarska, Konieczka & Namiesnik, 2011) (Figura 3). Estos compuestos son responsables del sabor y olor particular de las especies de *Brassica*.

En 1937 se describieron los efectos inhibitorios del crecimiento en hongos de los ITC puros y desde ese momento se ha demostrado que los mismos son biocidas generales y que son altamente tóxicos para algunos hongos (Smolinska, Morra & James, 2003), nematodos, bacterias, insectos y hasta malezas (Fan *et al*, 2008). La bioactividad de los ITC es comparable con la eficacia de algunos pesticidas sintéticos como el BM y algunos antibióticos (gentamicina) (Szczyglowska *et al*, 2011), con la ventaja que no generan resistencia en los organismos (Ortega-Centeno *et al*, 2010). Un ejemplo lo constituye el metil-isotiocianato es el ingrediente activo de fumigante de suelo comerciales como metamsodio y dazomet (Lu *et al*, 2010).

Arias, Julian Andrés

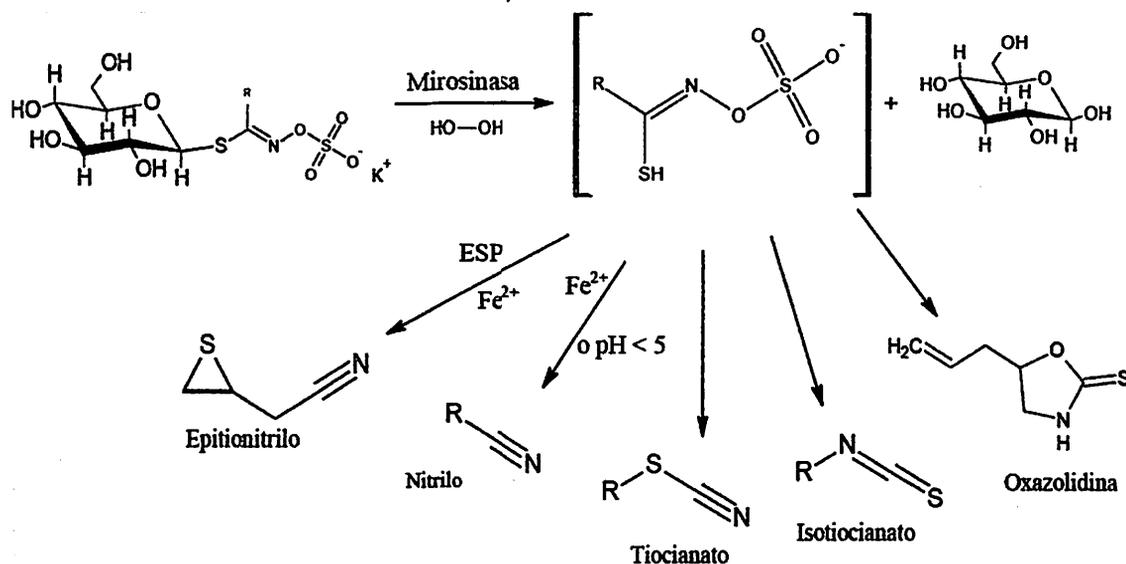


Figura 3- Hidrólisis de los GLS y posibles productos (Cortés Arias, 2011).

La toxicidad de los ITC es atribuida a una reacción no específica e irreversible con los grupos sulfurosos de las proteínas. Sin embargo, no todos poseen la misma toxicidad, dado que es la estructura química de su cadena lateral la que determina sus propiedades fisicoquímicas, como la hidrofobicidad y la volatilidad (Gimsing & Kirkegaard, 2009). En el caso de los hongos, la diferencia en la sensibilidad no solo está relacionada con la citotoxicidad sino también con la habilidad de los ITC para penetrar las células (Cortés Arias, 2011).

Además de la importancia como biocida, los ITC son investigados en el campo de la medicina dado que se ha demostrado que poseen propiedades antimutagénicas y antioxidativas (anticancerígeno) (Kaur, Rampal & Pal Vig, 2011).

Factores que afectan a la biofumigación

La biofumigación puede ser afectada por distintos factores, entre los cuales se encuentran los que a continuación se detallan.

Patógeno que se pretende controlar

Los efectos de los ITC no son siempre los mismos para todos los organismos. La inhibición del crecimiento fúngico depende principalmente de la sensibilidad de estos a los ITC (Fan *et al*, 2008). Esta sensibilidad diferencial, está determinada por el género del patógeno, y a veces según la cepa e incluso, la etapa del ciclo biológico en que se encuentre. (Gimsing & Kirkegaard, 2009). Al respecto, Smolinska *et al*, (2003) reportaron que la exposición de *F. oxysporum* a propenil-ITC no inhibió la producción de conidios y clamidosporas, pero si

Arias, Julian Andrés

evitó la germinación de las mismas; asimismo, los autores indican que la forma de mayor resistencia a la biofumigación es en su etapa micelial.

Otro de los aspectos a tener en cuenta donde se aplicará biofumigación, es el nivel de infestación o población del patógeno. Los resultados de Iriarte *et al* (2011), indican que luego de la biofumigación con repollo, la población de *F. oxysporum* se redujo significativamente respecto al testigo, cuando la concentración de inóculo no fue mayor de $3,3 \times 10^2$ conidios/g suelo.

Enmienda orgánica seleccionada para llevar a cabo la biofumigación

El objetivo principal de la biofumigación es maximizar la hidrólisis de los GLS y por ende aumentar la concentración de ITC para la supresión de los patógenos del suelo. Es por ello que se debe seleccionar como material biofumigante a aquellas plantas con alto contenido de GLS (Gimsing & Kirkegaard, 2009).

Las plantas del género *Brassica* se caracterizan por su alto contenido en GLS (Lu *et al*, 2010), sin embargo, la concentración y tipo varía según la especie, el tejido y la etapa fenológica en la cual se encuentre.

Además el material biofumigante a seleccionar se encuentra determinado por el patógeno a controlar. Lu *et al*, (2010) recomiendan evitar el uso de material biofumigante la misma especie de *Brassica* que sea hospedante del patógeno que se quiera controlar. En sus ensayos, cultivaron especies de *Brassicas* susceptibles y resistentes a los patógenos *F. oxysporum f. sp. raphani* y *F. oxysporum. f. sp. conglutinans* para luego incorporarlas en el suelo. Cuando se realizó la biofumigación con las especies susceptibles, la población registró un incremento, mientras que con la incorporación en el suelo del material resistente si se observó un efecto de inhibición sobre los hongos patógenos.

Forma de incorporación del residuo

El método para poner en contacto los GLS con la enzima mirosinasa es esencial para la que se lleve a cabo la biofumigación. Gimsing & Kirkegaard (2009) sugieren que para mejorar la hidrólisis de los GLS se deben utilizar técnicas de incorporación que logren la mayor disrupción posible del tejido vegetal, dado que la acción de la mirosinasa se incrementa si se alcanza la disrupción a nivel celular (Brown & Morra, 1997). Hasta el momento, la técnica *in vitro* descrita por Morra y Kirkegaard (2002), que demuestra ser de alta eficiencia en la hidrólisis de los GLS, es la del congelamiento tisular seguido del descongelamiento (al momento de incorporar del material). Cuando se aumenta la escala de aplicación a campo, las técnicas de alta eficiencia de hidrólisis pueden encarecer la biofumigación. En invernaderos o almácigos, el biofumigante puede ser picado a cuchillo e incorporado, mientras que a campo la incorporación se puede ser a través del arado con discos. Lazzeri, Leoni y Manici (2004), propusieron la deshidratación y “pelletización” del material biofumigante, para facilitar la aplicación en sistemas agrícolas intensivos.

Condición edáfica

La hidrólisis de los GLS a ITC depende de las condiciones en las cuales se produzca la reacción. En el suelo se ha demostrado que el nivel de maceración del material vegetal, así como el contenido de humedad y la temperatura (Gimsing & Kirkegaard, 2009), el pH (Stoin *et al*, 2009) y contenido de materia orgánica (Brown & Morra, 1997), resultan condicionantes de la hidrólisis. Los reportes indican que la condición ideal para la biofumigación es tener el suelo a capacidad de campo (CC) y con pH entre 6 y 7. En lo que respecta a la temperatura, al tratarse de un proceso enzimático, lo ideal son las temperaturas en el rango de 20°C y 40°C, con una óptima de 37°C (Iriarte *et al*, 2011). La adsorción de los ITC en la matriz del suelo, se incrementa con el contenido de materia orgánica. La textura es otro de los factores que se debe tener en cuenta, ya que los compuestos liberados pueden adsorberse en las partículas de arcilla (Brown & Morra, 2005).

Destino de los glucosinolatos e isotiocianatos en el suelo

De acuerdo a Gimsing y Kirkegaard (2009), los GLS ingresan al suelo cuando el material vegetal es incorporado. Los mismos pueden ser hidrolizados a ITC (camino 1 en Figura 4), sin embargo, pueden quizás ser degradados y mineralizados sin formar ITC (camino 2 y 4). Tanto los GLS como los ITC pueden infiltrarse en las capas inferiores del suelo (caminos 5 y 6), aunque esto es más probable con los primeros debido a que son pobremente adsorbidos por las partículas del suelo y alta solubilidad en agua. Los ITC reaccionan con los grupos nucleofílicos y producen su efecto tóxico cuando reaccionan con las proteínas de los microorganismos (camino 7). A su vez, se puede producir una fuerte adsorción con la materia orgánica del suelo que reduce la infiltración y su bio-disponibilidad (camino 8). Ciertos microorganismos pueden degradar los ITC para luego ser mineralizados (camino 9). Otro posible destino, es la fase aérea, dado que la volatilización es una de las rutas de desaparición del suelo (camino 10) (Brown & Morra, 2005).

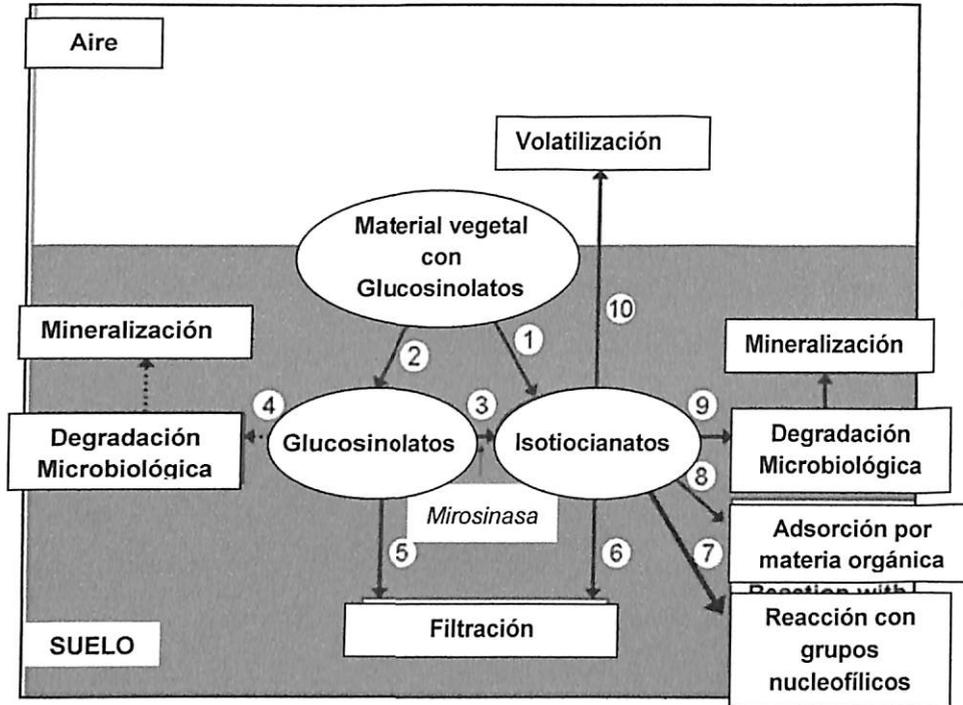


Figura 4 - Destino de los GLS y sus productos de hidrólisis en el suelo. Adaptado de (Gimsing y Kirkegaard, 2009).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La utilización de residuos de cosecha de *Brassica* como biofumigantes inhibe el desarrollo de *Fusarium oxysporum*, limitando la mortandad de plántulas en almácigos de cebolla. La biofumigación mejora el rendimiento cuantitativo y cualitativo de plantines.

OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos del siguiente trabajo fueron

- Evaluar el potencial biofumigante de residuos *Brassica oleracea* var *italica* (brócoli), *Brassica oleracea* var *capitata* (repollo), *Brassica oleracea* var *botrytis* (coliflor) sobre *Fusarium oxysporum* en condiciones *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la biofumigación sobre el rendimiento cuantitativo cualitativo de los plantines de cebolla en almácigos.

CAPÍTULO 1

**“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFUMIGANTE DE REPOLLO (*B. OLERACEA*
VAR. CAPITATA), BRÓCOLI (*B. OLERACEA VAR. ITALICA*) Y COLIFLOR (*B.*
OLERACEA VAR. BOTRYTIS) SOBRE EL CRECIMIENTO DE *FUSARIUM*
OXYSPORUM IN VITRO”**

1.1. INTRODUCCIÓN

Algunas especies de plantas producen compuestos alelopáticos que afectan directa o indirectamente el ambiente biológico en el que se encuentran. Estudios exploratorios de cientos de especies de la familia *Brassicaceae*, indican que todas podrían ser capaces de producir glucosinolatos (GLS). Esta familia de compuestos, influyen directa o indirectamente en el crecimiento, la salud o el comportamiento de otros organismos (Brown & Morra, 2005). Uno de los principales motivos de investigación es el potencial uso de estos compuestos como alternativa a los pesticidas sintéticos. El efecto biocida general sobre diversos microorganismos inducido por los isotiocianatos (ITC) en estado puro ha sido reportado desde principios del siglo XX y en el transcurso del mismo, varios científicos han demostrado el potencial supresivo, especialmente sobre los propágulos de hongos expuestos a los productos de la descomposición de los tejidos de Brassicas *in vitro* y en suelos estériles (Lu *et al*, 2010).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que los hongos son más susceptibles a los ITC que las bacterias (Omirou *et al*, 2011). Kirkegaard *et al*, (1996) reportaron que *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* y *Rhizoctonia solani* fueron las especies de hongos más sensibles a los ITC volátiles producidos por los tejidos de *Brassica napus* y *B. juncea* liofilizados, mientras que *Pythium irregulare* y *Bipolaris sorokiniana* fueron los menos sensibles y *Fusarium graminearum* presentó sensibilidad media.

Smolinska, Morra y James (2003) evaluaron *in vitro* la toxicidad individual de cinco especies ITC puros frente a cuatro aislamientos de *Fusarium oxysporum* en distintas etapas de crecimiento. Se aplicaron 0,3μL de cada ITC y se dejó volatilizar en contenedores herméticos donde se expuso el hongo. Todos los ITC exhibieron capacidad fungistática, la misma concentración que inhibió el crecimiento micelial, suprimió la germinación de las clamidosporas de todos los aislamientos. Estos resultados demostraron que se podría reducir la población de *F. oxysporum* con la incorporación de tejidos de brassicas al suelo.

Mattner *et al* (2008), evaluaron el potencial de biofumigación de una mezcla comercial de las especies *B. napus* y *B. rapa* que fueron sembradas, cultivadas y cosechadas. En bioensayos separados, los volátiles de los tejidos suprimieron el crecimiento micelial de seis patógenos (*Alternaria alternata*, *Colletotrichum dematium*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cactorum* y *Rhizoctonia fragariae*) y de siete especies de malezas (*Trifolium spp.*) que afectan al cultivo de la frutilla.

Troncoso-Rojas *et al* (2008), llevaron a cabo un ensayo *in vitro* con el objetivo de evaluar el efecto de los volátiles producidos por el repollo y el brócoli frente a varios patógenos de origen fúngico, entre los que se encontraba *F. oxysporum*. Producto de la descomposición de los tejidos vegetales se determinó la presencia de alil-isotiocianato y benzil-isotiocianato, compuestos

volátiles a los cuales se les atribuyó el 100% de inhibición del crecimiento de los patógenos.

Riches *et al* (2011), valoraron el potencial antifúngico de los tallos y raíces liofilizados de 10 especies de brassicas biofumigantes comerciales para el control de 4 patógenos del suelo (*Sclerotinia minor*, *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum* y *Pythium dissotocum*). Se expusieron los patógenos al producto de la hidrólisis *in vitro*. La viabilidad del micelio de los patógenos se vio reducida hasta un 100% dependiendo de las especies, dosis y, tipo y porción del biofumigante utilizado. Los resultados mostraron que el mayor potencial de inhibición fue con la utilización del tallo el cual presentaba 7 veces más concentración de sinigrina (GLS) que la raíz. Se demostró además, una relación dosis - respuesta proporcional: a mayor dosis, mayor inhibición.

Wilson *et al* (2013), obtuvieron promisorios resultados al exponer diez tipos de ITC en estado puro frente a bacterias patógenas y responsables de la degradación de los alimentos (*Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Salmonella*, *Serratia* y *Staphylococcus*). Todas las bacterias demostraron sensibilidad ante los ITC, las Gram negativas fueron más sensibles que las Gram positivas. Asimismo, dentro de cada grupo (Gram + o Gram -) se encontraron diferencias en la sensibilidad dependiendo el tipo de especie y de la estructura química del ITC.

Los antecedentes describen el potencial de la biofumigación con ITC puros o en tejidos de brassicas frente al crecimiento de diversas bacterias y hongos patógenos entre los cuales se encuentra *Fusarium oxysporum*. El cultivo comercial de especies de la familia *Brassicaceae* en la zona del Alto Valle y Valle inferior de Río Negro convierte viable la posibilidad de utilizar los residuos de cosecha como material fumigante como alternativa para el control del mal de los almácigos y la podredumbre basal en la cebolla.

El objetivo en este capítulo fue evaluar *in vitro* el potencial biofumigante de los residuos de la cosecha de tres especies (*Brassica oleracea* var *italica*; *Brassica oleracea* var *capitata* y *Brassica oleracea* var *botrytis*) en estado fresco o deshidratado sobre dos cepas nativas virulentas de *Fusarium oxysporum*.

1.2 MATERIALES

El ensayo se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue (Cinco Saltos, Provincia de Río Negro, República Argentina).

Microorganismos

Se utilizaron dos aislamientos seleccionados de *Fusarium oxysporum* obtenidos de un relevamiento regional durante el año 2012 en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén y Valle inferior del Río Negro. Los aislamientos fueron identificados a nivel de especie por técnicas moleculares. Las cepas *Fusarium*

Arias, Julian Andrés

oxysporum: “F4” LJC10463 de Alto Valle y “F10” LCJ 10466 de Viedma fueron empleadas. Ambas fueron incorporadas en la micoteca del Laboratorio de Semillas de INTA La Consulta y al cepario del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología Agropecuaria del Comahue (IBAC).

Producción de inóculo de *Fusarium oxysporum*

La producción de conidios de ambas cepas del patógeno, se realizó en agar papa dextrosa (APD) enmendado con 300 ppm de estreptomina y 100 ppm del fungicida pentacloronitrobenzeno (PCNB). (Leslie & Summerell, 2006). Se emplearon placas de Petri de 90 mm, en las cuales se sembraron dos discos de 3mm por placa, de cada una de las cepas de *Fusarium oxysporum* procedentes del cepario. Las placas se incubaron durante 7 días en estufa a 25- 30°C.

Obtención del Biofumigante

Se utilizaron residuos de cosecha de *Brassica oleracea* var. *italica* (brócoli), *Brassica oleracea* var. *capitata* (repollo) y *Brassica oleracea* var. *botrytis* (coliflor); todos provenientes de campos de productores hortícolas de la zona de Centenario. La cosecha se realizó manualmente extrayendo la planta entera, incluyendo raíz, tallo y hojas. Una vez obtenido el material, se procedió a limpiarlo con agua para extraer los restos de suelo y finalmente se pesó.

Estado y dosis del biofumigante

Se consideraron para los ensayos dos estados de humedad del material biofumigante:

- **Seco:** Se separaron las hojas del tallo y se dispusieron dentro de un invernadero con ventilación natural por 3 días. Se evaluó el porcentaje de deshidratación por medición del peso seco. El porcentaje de deshidratación de la coliflor fue de 95%, el brócoli de 86% y el repollo de 91%.
- **Fresco:** El material utilizado se extrajo el mismo día de la aplicación.

Se evaluó una dosis de 4g (Ramirez – Villapudua & Munnecke, 1988; Mattner *et al.*, 2008)

1.3. MÉTODOS

Diseño experimental

Se implementó un diseño completamente aleatorizado (DCA) con 4 repeticiones y arreglo factorial (2x4x2x2) con factores: cepa de *F. oxysporum*,

tipo de biofumigante, estado de humedad del biofumigante, tiempo de exposición.

Los niveles del factor cepa de *F. oxysporum* fueron los que siguen:

- “F4” LJC10463 de Alto Valle
- “F10” LCJ 10466 de Viedma

Los niveles del factor tipo de biofumigante fueron los siguientes:

- Repollo
- Brócoli
- Coliflor
- Testigo (sin aplicar biofumigante)

Para el factor estado de humedad del biofumigante los niveles que se consideraron fueron:

- Seco
- Fresco

Finalmente, los niveles del factor tiempo de exposición fueron:

- 48 h luego de la aplicación del biofumigante
- 96 h luego de la aplicación del biofumigante

La variable analizada fue el crecimiento micelial. Se midió el lado mayor y menor y el diámetro obtenido se promedió. Los resultados se expresaron en mm.

Biofumigación *in vitro*

Los ensayos se realizaron en frascos de vidrio de 200 mL de capacidad. Se colocaron en cada uno 4 g del material biofumigante y 26 mL de agua destilada. Los correspondientes a los testigos solo contenían 50 mL de agua destilada.

En el centro de placas de 50 mm con APD - PCNB se sembró un disco de 3 mm de micelio del patógeno en activo crecimiento. Las placas se colocaron en la parte superior de los recipientes que contenían los residuos de cosecha triturados a cuchillo. Los recipientes con las placas fueron sellados con papel film para evitar la difusión de los productos volátiles generados por el biofumigante y se dispusieron al azar en una cámara de cultivo control de temperatura en oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A las 48 y 96 h desde la aplicación del biofumigante se realizaron las mediciones del diámetro de la colonia para cada tratamiento (Figura 5).

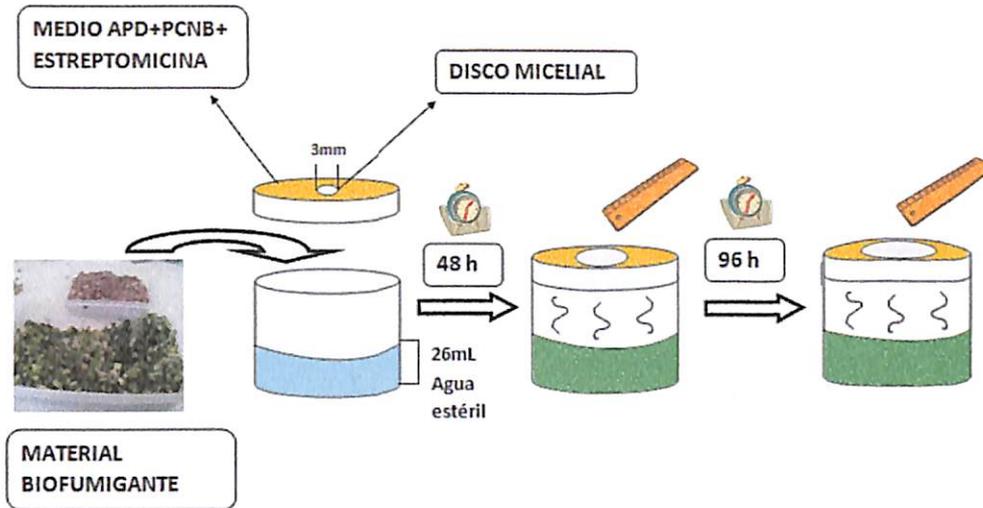


Figura 5 - Esquema del experimento realizado *in vitro*.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA y la comparación de medias mediante el test de LSD con un nivel de significación del 5%. El modelo estadístico utilizado se describe en el Anexo A. Se utilizó el paquete estadístico “Statistica 7”.

1.4. RESULTADOS

El efecto de los biofumigantes sobre el crecimiento micelial de las cepas, mostró una interacción cuádruple significativa entre los factores Cepa, Tipo de Biofumigante, Estado de humedad y Tiempo de Exposición con un p-valor de 0,01.

Efecto de la biofumigación sobre el crecimiento de F10

Cuando se aplicaron los biofumigantes en estado **fresco** a las 48 h se observaron diferencias significativas en el crecimiento micelial promedio, donde el repollo inhibió un 43,6% con respecto al testigo (Figura 6 A). Por su parte, el brócoli y la coliflor no produjeron una inhibición del crecimiento respecto al testigo. A las 96 h el repollo fue el único que mantuvo su efecto inhibitorio respecto al testigo (19%). La coliflor no mostró diferencias significativas respecto al testigo.

Cuando la aplicación fue en estado **seco**, a las 48 h no se encontraron diferencias significativas entre los biofumigantes y el testigo. Sin embargo, se observó una tendencia de inhibición mayor de la coliflor y el repollo con respecto al testigo (Figura 6 B). A las 96 h, se observó diferencias en el crecimiento micelial; el repollo inhibió un 43,9% respecto al testigo. Tanto el brócoli como la coliflor no mostraron ningún efecto.

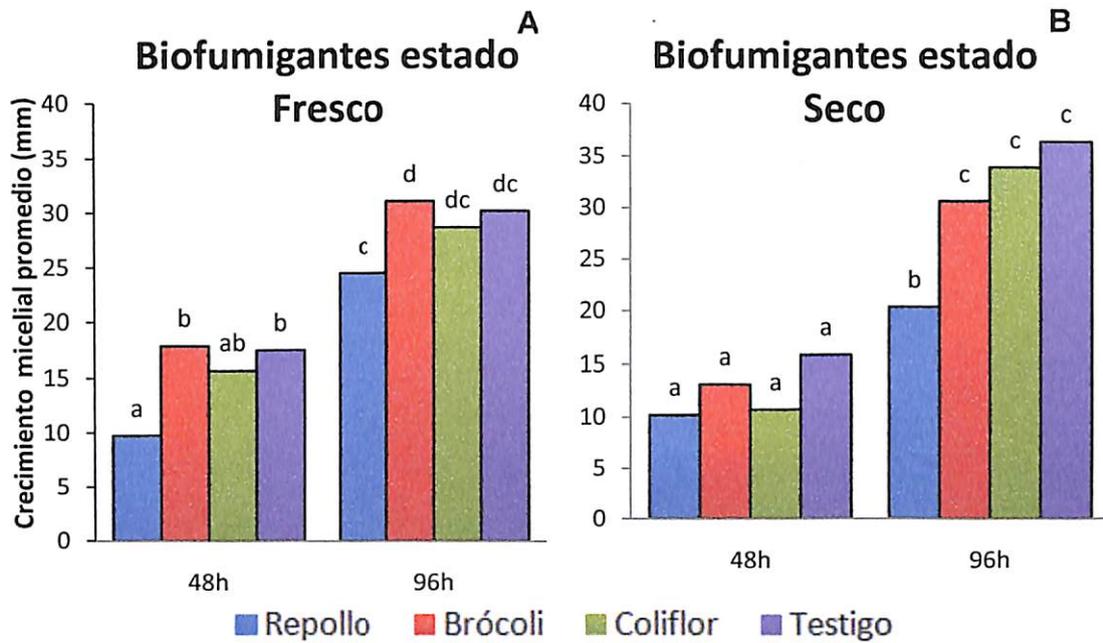


Figura 6- Crecimiento micelial de F10 frente a la exposición de biofumigantes en estado Fresco (A) y Seco (B). Las letras distintas indican las diferencias significativas en los niveles de cada factor por separado según test de diferencia de medias LSD con un $\alpha = 0,05$.

Con respecto al estado de humedad de los biofumigantes, a las 48 h solo la coliflor tuvo un efecto diferencial. El estado seco inhibió un 31,8% respecto al estado fresco. A las 96 h de la aplicación, se registró el mismo comportamiento del crecimiento micelial en todos los biofumigantes. Sin embargo, la coliflor mostró un comportamiento inverso al anterior. El estado de humedad fresco inhibió un 15,33% respecto al seco.

Efecto de la biofumigación sobre el crecimiento de F4

El tratamiento con los biofumigantes en estado **fresco** mostró, a las 48 h una diferencia significativa en la inhibición del patógeno con el repollo; el cual inhibió un 64% el crecimiento micelial. Tanto el brócoli como la coliflor mantuvieron las diferencias (Figura 7 A). A las 96 h, se mantuvieron las diferencias significativas entre biofumigantes, y nuevamente el repollo produjo una inhibición del 63%. El brócoli y la coliflor no resultaron significativamente distintos al testigo.

Los biofumigantes en estado **seco**, a las 48 h y 96 h, no mostraron diferencias del crecimiento micelial. Sin embargo, el repollo mantuvo la tendencia inhibidora del crecimiento del hongo. A las 96 h el brócoli también mostró una tendencia favorable a la inhibición del crecimiento (Figura 7 B).

Al considerar el estado de humedad del biofumigante y su efecto en el tiempo, solo el repollo registró diferencias significativas. La aplicación en fresco a las 48 h inhibió un 38% más que el seco, mientras que a las 96 h la inhibición alcanzó un 50%.

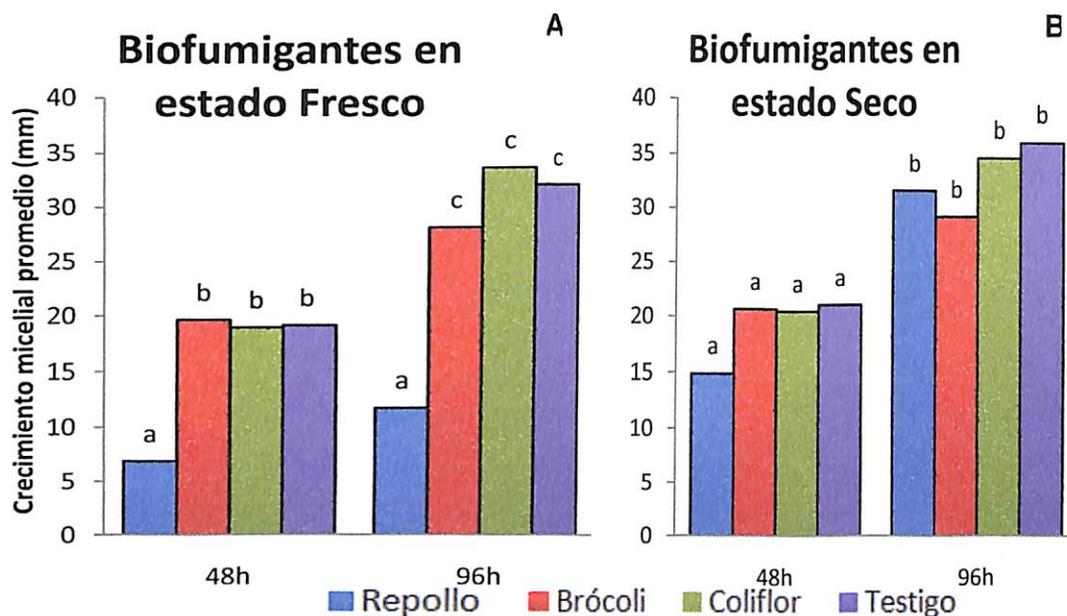


Figura 7 - Crecimiento micelial de F4 frente a la exposición de biofumigantes en estado Fresco (A) y Seco (B). Las letras distintas indican las diferencias significativas en los niveles de cada factor por separado según test de diferencia de medias LSD con un $\alpha = 0,05$.

1.5 DISCUSIÓN

Los antecedentes sobre la biofumigación en la región son escasos. La temática aquí abordada constituye un importante punto de partida en la exploración de potenciales biofumigantes para ser utilizados en la producción hortícola.

Uno de los aspectos más destacados de este estudio, radica en el empleo de cepas nativas aisladas de la región productora de cebolla de la Norpatagonia Argentina. De esta manera los resultados obtenidos en este trabajo, representarían condiciones más cercanas a la realidad de la problemática local actual.

Los tres biofumigantes evaluados inhibieron el crecimiento micelial de las cepas utilizadas. Ramirez-Villapudua y Munnecke (1988) obtuvieron inhibiciones del crecimiento del 100% tras exponer en frascos herméticos a *F. oxysporum f. sp. conglutinans* a la descomposición de repollo deshidratado. El efecto reportado por los autores indica que fue del tipo fungistático. Al mismo tiempo, Fan *et al*, (2008), obtuvieron inhibiciones de crecimiento de *F. oxysporum* del 22% y 28% (respecto al control) al exponer *in vitro* a los patógenos frente al coliflor y repollo, respectivamente. Zasada *et al* (2003) evaluaron el efecto de la biofumigación de dos dosis de residuos deshidratados de brócoli sobre *F. oxysporum* inoculado en macetas. Ninguna de las dos dosis (4 Kg/m² y 8,4 Kg/m²) produjeron una disminución de la población del hongo patógeno.

Arias, Julian Andrés

Por su parte, Troncoso – Rojas *et al*, (2008) evaluaron *in vitro* la toxicidad de los volátiles puros liberados en la descomposición del brócoli, repollo y coliflor sobre varios patógenos de origen fúngico incluidos *F. oxysporum*. La aplicación de bajas concentraciones los ITC permitió un 100% de inhibición del crecimiento.

El comportamiento inhibitorio diferencial de las especies de *Brassicas* observados en los antecedentes y particularmente en los resultados aquí expuestos, podría atribuirse a los distintos tipos y concentraciones de los GLS presentes en los tejidos (Fan *et al*, 2008). El mayor efecto inhibitorio del repollo obtenido, podría asociarse a una mayor concentración de GLS en sus tejidos o bien al tipo de precursor. En este sentido en un estudio comparativo del contenido de GLS en distintos cultivares de repollos ornamentales frente a la col rizada (Kushad, Cloyd & Babadoost, 2004), los resultados mostraron que los primeros contenían un 35% más de concentración de GLS. Con respecto a la concentración de GLS, Zasada *et al* (2003), concluyen que si bien la incorporación de los residuos de cosecha es la etapa más lógica desde el punto de vista productivo, puede no coincidir con la máxima concentración de GLS presentes en la planta. Asimismo, destacan que dado que el grupo de ITC depende del precursor de GLS y que estos últimos varían según el hospedante, la menor inhibición del brócoli y la coliflor obtenidas en este trabajo, podría deberse a que las dos cepas de *F. oxysporum* no fueron sensibles a los compuestos volátiles productos de la hidrólisis de los GLS presentes en sus tejidos (Bellostas, Sorensen & Sorensen, 2004).

Brown y Morra (2005) indican que el estado de hidratación resulta un factor clave en el proceso de biofumigación. Los resultados expuestos en este capítulo no son concluyentes en este aspecto. El efecto del estado de humedad del repollo respecto a la inhibición del crecimiento micelial de la cepa F4, contradice los resultados expuestos por Ramírez – Villapudua y Munnecke, (1988) y de Lazzeri, Leoni y Manici (2004), los cuales ubicaron al repollo deshidratado como más eficaz en la inhibición del crecimiento micelial que el fresco. El retraso en la acción inhibitoria del repollo seco observado ante la cepa F10 puede deberse a un comienzo tardío de la reacción. Brown y Morra (1997) definieron que la degradación de los GLS catalizada por la enzima mirosinasa ocurre en presencia de humedad, por lo cual al estar los residuos muy deshidratados la humedad óptima pudo haberse alcanzado al menos luego de las 48 h de la aplicación.

La exposición de ambas cepas de *F. oxysporum* a los compuestos volátiles producidos por la descomposición del repollo produjo un retraso en el crecimiento micelial pero no un efecto tóxico permanente. Smolinska *et al* (2003) al exponer ITC puros frente a distintas cepas de *F. oxysporum* en un recipiente hermético, lograron una inhibición total del crecimiento micelial solo con la aplicación de altas dosis; y aún así, este efecto puede variar según la

Arias, Julian Andrés

sensibilidad de la cepa expuesta. Asimismo, indican que la exposición a los ITC no fue tóxica para el hongo ni detuvo la formación de órganos de resistencia (conidios y clamidosporas), pero si su germinación. Estos autores sugieren que la mejor etapa para aplicar la biofumigación para el control de *F. oxysporum* es en su forma de resistencia.

1.6. CONCLUSIONES

El repollo resultó el inhibidor del crecimiento micelial más eficaz para ambas cepas de *F. oxysporum in vitro*.

Se observó un efecto diferencial de la biofumigación sobre las cepas del patógeno según el biofumigante utilizado.

El estado de humedad del biofumigante afectó de manera distinta al crecimiento micelial según la cepa expuesta. El estado ~~Fresco~~ del repollo inhibió en mayor medida que el estado ~~Seco~~ ante F4 (Alto Valle).

CAPÍTULO 2

ENSAYO *IN VIVO*. “EFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN CON RESIDUOS DE COSECHA DE *BRASSICA OLERACEA* VAR. *CAPITATA* (REPOLLO) SOBRE *FUSARIUM OXYSPORUM* EN ALMÁCIGOS DE CEBOLLA”

Los resultados preliminares de este ensayo fueron publicados en el 38° congreso Argentino de Horticultura (2015) bajo el título de “Efecto de la biofumigación con residuos de cosecha de repollo (*Brassica oleracea* var *capitata*) sobre el mal de los almácigos (*Fusarium oxysporum*) en la producción de plantines de cebolla.” Arias, J.A.1; Lutz, M.C. Reybet, G.

2.1 INTRODUCCIÓN

La aplicación de la biofumigación con residuos de cosecha de los cultivos de brassicas aparece como una alternativa ecológica al BM dado que reduce la emisión de contaminantes atmosféricos, revaloriza los residuos de la producción (Bello *et al*, 2008) y mejora la calidad del suelo (Kago *et al*, 2014). En el capítulo anterior, quedó demostrado el efecto inhibitorio *in vitro* de la degradación de los residuos de cosecha de brassicas sobre las cepas regionales de *F. oxysporum*, el repollo fue el que produjo mayor efecto. Estos resultados no son extrapolables a la condiciones de campo, por lo tanto es necesario conocer el comportamiento de este biofumigante en bioensayos en suelo.

Existen numerosos reportes de la eficacia de diferentes biofumigantes en las condiciones naturales de campo en suelo. Ramirez – Villapudua y Munnecke (1988), encontraron una disminución de la población y la severidad de *Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans* al tratar el suelo infestado con enmiendas de nueve especies de brassicas y en combinación o no, con la solarización. Estos autores, indican que tras la biofumigación con repollo, se logró disminuir en más de 99% los propágulos por gramo de suelo del patógeno con respecto a la enmienda de estiércol de buey. Destacan, la efectividad de la enmienda de repollo, con la cual lograron incrementar su efecto al secar el residuo antes de la incorporación. Al combinar la biofumigación junto a la solarización no se detectó la presencia de propágulos del patógeno en el suelo.

Larkin y Griffin (2007), evaluaron cultivos de diferentes Brasicáceas (canola, colza, rábano, nabo, mostaza amarilla y mostaza india) como potenciales biofumigantes para el control de patógenos del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) a escala de invernadero y en un campo con problemas de sarna polvorienta. A escala de invernadero, la biofumigación con todos los residuos redujo el nivel de inóculo de *Rhizoctonia solani* en un 20% a 56%. Además el residuo de rábano, colza y la mostaza india redujeron la severidad entre un 40 y 83% en plantines que fueron trasplantados luego del tratamiento. A campo frente a la sarna polvorienta de la papa, la rotación de cultivo con mostaza india, colza y canola y su posterior incorporación redujo la severidad de la enfermedad en los cultivos de papa subsecuentes en un 15% a 40%. Asimismo, la rotación de cultivo y posterior incorporación al suelo con canola y colza redujeron la sarna negra (*Rhizoctonia solani*) en un 70% a 80% relativo a la rotación de cultivo tradicional (con *Avena sativa*).

Abera *et al* (2011), evaluaron la biofumigación con *Brassica carinata* frente a la marchitez del garbanzo causada por *F. oxysporum f. sp. cicerus* bajo condiciones de invernadero. El suelo infestado fue tratado con la incorporación del tejido vegetal de *B. carinata* para luego sembrar garbanzos (*Cicer arietinum*). Los tratamientos biofumigados redujeron la incidencia de la

enfermedad entre un 16% a un 46%, incrementando los rendimientos entre un 36% a 45% con respecto a los tratamientos sin la incorporación de *B. carinata*. Infantino, Santori, Mocali y Lazzeri (2011), informan resultados preliminares del uso de la biofumigación con *Brassica juncea* para el control de la podredumbre de la corona y raíz del trigo y el colapso del melón; cuyos agentes etiológicos son de *Fusarium spp.*, y *Bipolaris sorokiniana*, respectivamente. Los resultados indicaron una reducción de la incidencia y la severidad de la enfermedad, y de las poblaciones de ambos patógenos del suelo. Asimismo, no se observaron cambios en la microflora total del suelo, esto sugiere que la biofumigación con *Brassica juncea* tuvo un efecto biocida específico sobre los patógenos.

Mattner *et al* (2008), luego de la biofumigación con *B. rapa* y *B. napus* en un ensayo a campo, observaron una disminución del crecimiento del 40% de las malezas emergidas.

Iriarte *et al* (2011), evaluaron el efecto de la biofumigación con tres dosis (0 Kg/m², 3 Kg/m² y 5 Kg/m²) de cabezas de repollo comercial frescos sobre la población de una cepa de *F. oxysporum* inoculada en distintas concentraciones en macetas con suelo estéril. Las dosis de 3 Kg/m² y 5 Kg/m² produjeron una disminución relativa al control de 71% hasta 84% respectivamente. La población disminuyó cuando el inóculo inicial era igual o menor a 3,3x10² conidios/g suelo.

En este contexto, dada la probada eficacia de los residuos de brasicas a nivel mundial y a las características de la producción hortícola regional (Norpatagonia), en la cual se cultivan importantes superficies de repollo (Ruiz, Vega & Zanetta, 2004), la biofumigación podría ser una estrategia de manejo de patógenos de suelo sustentable dentro de la producción hortícola.

En este Capítulo se plantea como hipótesis que la biofumigación con los residuos de la cosecha de repollo (*Brassica oleracea var capitata*) en estado fresco ó deshidratado, reduce la mortandad por *Fusarium oxysporum* de las plántulas de cebolla en almácigos, como así también, una mejora del rendimiento cuantitativo y cualitativo de los plantines.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la biofumigación con distintas dosis y estados de hidratación del repollo sobre el rendimiento cuanti y cualitativo de los plantines de cebolla y en particular establecer una combinación óptima del estado de deshidratación del residuo y la dosis que permitan obtener la menor mortandad de plantines de cebolla.

2.2. MATERIALES

El ensayo se realizó desde fines de diciembre del 2014 hasta mediados de Mayo del 2015, en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue (Cinco Saltos, Provincia de Río Negro, República Argentina).

Como unidades experimentales se utilizaron contenedores de 26x10x10 cm con suelo estéril y suelo sin esterilizar sobre los cuales se aplicaron distintos tratamientos de biofumigación.

Microorganismos

Se utilizaron los aislamientos "F4" LJC 10463 y "F10" LCJ 10466 de *Fusarium oxysporum* descritos en la sección 1.2 del Capítulo anterior.

Producción de inóculo

La producción de inóculo de *Fusarium oxysporum*, se llevo a cabo de acuerdo a lo descrito por Leslie y Summerell (2006). El sustrato escogido fue granos de maíz. El mismo se tamizó entre 10 y 6 mesh de tamaño. Se humedeció durante 16 h, se escurrió y se dispuso en bolsas de 0,750 Kg. Los granos se esterilizaron en dos veces consecutivas (24 h de diferencia) en autoclave durante 15 minutos a 2 atmósferas y cada bolsa se sembró con 6mL de la suspensión de conidios de F4 y F10. Las bolsas fueron incubadas a 25-30°C durante 20 h. Finalmente, se procedió al secado del mismo, colocándolo sobre bandejas plásticas limpias cubierto con un papel a 27°C durante 20 h. Una vez seco, el inóculo se fraccionó en frascos de vidrio debidamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 20% y se conservó en heladera a 4°C.

Antes de su utilización se realizó el recuento de conidios mediante la cámara de Neubauer para conocer la concentración de conidios por gramo de sustrato.

Suelo

El suelo utilizado se extrajo del cuadro 11 de la chacra experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Comahue. Se tomaron los primeros 20 cm del perfil del suelo. La textura del suelo es franco limosa, con un pH de 7,51, materia orgánica de 3,65%, no salino y no sódico. El suelo a esterilizar, se acondicionó y se dispuso en bolsas de polipropileno de 2 Kg cada una. La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 2 atmósferas durante 2 h. El suelo que no fue esterilizado fue reservado al abrigo de la luz y la humedad hasta su utilización.

Arena

Se zarandó arena por un tamiz de 10 mesh y se dispuso en bolsas de polipropileno de 2Kg que se esterilizó en autoclave a 2 atmósferas durante 2 h.

Biofumigante

Se utilizaron residuos de cosecha de *Brassica oleracea* var. *capitata* (repollo). Los mismos provinieron de productores hortícolas de la zona de Centenario. La cosecha se realizó extrayendo la planta entera, incluyendo raíz, tallo y hojas. Una vez obtenido el material, se procedió a limpiarlos con una solución de detergente para extraer los restos de suelo y luego fueron inmersas en una solución al 5% de hipoclorito de sodio para lograr una desinfección. Finalmente

Arias, Julian Andrés

se dejaron escurrir y secar para ser pesados con una balanza granataria (Modelo EEW-5000 Moretti $\pm 0,01$ g)

Estado de Humedad de biofumigante

Se consideraron para los ensayos dos estados de humedad del material biofumigante tal como se detalló en el Capítulo 1 en el inciso 1.2.

Semillas

Se utilizaron semillas de cebolla (*Allium cepa* cv. VALCATORCE INTA) de calidad certificada. Se realizó ensayo de germinación bajo normas ISTA (International Seed Testing Association, 2015). La germinación resultó en un 93%.

2.3. MÉTODOS

Diseño experimental

Para este ensayo se implemento un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (2x2x3x2) y tres repeticiones. Los factores fueron: cepa de *F. oxysporum*, condición de esterilidad del suelo, dosis de biofumigante, estado de humedad del biofumigante.

Los niveles del factor cepa de *F. oxysporum* fueron los que siguen:

- “F4” LJC10463 de Alto Valle
- “F10” LCJ 10466 de Viedma

Los niveles del factor condición de esterilidad del suelo fueron los siguientes:

- Estéril
- No estéril

Los niveles del factor dosis de biofumigante fueron:

- 0 Kg repollo/m²
- 3 Kg repollo/m² (Iriarte *et al*, 2011)
- 6 Kg repollo/m² (Kirkegaard, 2004)

Para el factor estado de humedad del biofumigante los niveles que se consideraron fueron:

- Seco
- Fresco

Las variables evaluadas fueron:

Arias, Julian Andrés

- Porcentaje de plántulas emergidas a los 14 días.
$$\% = \frac{\text{Numero de Plántulas emergidas a los 14 días desde la siembra}}{\text{Numero de semillas sembradas}} * 100$$
- Porcentaje de plantines vivos a los 75 días desde la siembra
$$\% = \frac{\text{Numero de Plantines vivos a los 75 días desde la siembra}}{\text{numero de plantulas emergidas a los 14 días}} * 100$$
- Longitud de raíz promedio por plantín (en cm)
- Longitud de hoja promedio por plantín (en cm)
- Peso Fresco total (en g)
- Peso Seco total (en g)
- Peso Fresco promedio por plantín (en g)
- Peso seco promedio por plantín (en g)

Desarrollo del experimento

Se utilizó la metodología adaptada de Iriarte *et al* (2011). En los contenedores seleccionados se colocó suelo estéril y no estéril el cual se inoculó con una dilución en arena estéril con cada uno de los patógenos para obtener una concentración final de $3,3 \times 10^2$ conidios/g de suelo (Iriarte *et al*, 2011). El suelo inoculado se homogeneizó en los primeros 5 cm de cada contenedor.

Luego de 24 h de la inoculación, se incorporaron los residuos de cosecha triturados del repollo en estado fresco y seco en el suelo. Los contenedores se regaron con 100 mL de agua y se selló la superficie del mismo con polietileno cristal de 150 μm de espesor. Los contenedores se dispusieron al azar en una cámara de crecimiento con una temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodo controlado de 12 h de luz.

Transcurridos 30 días, los contenedores se destaparon para permitir la aireación del suelo y se removió la superficie para favorecer la difusión de los gases de la matriz del suelo. Se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura y luz durante 22 días (Brown y Morra, 2005).

La temperatura del suelo como factor condicionante de la BIOF fue registrada durante todo el bioensayo. Se utilizó un datalogger múltiple marca “Decagon Devices” Em5b modelo EL9404.

Luego de aireación se procedió a la siembra. En cada maceta se colocó arena estéril en la superficie y se sembraron 50 semillas distribuidas en 3 hileras. Las mismas se cubrieron con arena y se regaron con 100 mL de agua. Los contenedores se dispusieron al azar dentro de la cámara de crecimiento cubiertos superficialmente con polietileno a una temperatura de $19 \pm 2^\circ\text{C}$ con fotoperiodo de 12 h de luz. Los mismos se regaron diariamente.

A los 14 días desde la siembra se realizó el conteo de plántulas emergidas. A los 75 días se registró el número de plantas vivas, se midió la longitud de hoja y raíz de cada planta, y determinó el peso fresco y seco para cada tratamiento (Figura 8).

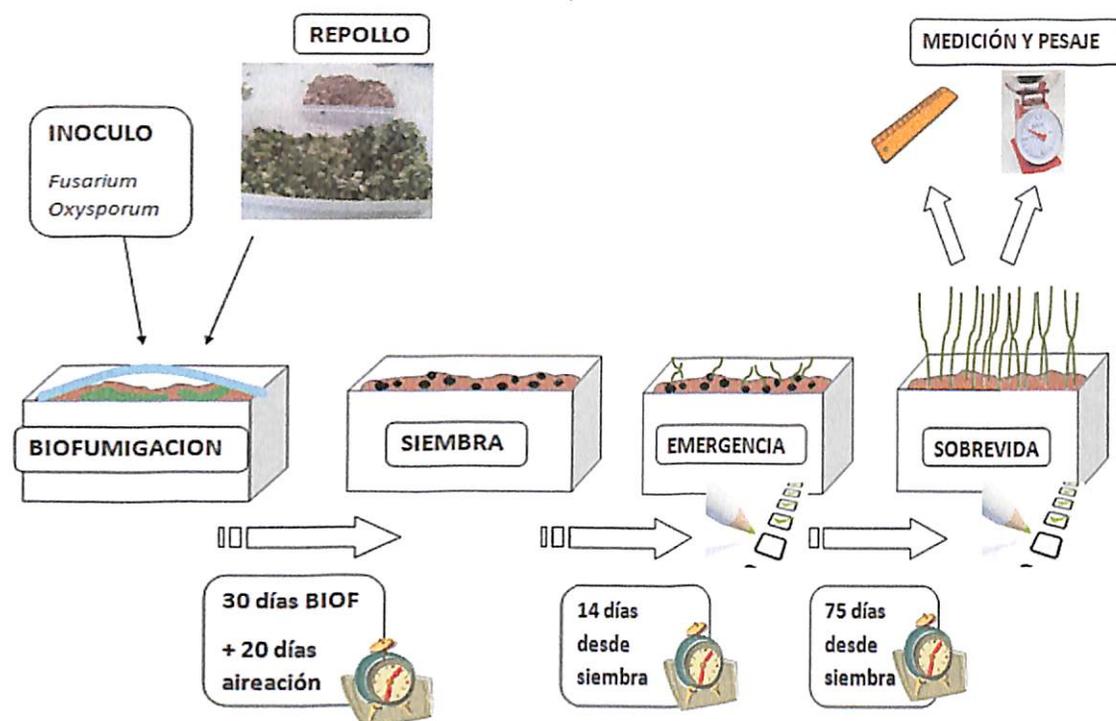


Figura 8 - Esquema del desarrollo experimental del ensayo.

Análisis estadístico

Dado el carácter multivariado de la variable de respuesta, para el estudio del comportamiento de los factores cepa de *F. oxysporum*, condición de esterilidad del suelo, dosis y estado de humedad del biofumigante, en una primera instancia se recurrió al Análisis de Componentes Principales (ACP) con fines descriptivos. Se caracterizó el comportamiento de las unidades experimentales que recibieron las combinaciones de los distintos niveles de estos factores. En segunda instancia, se estudió cada variable por separado. La emergencia de plántulas a los 14 días y la sobrevivencia relativa a los 75 días fueron analizadas mediante análisis univariado (ANOVA) y por modelos lineales generalizados dada la naturaleza de la respuesta binomial. El peso húmedo, el peso seco, la longitud de las hojas y de la raíz fueron analizados mediante un análisis univariado (ANOVA). Se aplicó el test de LSD (Mínima Diferencia Significativa) para la comparación de los diferentes niveles de factores con un $\alpha=0,05$ con el paquete estadístico “Statistica 7” y “R”

2.4. RESULTADOS

Análisis de Componentes Principales (ACP)

El Análisis de Componentes Principales mostró que los dos primeros ejes explicaron 79,23% de la variabilidad contenida en las ocho variables de respuesta registradas (el primero 60,66% y el segundo 18,57%) (Figura 9). En el Anexo D se muestran las coordenadas de las variables. Las variables que

Arias, Julian Andrés

contribuyeron a la construcción de la primera componente fueron la sobrevida a los 75 días, el peso fresco total, el peso seco total, y la longitud de raíz todos en forma negativa (aumento de derecha a izquierda). Con respecto al segundo eje las variables que aportaron a la construcción del mismo fueron, la emergencia a los 14 días y la sobrevida a los 75 días con un gradiente de abajo hacia arriba mientras que el peso fresco y la longitud de hoja de arriba hacia abajo.

Se observó un agrupamiento de los individuos de acuerdo a la condición de esterilidad del suelo, de la cepa y en menor medida de la dosis. Aquellos individuos con suelo no estéril se agruparon a la izquierda del componente x. La emergencia fue variable. Los individuos en presencia de la cepa F10 se ubicaron en la mitad superior del eje “y” (Figura 9). Los individuos se agruparon para poder caracterizarlos en:

- Grupo 1: Individuos con un promedio de emergencia de 73,20%, valor promedio de sobrevida de 81,24%, valor promedio de peso fresco total de 24,3g, valor promedio peso seco total de 4,6g, promedio peso seco por plantín 0,14g y promedio de longitud de raíz de 9,8cm. La longitud de la hoja registró valores promedios de 16,4cm.
- Grupo 2: Individuos con proporción de emergencia promedio de 62%, valores promedios de sobrevida de 54,80%, valor promedio de peso fresco total de 16,4g, promedio de peso seco total 2,4g, peso fresco plantín de 1,0g, valor promedio de peso seco plantín de 0,1g, promedio de longitud de hoja de 18,2cm y promedio de longitud de raíz de 11,0cm.
- Grupo 3: Individuos con promedios de emergencia de 70,44% y valor promedio de sobrevida de 36,67%. Los parámetros de calidad de plantín fueron en promedio: peso fresco total 10,3g, peso seco total de 1,5g, peso fresco por plantín 0,8g; longitud hoja de 16,5cm y longitud raíz de 9,6cm.
- Grupo 4: Individuos con valor promedio de emergencia de 60,66% y valor promedio de sobrevida de 29,65%. Los plantines exhibieron los siguientes valores promedios en parámetros de calidad: peso fresco total de 4,7g, peso seco total de 0,4g, peso fresco por plantín 0,7g, peso seco 0,1g; longitud de hoja de 11,8cm y longitud de raíz de 9,9cm.
- Grupo 5: Los individuos en este grupo se caracterizaron por poseer valores promedios de emergencia de 53,67% y promedio de sobrevida 19,9%. Los plantines resultantes mostraron con valores promedios de peso seco de 0,4g, peso fresco 4,7g y promedios de longitud de hoja y raíz (16,9cm y 9,3 cm respectivamente).
- Grupo 6: En este grupo el único individuo exhibió una emergencia y sobrevida bajo (48,6% y 41,1% respectivamente). Se obtuvieron

Arias, Julian Andrés

plantines de baja calidad (plantines de hojas pequeños 11,6cm, de bajo peso y con sistema radicular poco desarrollado 4,9cm)

- Grupo 7: Este grupo está caracterizado por poseer un promedio de emergencia de 77,7%, un promedio de sobrevivencia de 42,9%. En cuanto a la calidad de los plantines este grupo los siguientes valores promedios: peso fresco promedio plantín de 0,5g, longitud de hoja de 14,0cm y longitud de raíz de 8,4cm.
- Grupo 8: Los individuos de este grupo se caracterizaron por exhibir un promedio de emergencia de 75,00%, longitud de hoja 14,5cm y peso fresco total promedio 18,8g. Al mismo tiempo, el promedio de sobrevivencia fue de 73,01%. El promedio de peso seco total fue de 2,3g, peso seco por plantín de 0,1g y la longitud de raíz promedio de 9,6cm.

Dado lo anteriormente descrito, la mayor emergencia, sobrevivencia, peso, y longitud de raíz se registraron en presencia de la cepa originaria de Viedma, el suelo no estéril, en ambos estados de humedad del biofumigante y en todas las dosis.

Efecto de la biofumigación en la emergencia de plántulas

Las temperaturas registradas durante el proceso de BIOF en este ensayo estuvieron dentro del rango recomendado (24°C y 32°C), sin embargo, siempre se mantuvieron por debajo del óptimo (37°C). En el ANEXO B se muestra el comportamiento de esta variable durante la BIOF, aireación, siembra y cultivo de plantines.

El ANOVA mostró efecto cercano al valor crítico del factor cepa (p-valor =0,0618). Como se puede observar en la Figura la cepa F10 registró mayor emergencia promedio a los 14 días. Lo cual determinó el análisis a través de cada cepa estudiada.

Al analizar por cepa, en **F10** el GLZ mostró un efecto significativo del factor dosis. Al incorporar biofumigante a dosis inferiores (3 Kg/m²) hay 1,5 veces más chances que emerja una plántula que aplicando 6Kg/m².

Para la **cepa F4** se halló una interacción entre la condición de esterilidad del suelo y la dosis. Al no incorporar biofumigante en suelo no estéril, hay 5 veces más chances de que una plántula emerja que en un suelo estéril.

Arias, Julian Andrés

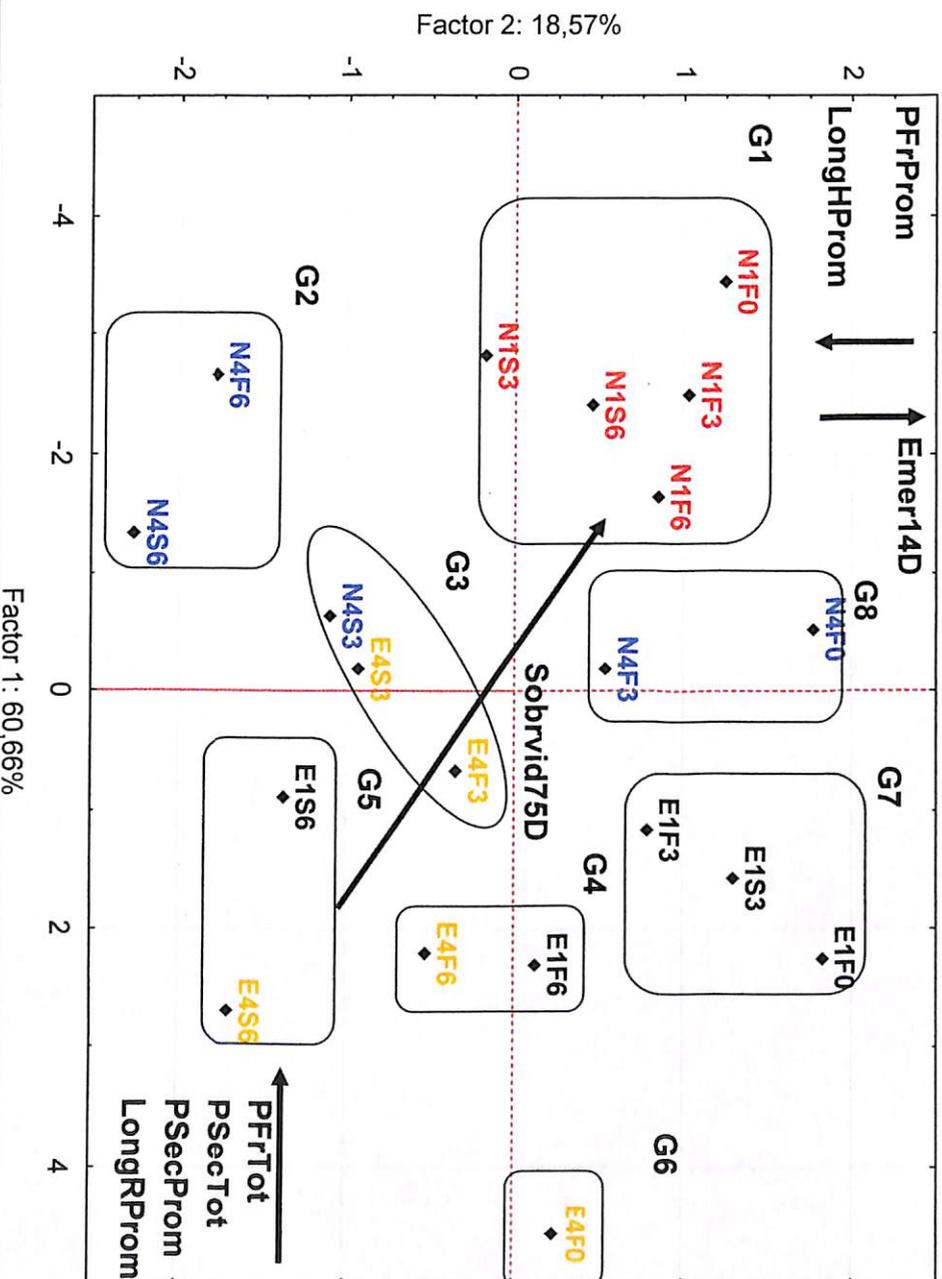


Figura 9 -Distribución de los tratamientos sobre las coordenadas principales. Cada individuo representa el promedio de las tres repeticiones por tratamiento. Emer14D: Emergencia a los 14 días desde la siembra. Sobrevivid75D: Sobrevivida a los 75 días desde la siembra. PFrTot: Peso Fresco Total por tratamiento. PSecTot: Peso Seco Total por tratamiento. PSecProm: Peso Seco Promedio de plantín. Peso Fresco Promedio de plantín. LongHProm: Longitud Hoja Promedio de plantín. LongRRProm: Long Raíz Promedio de plantín. N: Suelo No estéril, E: Suelo estéril, 1: cepa F10 Viedma, 4: cepa F4 Alto Valle, F: biofumigante Fresco, S: biofumigante Seco, 0: Dosis 0Kg/m², 3: Dosis 3Kg/m², 6 Kg/m².

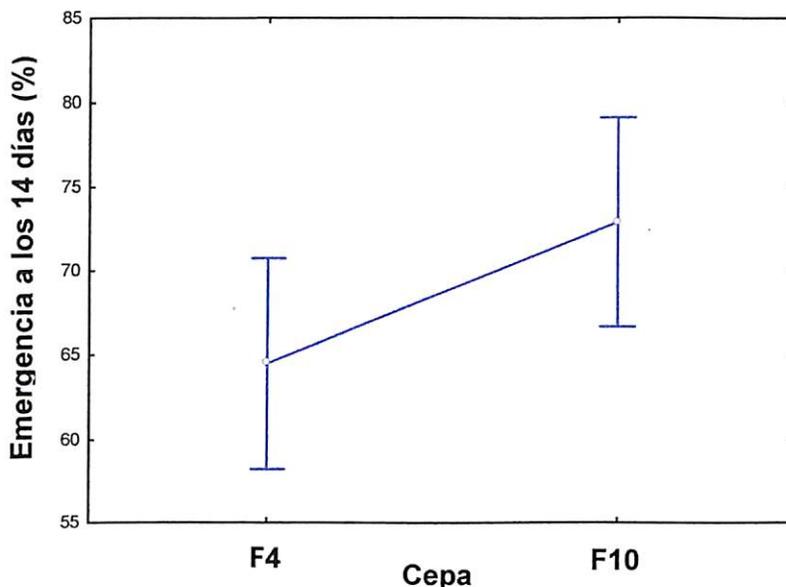


Figura 10 - Porcentaje de emergencia de plántulas a los 14 días según cepa.

Efecto de la biofumigación en la sobrevida de plantines de cebolla

El efecto de la aplicación de repollo en la sobrevida de los plantines de cebolla a los 75 desde la siembra, mostró una interacción triple de los factores: condición esterilidad suelo, estado de humedad y dosis de biofumigante (p-valor 0,02). Nuevamente la condición de esterilidad del suelo y la dosis de biofumigante jugaron un papel importante, pero no así origen de la cepa. Dados estos resultados se realizó el análisis por cepa.

Para **F10**, solo fue significativa la condición de esterilidad del suelo (p-valor 0,001). Como se puede observar en la Figura 11, en todas las dosis el porcentaje de sobrevida de los plantines fue mayor en el suelo no estéril. Asimismo se observó una reducción de la sobrevida al aplicar una dosis de 6Kg/m² de biofumigante tanto en el suelo estéril como no estéril.

El comportamiento de la sobrevida de los plantines en el **suelo estéril**, de acuerdo al aumento de la dosis, el mayor porcentaje se obtuvo con 3Kg/m² en estado seco. La sobrevida fue 18% más que la dosis 0Kg/m² y un 24% más que la misma dosis en estado fresco (Figura 11). Al duplicar la dosis a 6Kg/m², el porcentaje de sobrevida fue menor al control tanto para el estado fresco como el deshidratado (12 % y 18 % menos respectivamente). (Figura 11).

Se evidenció un comportamiento diferente cuando se aplicó el biofumigante en el **suelo no estéril**. Una dosis de 3Kg/m² en estado fresco no presentó diferencias respecto al control, sin embargo cuando el biofumigante fue deshidratado, la sobrevida de los plantines fue un 25% menos que el control. La dosis de 6Kg/m² no presento diferencias entre el estado fresco y seco en la sobrevida, alcanzando un 23% menos de plantines con respecto al control (Figura 11).

Arias, Julian Andrés

El análisis GLZ, mostró un efecto de la condición de esterilidad del suelo que confirma las tendencias observadas en el ANOVA. En presencia de la cepa F10, hay aproximadamente 7 veces más chance que un plantín sobreviva a los 75 días que en un suelo estéril.

La cepa **F4** mostró interacción entre la condición de esterilidad del suelo y la dosis (p-valor 0,012). La incorporación de 3Kg/m² al suelo estéril mostró un aumento de la sobrevida de 26,6% respecto a la ausencia del biofumigante en el suelo. Por su parte, con 6 Kg/m² se evidenció una reducción de ésta variable en un 17% con respecto a la dosis anterior.

En el caso de los tratamientos con **suelo no estéril**, con la aplicación del biofumigante a una dosis de 3 Kg/m² en estado fresco no se observaron diferencias con el control, por el contrario, la aplicación de la misma dosis en estado deshidratado registró una disminución de la sobrevida de los plantines del 39% respecto al control y un 32% respecto al estado fresco en la misma dosis. Al aumentar la dosis a 6 Kg/m², la tendencia se invirtió, el estado fresco fue el que registró un 34% menos de sobrevida respecto al control y un 30% menos respecto a la dosis 6 Kg/m² en estado deshidratado.

El análisis de los datos mediante GLZ halló una interacción significativa entre la condición de esterilidad del suelo y la dosis para F4. Sin el agregado de biofumigante, en un suelo no estéril, hay 72 veces más chances de sobrevida de un plantín emergido que en un suelo estéril. Por otro lado, al incorporar una dosis de 6Kg/m² de biofumigante en un suelo no estéril, hay 4,6 veces más chances de sobrevida de un plantín que en un suelo estéril.

Efecto de la biofumigación sobre la calidad del plantín

Se evaluaron individualmente las variables registradas.

Efecto de la biofumigación sobre el peso fresco total por tratamiento

Se detectó un efecto significativo de la condición de esterilidad del suelo y el origen de la cepa; Con respecto a la condición de esterilidad del suelo, la totalidad de los plantines de los tratamientos con suelo no estéril pesaron en promedio 3,5 veces más que en el suelo estéril (Figura 12).

Arias, Julian Andrés

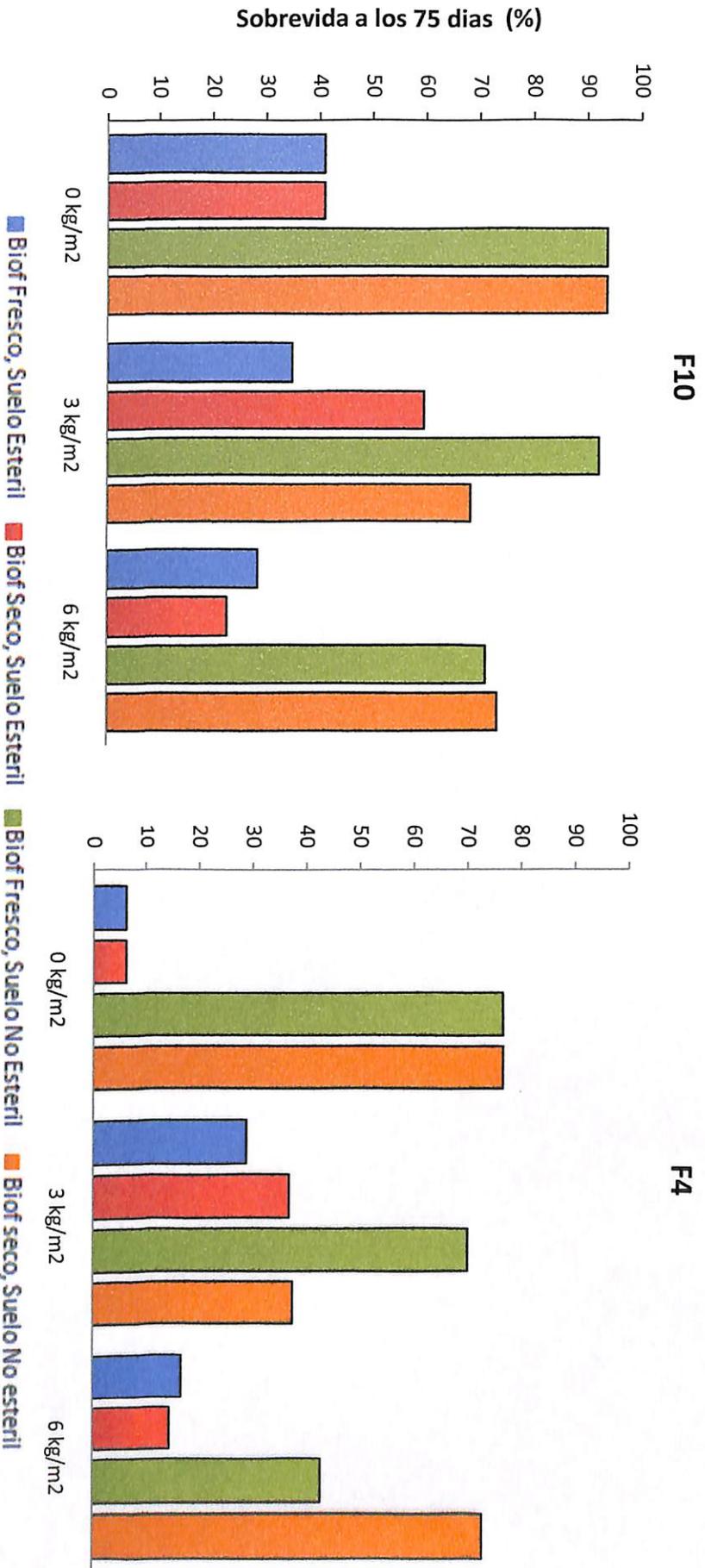


Figura 11 - Porcentaje de sobrevida a los 75 días de los tratamientos en presencia de cepa F10 y F4.

Arias, Julian Andrés

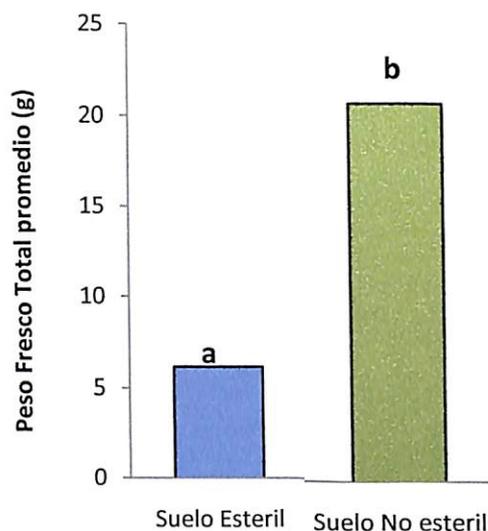


Figura 12- Peso fresco de la totalidad de los plantines que sobrevivieron a los 75 días expresado según condición de esterilidad del suelo. Las letras distintas indican las diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$ según test diferencia de medias LSD.

Por otro lado, al considerar el factor cepa, los tratamientos con F10 pesaron un 47,3% más que con F4 (Figura 13).

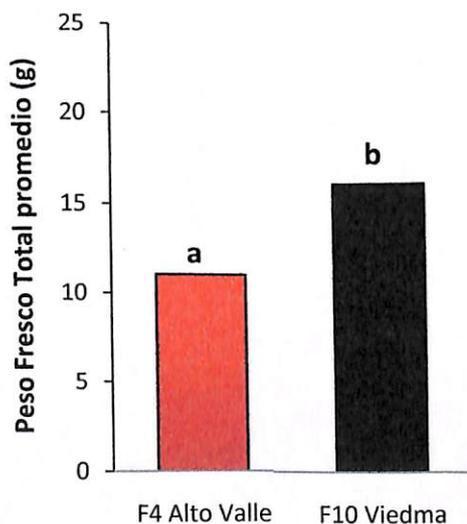


Figura 13- Peso fresco de la totalidad de los plantines que sobrevivieron a los 75 días expresado por cepa de *F. oxysporum*. Las letras distintas indican las diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$ según test diferencia de medias LSD.

Efecto de la biofumigación sobre el peso seco total de los plantines

Se observó una interacción doble entre la condición de esterilidad del suelo y la cepa (p -valor=0,007). Como se puede observar en la Figura 14, la combinación con mayor peso seco registrado fue en suelo no estéril con F10. El total de plantines secos pesó 2,1 veces más que en la combinación suelo no estéril y

F4. Los pesos secos más bajos se registraron en las combinaciones con suelo estéril indistintamente a la cepa evaluada.

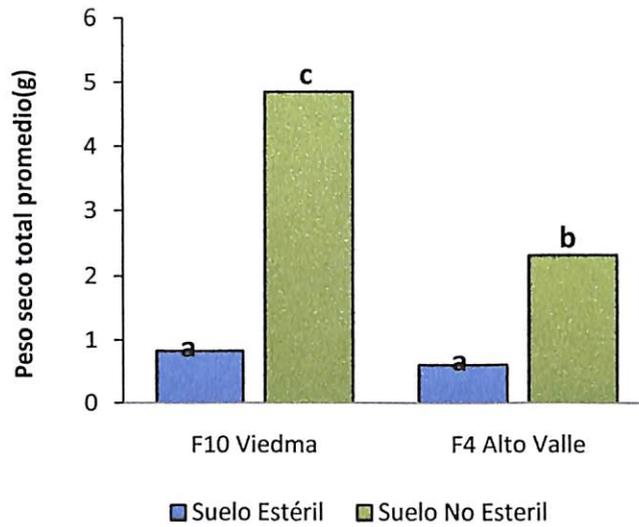


Figura 14 - Peso Seco de todos los plantines que sobrevivieron a los 75 días. Las letras distintas indican las diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$ según test diferencia de medias LSD.

Efecto de la biofumigación sobre el peso fresco promedio de plantín

Esta variable, no mostró un efecto significativo. Se observó una leve tendencia en la que los plantines que crecieron en suelo no estéril registraron un 22% más de peso fresco promedio independientemente del origen de la cepa.

Efecto de la biofumigación sobre el peso seco promedio de plantín

El peso seco promedio mostró una interacción triple entre la condición de esterilidad del suelo, la cepa y la dosis de biofumigante (p -valor= 0,039).

Con **F10**, el único factor significativo fue la condición de esterilidad del suelo. Para cualquier dosis de biofumigante empleada en suelo no estéril, el peso seco promedio registró 2,5 veces mayor que con la aplicación de cualquier dosis de biofumigante en suelo estéril (Figura 15 A).

Los resultados obtenidos para la cepa **F4**, mostraron un efecto significativo de la condición del suelo y la dosis de biofumigante. Cuando se aplicaron residuos de repollo a dosis de 3Kg/m^2 y 6Kg/m^2 en suelo no estéril, el peso promedio de los plantines aumentó un 12,5% y un 75% más respecto al control sin tratar (sin incorporar biofumigante) (Figura 15 B).

Al observar la variación del peso seco promedio de plantín según el aumento de dosis en el suelo estéril, la dosis óptima fue de 3Kg/m^2 , mientras que en el suelo no estéril, la dosis óptima fue de 6Kg/m^2 .

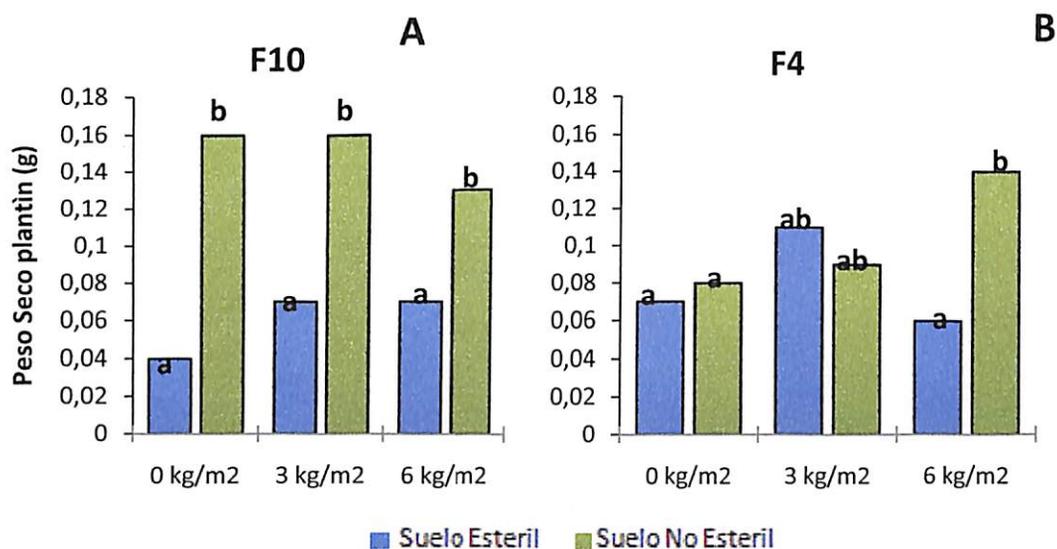


Figura 15- Peso seco por plantín ante la presencia de la cepa F10 (A) y F4 (B). Las letras distintas indican las diferencias significativas en los niveles de cada factor por separado para un $\alpha = 0,05$ según test diferencia de medias LSD.

Efecto de la biofumigación sobre la longitud de hoja de plantín promedio

Esta variable, presentó una interacción triple significativa entre la condición del suelo, la cepa y la dosis. El análisis se realizó por cepa.

Para esta variable, la cepa **F10** (Viedma), nuevamente mostró solo un efecto significativo la condición de suelo. Cuando se incorporó biofumigante en cualquier dosis en suelo no estéril las hojas de los plantines midieron un 12% más respecto a la aplicación de cualquier dosis en suelo estéril (Figura 16).

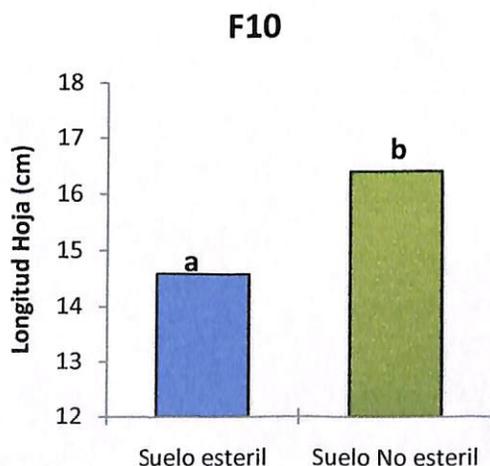


Figura 16 - Longitud de hoja de plantín frente a F10. Las letras distintas indican las diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$, según test diferencia de medias LSD.

Arias, Julian Andrés

Por su parte, en la cepa **F4** se detectó una interacción entre la condición de esterilidad del suelo y la dosis; Cuando se aplicó una dosis de 6 Kg/m² en suelo no estéril, los plantines midieron un 34% más que cuando se aplicó la misma dosis en el suelo estéril. (Figura 17).

La longitud de la hoja promedio en el suelo estéril se redujo, al incrementarse las dosis de residuo de repollo.

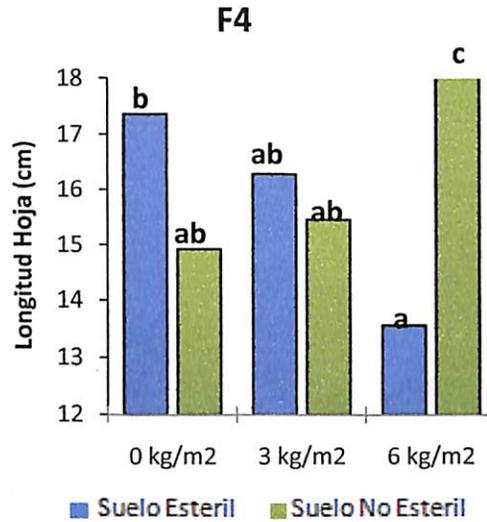


Figura 17- Longitud de hoja de plantín frente a F4. Las letras distintas indican las diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$. según test diferencia de medias LSD.

Efecto de la biofumigación sobre la longitud de raíz de plantín promedio

Se observó un efecto significativo aditivo de la condición de esterilidad del suelo y de la dosis. El análisis se realizó para cada factor por cepa.

F10 mostró como único efecto significativo la condición de esterilidad del suelo. En los tratamientos con suelo no estéril la longitud de raíz de los plantines promedio fue un 12% más larga que en aquellos tratamientos con suelo estéril (Figura 18 A)

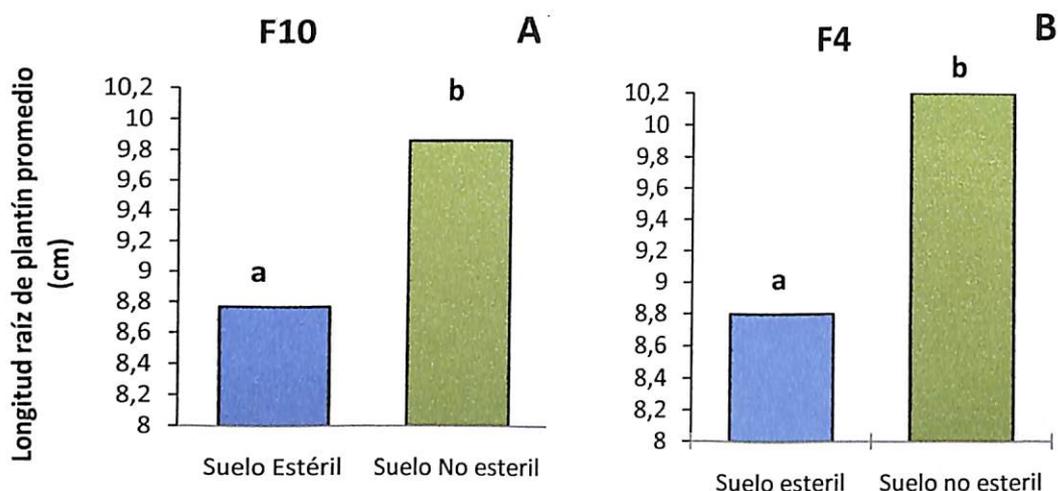


Figura 18 – Longitud de raíz de plantín según condición esterilidad con cepa F10 (A) y con cepa F4 (B). Letras distintas indican las diferencias significativas en los niveles para un $\alpha = 0,05$ según test diferencia de medias LSD.

Para **F4**, los factores dosis y la condición de esterilidad del suelo resultaron significativos. En los tratamientos con suelo no estéril, la longitud promedio de las raíces fue de un 15% más que en aquellos con suelo estéril (Figura 18 B).

Con respecto a las dosis, con 6Kg/m^2 , la longitud de raíz promedio fue un 18,6% de mayor que en la dosis 0Kg/m^2 (Figura 19). Un incremento en las dosis provocó un mayor desarrollo de las raíces.

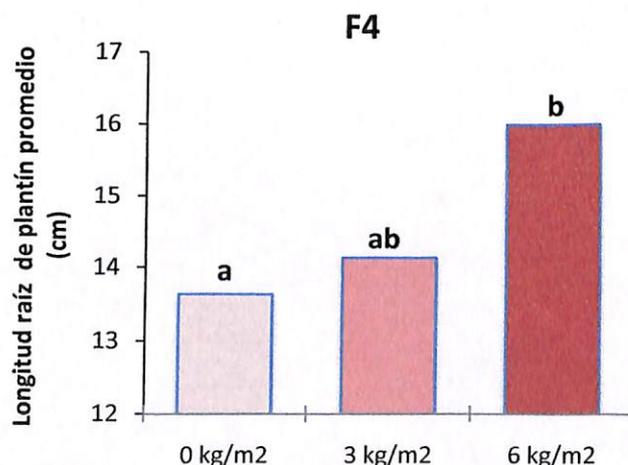


Figura 19 - Longitud de raíz del plantín con la cepa F4 según la dosis. Las letras distintas indican las diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$ según test diferencia de medias LSD.

2.5. DISCUSIÓN

En este capítulo, a través de bioensayos en maceta, se evaluó el efecto de la biofumigación con repollo sobre la emergencia y sobrevivencia de plantines de cebolla considerando, el origen de la cepa patógena, la condición del suelo, la dosis del biofumigante y el estado de humedad del mismo. Tal como se observó en el Capítulo 1, el origen de las cepas mostró una susceptibilidad diferente a la biofumigación. La condición de suelo fue el factor que produjo mayor impacto en la sobrevivencia de los plantines, donde el suelo no estéril biofumigado obtuvo los mejores resultados en cuanto a la calidad a nivel de plantin representado por la obtención de plantas de mayor longitud. El estado de humedad del repollo no fue significativo en las variables analizadas. Respecto a las dosis, las concentraciones mostraron un efecto cuando la condición del suelo fue estéril. Es así, que tal como demuestran nuestros resultados, el proceso de biofumigación es un proceso complejo con la interacción de factores ambientales, bióticos y físicos (Kirkegaard & Sarwar 1998; Brown & Morra, 2005; Gimsing & Kirkegaard, 2009)

La condición de esterilidad del suelo en este trabajo resultó condicionante del proceso de biofumigación. En el suelo no estéril se obtuvieron las mayores tasas de emergencia y sobrevivencia de las plantas de cebolla. Estos resultados, indicarían que la microflora presente en esta condición de suelo podría haber competido por los recursos y evitado la colonización de *F. oxysporum* al momento de la inoculación. Camacho *et al*, (2010), indican que la biofumigación rompe la latencia de propágulos de patógenos, quedando expuestos a competidores por nutrientes y a antagonistas, los cuales impiden que el patógeno tenga oportunidad de producir alguna nueva estructura de resistencia. Asimismo, algunos autores indican que la biofumigación en suelos no estériles, además de producir un efecto de supresión del patógeno producto de la hidrólisis de los GLS, la incorporación del biofumigante (como materia orgánica), produciría un incremento de la microflora antagonista, siendo el efecto de esta última situación más importante que la ocasionada por la toxicidad de los ITC (Omirou *et al*, 2011). En contra parte, en el suelo estéril, la adaptación del hongo patógeno pudo haber sido más rápida al no tener otros microorganismos competidores.

Respecto a las dosis en suelo estéril, 3 Kg/m² de repollo fue la concentración que presentó la mayor emergencia, supervivencia y calidad de plantin. Estos resultados son similares a los obtenidos por Iriarte (2010). Sobre este aspecto varios autores citan los efectos aleloquímicos de las plantas que contienen glucosinatos hacia otras plantas que crecen cerca (Brown & Morra, 2005), o las que son sembradas en suelo que ha sido biofumigado con *Brassica* (Ramirez – Villapudua & Munnecke, 1988). En nuestros estudios, en general, con 6 Kg/m², las variables estudiadas fueron afectadas negativamente. En este sentido, de acuerdo a Mattner *et al*, (2008), la exposición de los productos

Arias, Julian Andrés

volátiles de la biofumigación pueden producir efectos negativos sobre las semillas y las plántulas. Estos autores indican que los efectos observados incluyen retardo o completa inhibición de la germinación de las semillas, reducción del crecimiento de plántulas, daño en raíces y marchitez. Asimismo Camacho *et al*, (2010), mostraron resultados similares e indican que estos efectos fueron registrados durante los 10 a 25 días luego de la biofumigación. A su vez, nuestros resultados pudieron verse afectados por el tamaño de las semillas de cebolla. Petersen *et al*, (2001) reportan que al exponer semillas de malezas de distinto tamaño frente a tejido picado de *B. rapa*, las semillas de menor tamaño registraron mayor sensibilidad a la inhibición de la germinación. El contenido de materia orgánica y arcilla es uno de los principales factores que afectan al destino de los ITC y la emergencia de las semillas. En general, a mayor contenido de materia orgánica, mayor retención de los mismos (Brown & Morra, 1997) (Gimsing & Kirkegaard, 2009). Esto podría explicar porque los efectos fitotóxicos sobre los plantines con suelo no estéril fueron menos notorios que en aquellos tratamientos con suelo esterilizado (En que se degrada la materia orgánica por acción del calor). Asimismo, la microbiota natural pudo haber reducido la disponibilidad de los ITC dado que se ha demostrado que existen microorganismos especializados capaces de degradar los ITC al usarlos como fuente de alimento (Gimsing & Kirkegaard, 2009). Al mismo tiempo el proceso de esterilización puede producir compuestos volátiles fitotóxicos (Armstrong & Armstrong, 1975). Esto se evidenció en las diferencias de la calidad de los plantines, aquellos que crecieron en suelo natural, resultaron en promedio más pesados, con mayor materia seca y mayor desarrollo radicular. Se observó otro efecto beneficioso de la biofumigación como enmienda de materia orgánica, se registró una leve tendencia de aumento peso seco promedio al aumentar la dosis de biofumigante en suelo estéril. Kago *et al* (2013), reportaron que luego de tratar un suelo con tejido de *Brassica oleracea* se observó un contenido significativamente mayor de calcio, potasio, nitrógeno, fósforo, y materia orgánica (con respecto al suelo no tratado) que con la aplicación de otros fumigantes inorgánicos comerciales (Chalim® y MetamSodio). Asimismo, los mismos autores describen que el biofumigante redujo la acidez del suelo mientras que los fumigantes no.

2.6. CONCLUSIONES

La cepa de *Fusarium oxysporum* proveniente de Viedma (F10) fue más susceptible a la biofumigación con repollo que la proveniente de Alto Valle (F4) cuando se inocularon en una concentración de $3,3 \times 10^2$ conidios/gramo de suelo.

La condición del suelo fue el factor más determinante en la emergencia, sobrevivencia y calidad cuantitativa y cualitativa de los plantines de cebolla, siendo el suelo no estéril el más favorable.

“Biofumigación con Brassica, una alternativa agroecológica para el control de Fusarium oxysporum en almácigos de cebolla”

Arias, Julian Andrés

La dosis más efectiva frente a *F. oxysporum* fue de 3 Kg/m² de biofumigante en el suelo. La dosis de 6 Kg/m² afectó significativamente la emergencia, ocasionando un retraso en la germinación de las semillas.

El estado de humedad del biofumigante en la aplicación no tuvo efecto sobre el rendimiento cuanti y cualitativo de los almácigos.

La aplicación del repollo como biofumigante produce plantines con mayor masa vegetal.

Los resultados de este estudio, indican que la condición mas óptima para la biofumigación con residuos de cosecha de repollo, aplicados en condiciones naturales de suelo, reduciría la incidencia de *Fusarium oxysporum* en almácigos de cebolla. Sería recomendable realizar más estudios en la temática en suelos históricamente con problemas de *este patógeno*, dado que la estructura microbiana característica de cada suelo, podría presentar otra dinámica y por ende la respuesta de la biofumigación podría ser distinta.

CONSIDERACIONES FINALES

Arias, Julian Andrés

La enfermedad causada por *F. oxysporum* disminuye los rendimientos y el valor comercial de la producción. Estas pérdidas conllevan a un aumento de los costos, reduciendo de esta manera las ganancias de los productores. Además comprometen la sustentabilidad del sistema productivo, particularmente del recurso suelo. Sin dejar de tener en cuenta la necesidad cada vez mayor de aumentar la producción alimentaria, se deben priorizar técnicas que sean amigables con el ambiente, eficaces y económicamente viables. La revisión bibliográfica permitió establecer un marco conceptual para comprender los principios básicos de la biofumigación y de la necesidad ambiental del desarrollo de alternativas al Bromuro de Metilo.

Los resultados de los ensayos *in vitro*, determinaron la selección de los residuos de repollo como biofumigante para probar el efecto en almácigos de cebolla. El mismo se destacó entre el brócoli y el coliflor por su mayor poder de inhibición del crecimiento micelial de las dos cepas de *F. oxysporum* aisladas en la zona del Alto Valle y Viedma. Esto no implica necesariamente que las otras dos especies de *Brassicas* no tengan potencial de inhibición frente a otros patógenos de suelo, sino que bajo las condiciones ensayadas y ante la presencia de las dos cepas, la biofumigación con esos residuos no resultó eficaz. El efecto sobre el crecimiento micelial fue fungistático y no fungitóxicos.

La efectividad de la biofumigación con los residuos de repollo en almácigos de cebolla, fue determinada por los factores que afectan al proceso:

- La condición de esterilidad del suelo fue uno de los principales factores que afectó la emergencia, sobrevida y la calidad de los plantines.
- La dosis más efectiva fue de 3 Kg/m² de repollo en el suelo. La incorporación de 6Kg/m² produjo efectos negativos en la emergencia y sobrevida de los plantines.
- Bajo las condiciones de los ensayos el estado de humedad del material biofumigante no presentó ningún efecto.

Esta alternativa es relativamente nueva y nuestros resultados indican que es prometedora. Sin embargo, dada la complejidad del método y del agroecosistema serían necesarios mayores estudios de la temática para establecer la eficacia real en nuestras condiciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Abera, M., Ahmed, S., Fininsa, C., Sakhuja, P. K., & Alemayehu, G. (2011). Effect of *Brassica carinata* (L.) biofumigants (seed meal) on chickpea wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*), growth, yield and yield component in Ethiopia. *Phytopathology & Plant Protección*, 44, 1785-1795.
- Armstrong, G. M., & Armstrong, J. K. (1975). Reflections on the wilt fusaria. *Annual Revision phytophology*(13), 95-103.
- Bello, A., López-Pérez, J. A., & Díaz Viruliche, L. (1997). *Biofumigación y Solarización como alternativas al Bromuro de Metilo*. Departamento de Agroecología-CCMA-CSIC, Madrid.
- Bello, A., López-Pérez, J. A., & Garcia Alvarez, A. (2003). *Biofumigación en agricultura extensiva de regadio*. España: Mundi-Prensa. 670p
- Bello, A., López-Pérez, J. A., Diez-Rojo, M. A., López-Cepero, J., & García-Álvarez, A. (2008). Principios ecológicos en la gestión de los agrosistemas. *ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura*(729), 19-29.
- Bellostas, N., Sorensen, J. C., & Sorensen, H. (2004). Qualitative and quantitative evaluation of glucosinolates in cruciferous plants during their life cycles. *Agroindustria*, 5-10.
- Brown, J. D., & Morra, M. J. (2005). *Glucosinolate-containing seed meal as a soil amendment to control plant pests*. University of Idaho, National Renewable Energy Laboratory. Moscow: U.S Department of Energy. 95p
- Brown, P. D., & Morra, M. J. (1997). Control of Soil-Borne Plant Pest Using Glucosinolate-Containing Plants. *Advances in Agronomy*, 167-231.
- Camacho, B., Pineda, J., & Gonzales, H. (Abril de 2010). Uso de enmiendas orgánicas para el control de enfermedades en cultivos agrícolas. *INIA Divulga - Conservación fertilidad y enmienda de suelos*, 9-12.
- CASAFE. (2013). *Guía de Productos Fitosanitarios* (16º ed.). Argentina: CASAFE. 1185p
- Cortés Arias, M. M. (2011). Análisis y comparación de los glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (*Tropaeolum tuberosum*) para evaluar su uso potencial en el control del patogeno de la papa *Spongospora subterranea*. Tesis Magister en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Químicas, Bogotá. 104p

Arias, Julian Andrés

- Curcio, N. (2007). Cebolla: Perfiles Productivos *Dirección Nacional de Alimentos. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos*. Recuperado el Octubre de 2014, de http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_38/cadenas/Hortalizas_cebolla.html
- Fan, C. M., Xiong, G. R., Qi, P., Ji, G. H., & He, Q. Y. (2008). Potential biofumigation effects of Brassica oleracea var. caulorapa on Growth of Fungi. *Journal of Phytopathology*(156), 321-325.
- FRAC (Fungicide Resistance Action Comitte). (2013). *FRAC Cod. list: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC cod numbering)*.
- FunBaPa. (2014). *Anuario Estadístico 2.013- Egresos de cebolla en fresco fuera de la Región Patagónica Protegida*. Recuperado el 27 de Marzo de 2014, de <http://www.funbapa.org.ar/wp-content/uploads/2014/01/Anuario-Cebolla-2013.pdf>
- Galmarini, C. R. (Ed.). (1997). *Manual del Cultivo de la Cebolla*. Argentina: editar. 128p.
- Garcés de Granada, E., Orozco de Amezquita, M., Bautista, R. G., & Valencia, H. (2001). Fusarium oxysporum el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6(1), 7-25.
- Gimsing, A. L., & Kirkegaard, J. A. (2009). Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Review*, 8, 299-310.
- Infantino, A., Santori, A., Mocali, S., & Lazzeri, L. (2011). Use of Biofumigation for the control of soilborne fungal diseases in Italy. *Symposium of Biofumigation and pesticides*, (pág. 22). Saskatoon.
- International Seed Testing Association (ISTA). (2015). *International rules for seed testing*. Bassersdorf: The International Seed Testing Association (ISTA)
- Iriarte, L. E. (2010). *Biofumigación con Brassica oleracea para disminuir el daño de Fusarium oxysporum en almácigos de cebolla*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional del Cuyo.65p.
- Iriarte, L. E., Sosa, M. C., & Reybet, G. E. (2011). Efecto de la biofumigación con repollo sobre el control de Fusarium oxysporum. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 37(3), 231-237.
- Kago, E. K., Kinyua, Z. K., Okemo, P. O., & Maingi, J. M. (2014). Effects of cabbage tissue and calcium hypochlorite on soil fertility and yields of

Arias, Julian Andrés

selected solanaceous crops. *Annual Research & Review in Biology*, 547-559.

- Kago, E. K., Kinyua, Z. M., Okemo, P. O., & Maingi, J. M. (2013). Efficacy of brassica tissue and chalm (TM) on control of plant parasitic nematodes. *Journal of Biology*, 1(1), 32-38.
- Kaur, R., Rampal, G., & Pal Vig, A. (2011). Evaluation of antifungal and antioxidative potential of hydrolytic products of glucosinolates from some members of *Brassicaceae* family. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 3(10), 218-228.
- Kiehr, M., & Delhey, R. (2007). Estrategias para el manejo de enfermedades de cebolla en el sur Argentino. *Agro UNS*, IV(7), 5-10.
- Kirkegaard, J. A. (2004). Evaluating biofumigation for soil-borne disease management in tropical vegetables production. ACIAR Review report. 30 p.
- Kirkegaard, J. A., & Sarwar, M. (1998). Biofumigation potential of brassicas. *Plant and Soil*(201), 71-89.
- Kirkegaard, J. A., Angus, J. F., Gardner, P. A., & Cresswell, H. P. (1993). Benefits of Brassica break crops in the southeast wheat belt. *Proceedings of the 7th Australian agronomy conference*, 282 -285.
- Kirkegaard, J. A., Wong, P. T., & Desmarchelier, J. M. (1996). In vitro suppression of fungal root pathogens of cereals by Brassica tissues. *Plant Pathology*, 593-603.
- Kushad, M. M., Cloyd, R., & Babadoost, M. (2004). Distribution of glucosinolates in ornamental cabbage and kale cultivar. *Scientia Horticulturae*, 101(3), 215-221.
- Larkin, R. P., & Griffin, T. S. (2007). Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures. *Crop Protection* , 1067-1077.
- Lazzeri, L., Leoni, O., & Manici, L. M. (2004). Biocidal plant dried pellets for biofumigation. *Industrial Crops and Products*, 59-65.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (Primera Edición ed.). Ames, Iowa, E.E.U.U: Blackwell Publishing. 388 p.
- Lu, P., Gilardi, G., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2010). Biofumigation with Brassica plant and its effect on the inoculum potential of Fusarium yellows of Brassica crops. *European Journal of Plant Pathology*(126), 387-402.

Arias, Julian Andrés

- Mattner, S. W., Porter, I. J., Gounder, R. K., Shanks, A. L., Wren, D. J., & Allen, D. (2008). Factors that impact on the ability of biofumigants to suppress fungal pathogens and weeds of strawberry. *Crop Protection*, 1165–1173.
- Morra, J. M., & Kirkegaard, J. A. (2002). Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil biology & Biochemistry*, 34(11), 1683-1690.
- Omirou, M., Rousidou, C., Bekris, F., Papadopoulou, K. K., Menkissoglou-Spiroudi, U., Ehaliotis, C., & Karpouzas, D. G. (2011). The Impact of Biofumigation and Chemical Fumigation Methods on the Structure and Function of the Soil Microbial Community. *Microbiological Ecology*(61), 201-213.
- Ortega-Centeno, S., Guillén-Sánchez, D., Ramos-García, M., Troncoso-Rojas, R., Villanueva-Arce, R., Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños, S. (2010). Métodos de inoculación y evaluación de extractos botánicos e isotiocianatos de la familia *Brassicaceae* en el control de la roya del gladiolo. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 16(1), 13-21.
- Pellejo, G., Pozzo Ardizzi, C., Ashkar, G., & Lui, P. (2004). Efecto de dos modalidades de acondicionamiento de cebollas conservadas en el campo sobre el desarrollo de *Aspergillus niger* en postcosecha. *Revista Pilken*, VI(6). pag 7
- Petersen, J., Belz, R., Walker, F., & Hurle, K. (2001). Weed suppression by release of isothiocyanates from turnip-rape mulch. *Agronomy Journal*, 37-43.
- 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 Organism. *Phytopathology*(78), 289-295.
- Riches, D., Villalta, O. N., Wite, D., Kirkegaard, J., Mattner, S. W., Scoble, C., . . . Porter, I. J. (2011). In vitro antifungal activity of volatiles from biofumigant brassicas against soilborne pathogens of vegetables. *Biofumigation & Pesticides Symposium* , 69.
- Romero, F. (2004). *Manejo Integrado de Plagas: Las bases , los conceptos su mercantilización*. Tezcoco. 103p
- RUIZ, C., VEGA, M., & ZANETTA, V. (2004). *Situación Hortícola Regional*. Ministerio de Producción y Turismo, Neuquén. pag 27-28
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. (17 de 2 de 2006). Resolución 77. Buenos Aires, Argentina.

Arias, Julian Andrés

- SENASA. (2003). *Resolución N°256/2003*. Recuperado Octubre 2015 en <https://viejaweb.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1033&io=4379>
- SENASA. (2005). *Resolución 803/2005*: Recuperado Octubre 2015 en <https://viejaweb.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1030&io=1607>
- Smolinska, U., Morra, M. J., & James, M. J. (2003). Isothiocyanates produced by *Brassicaceae* Species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease*, 87(4), 407-412.
- Stoin, D., Pirsan, P., Radu, F., Poiana, M. A., Ersilia, A., & Dogaru, D. (2009). Studies regarding the myrosinase enzymatic activity from black mustard (*Brassica Nigra*) seed. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7(1), 44-47.
- Szczyglowska, M., Piekarska, A., Konieczka, P., & Namiesnik, J. (2011). Use of Brassica plants in the phytoremediation and biofumigation processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 7760-7771.
- Troncoso - Rojas, R., Espinoza, C., Sánchez - Estrada, A., García, H. S., Pryor, B., Baez - Flores, M. E., & Tiznado - Hernández, M. E. (2008). Evaluation of isothiocyanates to control postharvest fruit and vegetable losses by fungal infections in Mexico. *3rd International Biofumigation Symposium*, (pág. 20). Canberra.
- Valdez, J. G., Makuch, M. A., & Marini, G. V. (2004). Patogenicidad de aislamientos de *Fusarium* spp. en plantulas de cebolla (*Allium cepa* L.). *VI REUNION CIENTÍFICA DE LA CEBOLLA DEL MERCOSUR*, (pág. 7). Villa de Merlo (SAN LUIS).
- 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*, 106-115.
- Van Konijnenburg, A. (2009). Cebolla. *Fruticultura & Diversificación*, 59, 9-13.
- Wentzell, A. M., & Kliebenstein, D. J. (2008). Genotype, age, tissue and environment regulate the structural outcome of glucosinolate activation. *Plant Physiology*, 147, 415-428.
- Wilson, A. E., Bergaentzle, M., Bindler, F., Marchioni, E., Lintz, A., & Ennahar, S. (2013). In vitro efficacies of various isothiocyanates from cruciferous vegetables as antimicrobial agents against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, 318-324.

"Biofumigación con Brassica, una alternativa agroecológica para el control de Fusarium oxysporum en almácigos de cebolla"

Arias, Julian Andrés

Zasada, I. A., Ferris, H., Elmore, C. L., Roncoroni, J. A., MacDonald, J. D., Bolkan, L. R., & Yakabe, L. E. (2003). Field application of brassicaceous amendments for control of soilborne pests and pathogens. *Plant Health Progress - online- doi:10.1094/PHP-2003-1120-01-RS*.

Zukalová, H., Vasak, J., Nerad, D., & Strane, P. (2002). The role of glucosinolates of Brassica genus in the crop system. *ROSTLINNÁ VÝROBA (Crop Production)*, 48(4), 181-189.

ANEXOS

ANEXO A

MODELO ESTADÍSTICO PARA EL CRECIMIENTO MICELIAR

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + \tau_i + \beta_j + \alpha_k + \gamma_l + \tau * \beta_{ij} + \tau * \alpha_{ik} + \tau * \gamma_{il} + \beta * \alpha_{jk} + \beta * \gamma_{kl} \\ + \tau * \beta * \alpha_{ijk} + \tau * \beta * \gamma_{ijl} + \tau * \alpha * \gamma_{ijl} + \beta * \alpha * \gamma_{jkl} \\ + \tau * \beta * \alpha * \gamma_{ijkl} + \varepsilon_{ijklm}$$

Donde:

Y_{ijklm} = Variable respuesta. Crecimiento micelial promedio (en milímetros).

μ = Media general.

τ_i = Efecto de la i -ésima cepa de *F. oxysporum* (j = "F4" LJC10463 de Alto Valle; "F10" LCJ 10466 de Viedma)

β_j = Efecto del j -ésimo tipo de biofumigante (i = Repollo; Brócoli; Coliflor; Testigo)

α_k = Efecto del k -ésimo estado de humedad del biofumigante (k =Fresco; seco)

γ_l = Efecto del l -ésimo tiempo de exposición. (l = 48 h; 92 h)

$\tau * \beta_{ij}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum* y del j -ésimo tipo de biofumigante.

$\tau * \alpha_{ik}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum* y del k -ésimo estado de humedad del biofumigante

$\beta * \alpha_{jk}$ = Efecto del j -ésimo tipo de biofumigante y del k -ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\beta * \gamma_{kl}$ = Efecto del j -ésimo tipo de biofumigante y del l -ésimo tiempo de exposición.

$\tau * \beta * \alpha_{ijk}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum*, del j -ésimo tipo de biofumigante y del k -ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\tau * \beta * \gamma_{ijl}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum*, del j -ésimo tipo de biofumigante y del l -ésimo tiempo de exposición.

$\tau * \alpha * \gamma_{ijl}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum*, del k -ésimo estado de humedad del biofumigante y del l -ésimo tiempo de exposición.

$\beta * \alpha * \gamma_{jkl}$ = Efecto del j -ésimo tipo de biofumigante, del k -ésimo estado de humedad del biofumigante y del l -ésimo tiempo de exposición.

“Biofumigación con Brassica, una alternativa agroecológica para el control de Fusarium oxysporum en almácigos de cebolla”

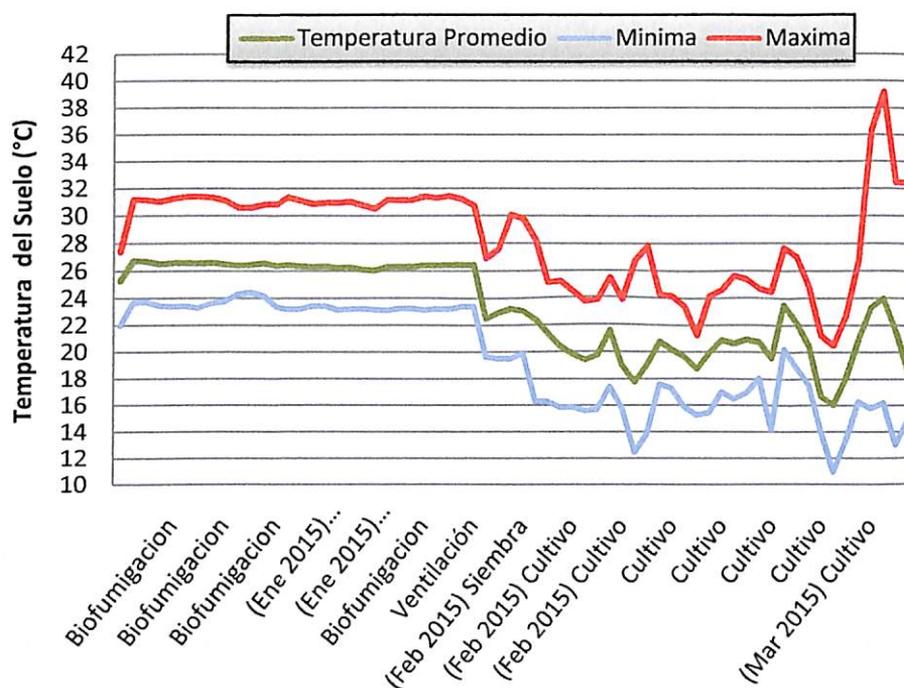
Arias, Julian Andrés

$\tau * \beta * \alpha * \gamma_{ijkl}$ = Efecto de la interacción de la i-ésima cepa de *F. oxysporum*, del j-ésimo tipo de biofumigante, del k-ésimo estado de humedad del biofumigante y del l-ésimo tiempo de exposición.

ε_{ijklm} = Error aleatorio para el m-ésimo caja de petri de la i-ésima cepa de *F. oxysporum*, del j-ésimo tipo de biofumigante con el k-ésimo estado de humedad del biofumigante.

ANEXO B

Temperaturas del suelo registradas durante el ensayo *in vivo*



ANEXO C

Resultados resumidos del análisis del suelo utilizado en el ensayo. Se extrajeron dos muestras.

Muestra	1	2
Textura	Franco limosa	Franco limosa
pH (pasta)	7.51	7.57
Conductividad (dS/m)	1.74	1.83
Materia orgánica %	3.66	3.64
Carbono orgánico %	2.1	2.1
Sales solubles (meq/l)		
(ext. Saturación)	Cationes	
	Na ⁺	4.2
	Ca ⁺⁺ + Mg ⁺⁺	16.0
RAS	1.5	1.8

ANEXO D

Autovectores (coordenadas) de las variables en cada eje *

Variable	Eje X	Eje Y
% Emergencia a 14 días	-0,183713	0,500628
Sobrevida a los 75 días	-0,335312	0,383598
Peso Húmedo Total	-0,376344	0,291208
Peso Seco Total	-0,360636	0,281569
Peso Húmedo Promedio	-0,301500	-0,454020
Peso Seco Promedio	-0,370660	-0,048037
Longitud Tallo Promedio	-0,327614	-0,332475
Longitud Raíz Promedio	-0,336413	-0,180107

*Se adoptó como criterio de significancia: Autovector variable significativa \geq |Mayor autovector| $\times 2/3$

Modelo estadístico emergencia a los 14 días

Para el análisis estadístico de la variable en cuestión se utilizó el siguiente modelo:

$$\begin{aligned}
 Y_{ijklm} = & \mu + \tau_i + \beta_j + \alpha_k + \gamma_l + \tau * \beta_{ij} + \tau * \alpha_{ik} + \tau * \gamma_{il} + \beta * \alpha_{jk} + \beta * \gamma_{kl} \\
 & + \tau * \beta * \alpha_{ijk} + \tau * \beta * \gamma_{ijl} + \tau * \alpha * \gamma_{ijl} + \beta * \alpha * \gamma_{jkl} \\
 & + \tau * \beta * \alpha * \gamma_{ijkl} + \varepsilon_{ijklm}
 \end{aligned}$$

Donde:

Z_{ijklm} =Variable respuesta. Porcentaje de plántulas Emergidas a los 14 días desde la siembra.

μ = Media general.

τ_i = Efecto de la i-ésima cepa de *F. oxysporum* (j= "F4" LJC10463 de Alto Valle; "F10" LCJ 10466 de Viedma).

β_j = Efecto de la j-ésima condición de esterilidad del suelo (i= estéril; no estéril).

α_k = Efecto de la k-ésima dosis del biofumigante (k=0Kg/m2; 3 Kg/m2; 6 Kg/m2)

γ_l = Efecto del l-ésimo estado de humedad del biofumigante. (l= fresco; seco)

Arias, Julian Andrés

$\tau * \beta_{ij}$ = Efecto de la interacción de la i-ésima cepa de *F. oxysporum* y de la j-ésima condición de esterilidad del suelo.

$\tau * \alpha_{ik}$ = Efecto de la interacción de la i-ésima cepa de *F. oxysporum* y de la k-ésima dosis del biofumigante.

$\tau * \gamma_{il}$ = Efecto de la interacción de la i-ésima cepa de *F. oxysporum* y del l-ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\beta * \alpha_{jk}$ = Efecto de la j-ésima condición de esterilidad del suelo y de la k-ésima dosis de humedad del biofumigante.

$\beta * \gamma_{jl}$ = Efecto de la j-ésima condición de esterilidad del suelo y del l-ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\tau * \beta * \alpha_{ijk}$ = Efecto de la interacción de la i-ésima cepa de *F. oxysporum*, de la j-ésima condición de esterilidad del suelo y de la k-ésima dosis del biofumigante.

$\tau * \beta * \gamma_{ijl}$ = Efecto de la interacción de la i-ésima cepa de *F. oxysporum*, de la j-ésima condición de esterilidad del suelo y del l-ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\tau * \alpha * \gamma_{ijk}$ = Efecto de la interacción de la i-ésima cepa de *F. oxysporum*, de la k-ésima dosis del biofumigante y del l-ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\beta * \alpha * \gamma_{jkl}$ = Efecto de la j-ésima condición de esterilidad del suelo, de la k-ésima dosis del biofumigante y del l-ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\tau * \beta * \alpha * \gamma_{ijkl}$ = Efecto de la interacción de la i-ésima cepa de *F. oxysporum*, de la j-ésima condición de esterilidad del suelo, de la k-ésima dosis del biofumigante y del l-ésimo estado de humedad del biofumigante.

ε_{ijklm} = Error aleatorio para el m-ésimo caja de Petri de la i-ésima cepa de *F. oxysporum*, del j-ésimo tipo de biofumigante con el k-ésimo estado de humedad del biofumigante.

Modelo estadístico sobrevida relativa a los 75 días.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el siguiente modelo:

$$\begin{aligned} Z_{ijklm} = & \mu + \tau_i + \beta_j + \alpha_k + \gamma_l + \tau * \beta_{ij} + \tau * \alpha_{ik} + \tau * \gamma_{il} + \beta * \alpha_{jk} + \beta * \gamma_{kl} \\ & + \tau * \beta * \alpha_{ijk} + \tau * \beta * \gamma_{ijl} + \tau * \alpha * \gamma_{ijl} + \beta * \alpha * \gamma_{jkl} \\ & + \tau * \beta * \alpha * \gamma_{ijkl} + \varepsilon_{ijklm} \end{aligned}$$

Donde:

Z_{ijklm} = Variable respuesta. Supervivencia relativa de los plantines (porcentual) a los 75 días de siembra.

μ = Media general.

τ_i = Efecto de la i -ésima cepa de *F. oxysporum* (j = “F4” LJC10463 de Alto Valle; “F10” LCJ 10466 de Viedma).

β_j = Efecto de la j -ésima condición de esterilidad del suelo (i = estéril; no estéril).

α_k = Efecto de la k -ésima dosis del biofumigante (k =0Kg/m²; 3 Kg/m²; 6 Kg/m²)

γ_l = Efecto del l -ésimo estado de humedad del biofumigante. (l = fresco; seco)

$\tau * \beta_{ij}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum* y de la j -ésima condición de esterilidad del suelo.

$\tau * \alpha_{ik}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum* y de la k -ésima dosis del biofumigante.

$\tau * \gamma_{il}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum* y del l -ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\beta * \alpha_{jk}$ = Efecto de la j -ésima condición de esterilidad del suelo y de la k -ésima dosis de humedad del biofumigante.

$\beta * \gamma_{jl}$ = Efecto de la j -ésima condición de esterilidad del suelo y del l -ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\tau * \beta * \alpha_{ijk}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum*, de la j -ésima condición de esterilidad del suelo y de la k -ésima dosis del biofumigante.

$\tau * \beta * \gamma_{ijl}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum*, de la j -ésima condición de esterilidad del suelo y del l -ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\tau * \alpha * \gamma_{ijk}$ = Efecto de la interacción de la i -ésima cepa de *F. oxysporum*, de la k -ésima dosis del biofumigante y del l -ésimo estado de humedad del biofumigante.

$\beta * \alpha * \gamma_{jkl}$ = Efecto de la j -ésima condición de esterilidad del suelo, de la k -ésima dosis del biofumigante y del l -ésimo estado de humedad del biofumigante.

Arias, Julian Andrés

$\tau * \beta * \alpha * \gamma_{ijkl}$ = Efecto de la interacción de la i-ésima cepa de *F. oxysporum*, de la j-ésima condición de esterilidad del suelo, de la k-ésima dosis del biofumigante y del l-ésimo estado de humedad del biofumigante.

ε_{ijklm} = Error aleatorio para el m-ésimo caja de Petri de la i-ésima cepa de *F. oxysporum*, del j-ésimo tipo de biofumigante con el k-ésimo estado de humedad del biofumigante.

Modelos lineales generalizados estadísticamente significativos

Modelo emergencia 14 días de F10 Viedma: ($\eta = -1,139 - 0,4233 \text{Dosis} + 6 \text{Kg/m}^2$)

Modelo emergencia 14 días de F4 Alto Valle: ($\eta = -0,0535 + 1,56969 \text{NoEstéril}$)

Modelo Sobrevida plantines Para F10 Viedma:

$\eta = -0,5223 + 1,98 \text{NoEstéril}$

Modelo Sobrevida plantines Para F4 Alto Valle:

Dosis 0 Kg/m² en Estéril vs no estéril ($\eta = -3,1499 + 4,3259 \text{NoEsteril}$, p-valor < 0,01)

Dosis 6 Kg /m² suelo estéril vs no estéril ($\eta = -1,7636 + 1,8497 \text{NoEsteril}$, p-valor < 0,05).