



Universidad  
Politécnica  
de Cartagena

**Máster Universitario en  
Técnicas Avanzadas en Investigación y  
Desarrollo Agrario y Alimentario**

**EFECTO DE LA BIOSOLARIZACIÓN CON PELLETS DE *Brassica carinata* Y ESTIÉRCOL FRESCO DE OVINO SOBRE LA CAPACIDAD INFECTIVA Y SOBRE LA VIABILIDAD DE OOSPORAS DE *Phytophthora capsici***

**Alumna: Ana Hernández Piñera**

**Directora: Dra. Josefina Contreras Gallego**

**Codirector: Dr. Alfredo Lacasa Plasencia**

Cartagena, Septiembre de 2011

## RESUMEN

El cultivo del pimiento es de gran importancia en la Región de Murcia.

*Phytophthora capsici* es responsable de importantes pérdidas económicas en las explotaciones de pimiento de la Región de Murcia al ser el causante de la enfermedad conocida como la “Tristeza” o “Seca” del pimiento. Las oosporas son su principal propágulo de supervivencia en el suelo y sus órganos más termotolerantes.

La biosolarización ejerce un control sobre *P. capsici*. Es un método respetuoso con el medio ambiente, reconocido como alternativa al bromuro de metilo por el “Methyl Bromide Technical Committee”. Se han probado multitud de enmiendas orgánicas, y muchos autores coinciden en que la efectividad se debe a las características de la enmienda orgánica utilizada, a las características del suelo, y la patogenicidad de la población en el caso de *P. capsici*. La eficacia de la biosolarización también varía dependiendo de la época del año en que se realice, ya que son necesarias temperaturas elevadas. Los mejores resultados en la Región de Murcia se obtienen en el mes de agosto, suponiendo esto pérdidas económicas por la reducción del periodo del cultivo.

Por otra parte, la región del Campo de Cartagena está declarada zona vulnerable a la contaminación por nitratos, lo que reduce las posibilidades de uso de estiércol como enmienda orgánica, siéndole necesario en este caso el aporte de otro tipo de enmiendas para llevar a cabo la biosolarización.

La combinación de temperaturas subletales con enmiendas orgánicas puede realizar un control de la enfermedad en regiones con condiciones climáticas adecuadas y calendarios de cultivo que no se ajusten a los calendarios normales de solarización.

La eficacia de la biosolarización en la Región de Murcia ha sido evaluada hasta la fecha sobre la reducción de la incidencia de la enfermedad a lo largo del cultivo.

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de 6 semanas de biosolarización con pellets de *Brassica carinata*, solos o combinados con estiércol fresco de ovino, en diferentes fechas, en particular en el mes de octubre, fecha más próxima al final del ciclo de cultivo del pimiento en el

Campo de Cartagena, sobre la viabilidad y sobre la capacidad infectiva de oosporas de *Phytophthora capsici*.

La eficacia de la biosolarización depende de la enmienda biofumigante que se utilice, de la fecha de aplicación de la desinfección y de la profundidad a la que se encuentre el inóculo.

La efectividad de la biosolarización en agosto fue total para los 2 parámetros de supervivencia estudiados, para las 2 enmiendas y para el rango de profundidad ensayado.

En octubre, la biosolarización con pellets de *Brassica carinata* presenta ciertas deficiencias. El suplemento de la enmienda anterior con estiércol fresco de ovino, parece que las atenúa.

**PALABRAS CLAVES:** *Capsicum annum*, tristeza del pimiento, inóculo, desinfección, enmienda orgánica, Región de Murcia.

## INTRODUCCIÓN

### Importancia del cultivo de pimiento en la Región de Murcia

España es el mayor productor de Europa de pimiento (*Capsicum annum*) en invernadero para el mercadeo en fresco. En la Región de Murcia el cultivo ocupa 1.379 ha de invernaderos (Estadística Agraria de la Región de Murcia, 2010). Se trata de un cultivo con gran tradición y vocación entre los cultivadores de la zona, llegando a ser un monocultivo en más del 95 % de la superficie, aunque en la actualidad ha aumentado la superficie en la que se realizan rotaciones con cucurbitáceas. En la mayor parte de la superficie se cultivan variedades tipo California frente a las tradicionales de pimientos del tipo Lamuyo.

El cultivo comienza en noviembre-diciembre, alargándose hasta septiembre-octubre. La recolección se inicia a finales de marzo.

### Principales problemas fitopatológicos. *Phytophthora spp.* factor limitante del cultivo en los invernaderos.

En la mayor parte de los invernaderos, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica* y *Meloidogyne incognita* ocasionan los principales problemas de suelo, Tello y Lacasa (1997), unidos a los problemas de “fatiga” ocasionados por la reiteración del monocultivo.

*P. capsici* es responsable de importantes pérdidas económicas en las explotaciones de pimiento de la Región de Murcia (Tello y Lacasa, 1997), al ser el causante de la enfermedad conocida como la “Tristeza” o “Seca” del pimiento. *P. capsici* se reproduce sexualmente a través de oosporas, propágulos que poseen una alta capacidad de supervivencia en ausencia del hospedador, por lo que actúan como principal fuente de inóculo en el suelo (Fernández-Pavía *et al.* 2004). Las oosporas son los órganos más termotolerantes, llegando a sobrevivir 30 minutos a 50 °C (Bollen 1985; cf. Coelho *et al.*, 1999).

## Métodos de control de *Phytophthora sp*

Desde el descubrimiento de *P. capsici* como organismo causante de la “tristeza” o “seca” del pimiento en 1977, se han estudiado multitud de técnicas de control. En un primer momento se optó por la utilización de productos químicos, como el metan sodio, el metalaxil o el bromuro de metilo (BM), algunos de estos productos en desuso en la actualidad por diferentes motivos, bien por falta de eficacia, bien por prohibición de uso por efectos nocivos sobre el medio ambiente o sobre la salud de los usuarios.

La desinfección de los suelos agrícolas trata de eliminar o disminuir la población de patógenos telúricos. Desde 1985 hasta el año 2005 en la Región de Murcia se utilizaba habitualmente como desinfectante el bromuro de metilo (Guirao *et al.*, 2004), hasta su prohibición de uso por ser causante directo de la destrucción de la capa de ozono (USEPA 2005). Tras su prohibición total de uso en el año 2005, este desinfectante total del suelo fue sustituido por la mezcla de 1,3 dicloropropeno y cloropicrina, tan eficaz como el BM en el control de este patógeno de suelo (Guerrero *et al.*, 2004). A finales de 2009 el 1,3-dicloropropeno fue suprimido del listado de productos autorizados en la Unión Europea, siendo actualmente autorizado temporalmente por periodos de 120 días como uso excepcional al no disponerse de una alternativa para su supresión definitiva.

Las alternativas no químicas han adquirido una gran importancia. La biofumigación y la solarización han sido aceptadas como alternativas no químicas al BM por el Methyl Bromide Technical Committee.

La **solarización** es un proceso natural de desinfección hidrotermal del suelo que se produce por el calentamiento del suelo húmedo, facilitado por el recubrimiento del mismo con una envoltura plástica que retiene la radiación solar, hasta niveles letales para los patógenos y parásitos telúricos (36-50°C) (Katan, 1981). La eficacia de este método de desinfección depende de la profundidad, deja de ser efectivo a partir de 30cm (Lacasa *et al.* 2004).

La **biofumigación** es un proceso de desinfección basado en la acción de sustancias volátiles producidas en la biodegradación de las diferentes

enmiendas orgánicas que se incorporan al suelo, para el control de los patógenos vegetales presentes en el mismo (Bello *et al.*, 2002). Al mismo tiempo se mejoran las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo. (Stapleton 2000; Gamliel *et al.* 2000).

Se denominó inicialmente “biological fumigation” (Kirkegaard *et al.*, 1993a) y posteriormente “biofumigation” (Kirkegaard *et al.*, 1993b; Matthiessen y Kirkegaard, 1993; Agnus *et al.*, 1994), refiriéndose a la acción de cultivos utilizados como abono verde sobre los patógenos y parásitos que colonizan el suelo, como las brasicas (Kirkegaard y Sarwar, 1998).

Se han probado multitud de enmiendas orgánicas, y muchos autores coinciden en que la efectividad se debe a las características de la enmienda orgánica utilizada, a las características del suelo, y la densidad de la población del patógeno en el caso de *P. capsici* (Bowers y Mitchell, 1991; Bartual *et al.*, 1991).

La **biosolarización** es la combinación de las 2 técnicas anteriores, es un proceso de desinfección basado en el uso de una cubierta plástica y diferentes enmiendas orgánicas que incrementan la eficacia de la solarización, la cual varía dependiendo de la época en la que se realice. Se diferencia de la solarización en que las necesidades térmicas para ser efectiva son menores, aspecto muy importante para ajustar estos métodos a diferentes calendarios y zonas de cultivo (Bello *et al.*, 2002). Se aplicó por primera vez en invernaderos de pimiento de la zona en 1998. Se realizaron ensayos y se determinó la eficacia de diferentes enmiendas y las fechas más adecuadas para el control de los hongos fitopatógenos de suelo. Se comprobó que “la biosolarización ejerce un aceptable control sobre *P. capsici*”(Lacasa *et al.*, 2004).

La eficacia de la biosolarización varía dependiendo de la época del año en que se realice. Los mejores resultados en la Región de Murcia se obtienen en el mes de agosto (Lacasa *et al.* 2004), suponiendo esto pérdidas económicas por la reducción del periodo del cultivo. También se han observado buenos resultados de control iniciando la biosolarización a principios de septiembre (Guerrero *et al.*, 2004 a) y repitiendo el proceso durante 2 o 3 años consecutivos. (Guerrero *et al.*, 2004b, 2005, 2006, 2007).

Respecto a las enmiendas orgánicas, el estiércol fresco de oveja proporciona buenos resultados como enmienda orgánica cuando se reitera

varios años consecutivos (Guerrero *et al.*, 2004), pero la Región del Campo de Cartagena esta declarada “zona vulnerable a la contaminación por nitratos” por el Decreto 390/1998. Este reglamento restringe las aportaciones de nitrógeno al suelo a 170 kg/año por hectárea, cantidad bastante limitada para llevar a cabo una desinfección eficaz mediante biosolarización.

El estiércol verde de brasicas tiene un buen efecto biocida por la producción de glucosinolatos (Brown y Morra, 1997) aunque no siempre resultan eficaces, Coelho *et al.* (1999) no obtuvieron un aumento de la eficacia de la solarización con la aplicación de col en el control de dos especies de *Phytophthora*. Stapleton y Bañuelos (2009), describen las brasicas como posibles enmiendas de suelo por su poder de liberación de isotiocianatos durante la descomposición de la materia orgánica. Este método parece ser efectivo como desinfectante de suelo al iniciar la solarización en noviembre (Martínez *et al.* 2010). Los pellets de brasicas (subproductos del proceso de extracción de los aceites de las semillas) han mostrado eficacia en el control de los patógenos del suelo (Lazzeri *et al.* 2004).

El modo de acción de la biosolarización es complejo. Además de la destrucción directa del inóculo debido al aumento de la temperatura del suelo (Juarez-Palacios *et al.*, 1991; Bowers *et al.*, 1990) y del aumento de compuestos orgánicos volátiles (Gamliel *et al.*, 1993 a), se han propuesto otras hipótesis. Blok *et al.* (2000) atribuyen la eficacia de la biosolarización a las condiciones de anaerobiosis creadas al incrementar el metabolismo del suelo, con la incorporación de la materia orgánica, durante el proceso de fermentación, señalando que los mecanismos de control están relacionados con la reducción de la cantidad de oxígeno y la toxicidad de los productos que se crean durante el proceso de anaerobiosis. Otra de las hipótesis, defiende que la incorporación de enmiendas modifica la composición de las comunidades microbianas, y como resultado, aumenta la competencia y/o el antagonismo entre los microorganismos del suelo (Hoitink y Boehm, 1999).

El efecto de la biosolarización en la Región de Murcia ha sido evaluado hasta la fecha sobre la reducción de la incidencia de la enfermedad a lo largo del cultivo. El efecto directo de la biosolarización sobre las formas de conservación patógeno ha sido menos estudiado.

## Objetivo del trabajo

Bajo la justificación de la importancia del cultivo en la Región de Murcia, la problemática de la enfermedad, la escasez de métodos eficaces para el control de la misma en épocas fuera del calendario de cultivo, y las restricciones de aportes nitrogenados en la zona del Campo de Cartagena, el **objetivo** del presente trabajo es evaluar el efecto de la biosolarización con pellets de *Brassica carinata*, solos y en combinación con estiércol fresco de ovino, en diferentes fechas, en particular en los meses de agosto y octubre, sobre la viabilidad y sobre la capacidad infectiva de *Phytophthora capsici*.

Para ello se han planteado dos ensayos. Un ensayo de infectividad, que pretende medir la capacidad infectiva del inóculo de *P. capsici* sometido durante 6 semanas a diferentes tratamientos de desinfección, sobre plantas de pimientos sensibles (variedad Derio) a dicho patógeno, y un ensayo de viabilidad, que trata de evaluar el efecto de inhibición de los tratamientos de desinfección sobre la viabilidad de oosporas de *P. capsici*.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Características generales del ensayo**

La parte de campo del ensayo se ha realizado en un invernadero tipo parral, de 53x18 m, con ventilación lateral en los dos lados mayores y con orientación Este-Oeste, situado en la finca "Torre Blanca", situada en el Campo de Cartagena, Región de Murcia. El invernadero, se ha empleado en las últimas doce campañas para ensayos de alternativas no química al BM.

Se cultiva de pimiento ininterrumpidamente desde hace 15 años.

El suelo es franco arcilloso con un pH y una C.E de 7,6 y 9,6 respectivamente y aproximadamente un 2,9 % de materia orgánica. Está libre de patógenos.

Entre finales de julio y principios de agosto de 2009 se preparó el invernadero para albergar el ensayo. Se labró el suelo de la forma que habitualmente lo realizan los agricultores de la zona, de modo que quedó bien desmenuzado en una profundidad de 20-30 cm, preparado para la aplicación de los tratamientos de desinfección.

La parte del ensayo de infectividad realizada en laboratorio se ha efectuado en una cámara de cultivo bajo las siguientes condiciones climáticas y nutritivas:

Temperatura ambiente: 25 °C

Fotoperiodo: 14 h luz/10 h oscuridad

Intensidad luminosa: 200  $\mu\text{mol photon m}^{-2}$

Nutrición: abono y agua según necesidades

### **Tratamientos aplicados**

Se llevaron a cabo los siguientes tratamientos durante 6 semanas: 14/08/09-25/09/09 para los tratamientos de agosto y 2/10/09 -13/11/09 para los de octubre, exceptuando el tratamiento con BM, que se aplicó durante la segunda semana de diciembre.

**Tabla 1.** Tratamientos de suelo ensayados. BM: Bromuro de Metilo; BS: Biosolarización; EFO: Estiércol fresco de ovino.

Ref.	Tratamiento	Dosis
T1	BM 98 %: Cloropicrina 2 %	30 g/m <sup>2</sup>
T2	BS pellets <i>B. carinata</i> + EFO, agosto	0,3 kg/m <sup>2</sup> +2,5 kg/m <sup>2</sup>
T3	BS pellets <i>B. carinata</i> , agosto	0,3 kg/m <sup>2</sup>
T4	BS pellets <i>B. carinata</i> + EFO, octubre	0,3 kg/m <sup>2</sup> +2,5 kg/m <sup>2</sup>
T5	BS pellets <i>B. carinata</i> , octubre	0,3 kg/m <sup>2</sup>

### ***Tratamientos de biosolarización***

Se realizó según la metodología de Guerrero *et al.* (2004 a, b, c). Las enmiendas orgánicas se envolvieron en el suelo con ayuda de un rotovator a una profundidad de 25-30cm; a continuación se extendieron los laterales de riego y se sellaron con plástico de polietileno de 200 galgas (0,05 mm) de espesor; seguidamente se regó hasta alcanzar el 60% capacidad de campo. Se utilizaron emisores de 3l/h, durante tres horas el primer día y tres horas el segundo día, instalados a una distancia de 0,40m x 0,5m. El invernadero se mantuvo cerrado para incrementar el efecto de solarización.

El estiércol aplicado es de procedencia ovina y tiene las siguientes características: pH y CE 8.24 y 5.06 dS m<sup>-1</sup> respectivamente. El contenido de C orgánico es de 403 g kg<sup>-1</sup>, y el N total 25,2 g kg<sup>-1</sup>, P total 5,8 g kg<sup>-1</sup> y K total 26,4 g kg<sup>-1</sup>. Está libre de metales pesados.

Los pellets son de *Brassica carinata*, de la marca comercial Biofence®, (Triumph Italia SPA, Cereale Toscana Group) contienen un 6% de N total; 7% de P total; 2.4 % de K total y un 84.2 % de material orgánica.

### ***Tratamiento con bromuro de metilo***

El bromuro de metilo se aplicó en fumigación, en frío, con la ayuda de un dosificador volumétrico. El producto se distribuyó bajo plástico VIF (Virtually impermeable film) de 160 galgas (0,04 mm) de espesor, con la manguera de

aplicación. Se procuró que la distribución fuera lo más uniforme posible. Los plásticos se dejaron puestos durante 7 días. Se aplicó el 16/12/09.

### **Parámetros estudiados**

La supervivencia de las oosporas de *Phytophthora capsici* se puede evaluar mediante 2 parámetros, viabilidad e infectividad. Se ha medido el efecto de los diferentes tratamientos biofumigantes sobre la capacidad infectiva y sobre la viabilidad de oosporas de *P. capsici*. Además se han medido otros parámetros para obtener información sobre el proceso de biosolarización y sus efectos sobre el cultivo.

#### ***Viabilidad***

La viabilidad de una oospora puede definirse como su capacidad de éxito o fracaso en la supervivencia. Para determinar la viabilidad, se ha seguido el método de la plasmólisis descrito por Jiang y Erwin (1990).

#### ***Infectividad***

Este parámetro mide la capacidad que tienen las oosporas supervivientes o viables de *P. capsici* de causar enfermedad en plantas de pimiento sensibles a dicho patógeno, tras ser sometidas al tratamiento de biosolarización. Se ha determinado mediante la técnica de la capa de suelo infectado (Bowers y Mitchell, 1991) a través de sondas biológicas que se describen en el apartado de desarrollo del ensayo.

#### ***Temperatura***

Se monitorizó la temperatura del suelo a lo largo del periodo de duración de la biosolarización en cada uno de los tratamientos de desinfección mediante la instalación de sondas de temperatura (32K Hobo H8-4 datalogger), a 15 cm y 30 cm de profundidad, registrando los valores medios cada 45 minutos.

#### ***Desarrollo del cultivo***

Se midió el efecto de los diferentes tratamientos sobre el desarrollo del cultivo mediante los siguientes parámetros: Desarrollo vegetativo de las plantas y producción de frutos.

Tras el ensayo de biosolarización, se retiraron los plásticos y se dejó el suelo al aire. Se labraron todas las parcelas elementales de forma independiente, para preparar el suelo para el cultivo de pimiento. Se pusieron las mangueras de riego y se preparó para plantar. Se trasplantó el 05/01/10 la variedad Gacela. El ensayo finalizó el 04/08/10. En cada parcela se trasplantaron 3 filas de 40 plantas cada una. Las medidas se hicieron en una fila central para disminuir el posible efecto borde. La plantación se realizó con una densidad de 25.000 plantas/ha.

El tratamiento de biosolarización con pellets de *B. carinata* exclusivamente, se suplementó con estiércol de oveja semi-compostado antes de plantar con el fin de equiparar los tratamientos en el contenido en materia orgánica adicionada, respecto a la posible respuesta del cultivo.

#### DESARROLLO VEGETATIVO DE LAS PLANTAS: ALTURA

En cada parcela elemental se midió la altura de 5 plantas tomadas al azar. Los controles se realizaron cada tres semanas hasta junio, momento en el que se dejan de entutorar las plantas y resulta difícil su medición. Este parámetro está relacionado con el vigor del cultivo.

#### PRODUCCIÓN DE FRUTOS

Se midió la producción de frutos en cada una de las filas control de cada parcela elemental. Los frutos se clasificaron de acuerdo a los criterios comerciales vigentes para el pimiento de tipo California, que establece 5 categorías: Extra, primera, segunda, tercera y destrío. Se pesaron por cada una de las categorías, utilizando una balanza digital automática de 0,01 kg de precisión. La producción total se ha expresado en kg/m<sup>2</sup>. Se ha considerado que la producción comercial es la suma de todas las categorías salvo el destrío. Los controles se realizaron cada tres semanas hasta el final del cultivo.

## **Desarrollo del ensayo**

### ***Preparación de las sondas biológicas***

#### **ENSAYO DE VIABILIDAD**

Se prepararon sondas biológicas para medir la viabilidad de oosporas de *P. capsici* tras ser sometidas a biosolarización. Para ello se vertió un volumen determinado de la solución de oosporas filtradas, sobre mallas de nylon de 25µm de luz y de 1cm<sup>2</sup> de superficie aproximadamente, procurando añadir 1500 oosporas/malla, fijadas a la misma mediante vacío, utilizando una columna de filtración (Millipore), de acuerdo con Lumsden (1980).

Para facilitar la colocación de las mallas en el suelo del invernadero se confeccionaron sobres de nylon de 15 µm de diámetro de poro, en cada uno de los cuales se introdujeron 3 mallas, para asegurar que tras el muestreo se pudieran contar al menos 100 oosporas/sobre.

En cada parcela elemental se establecieron 3 puntos de muestreo, con 2 profundidades por punto (15 y 30cm).

Finalizada la biosolarización, al cabo de 6 semanas, se extraen las sondas y se transportan, al laboratorio, refrigeradas.

#### **ENSAYO DE INFECTIVIDAD**

Las sondas biológicas consisten en bolas de 100 ml de suelo esterilizado del mismo invernadero en el que se realiza el ensayo, inoculado con la solución de oosporas que se describen a continuación.

La dosis de inoculación es de 10.000 oosporas/sonda (Dosis optimizada en un ensayo previo en base a la concentración de oosporas en el suelo capaz de infectar el 100 % de las plantas) (Datos no publicados).

El suelo de cada sonda se cogió de la parcela elemental en la que se puso más tarde, y se desinfectó en autoclave durante 1 hora a 121 °C, repitiendo el proceso 3 días consecutivos. Se depositó sobre una malla de agril con la que se confeccionaron las bolas, procurando que el inóculo quedase en el centro de la bola.

Se enterraron 8 sondas en cada parcela elemental, 4 puntos de muestreo a dos profundidades, 15 y 30 cm.

### ***Preparación de inóculo***

Las oosporas se produjeron *in vitro*, enfrentando aislados puros, activos y genéticamente complementarios (A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>) en una placa Petri con medio agar-guisante, con 0.1 g  $\beta$ -sitosterol/L de acuerdo con Pittis y Shattock (1994). Los del tipo A<sub>1</sub> (00/004, 02/206 y 06-13-03) provienen de España y los aislado A<sub>2</sub> (CBS-111336 y CBS-370.72) de la colección tipo holandesa (Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)). Se cruzaron las 3 cepas del tipo A<sub>1</sub> con las 2 cepas del tipo A<sub>2</sub>, por lo que se obtuvieron oosporas de 6 cruces diferentes.

Las placas sembradas se incubaron 4 semanas en oscuridad a 20 °C. De ellas se aislaron las oosporas formadas en la zona de contacto entre ambas colonias. Con la ayuda de un bisturí estéril se extrajeron las oosporas, junto con el agar de la placa y se diluyeron con 10ml de agua destilada estéril por cada placa. Se homogeneizó la solución con la ayuda de una batidora convencional durante 1-2 minutos y se filtró con una malla de nylon de 100  $\mu$ m para eliminar los esporangios, parte del micelio y el agar.

La solución de oosporas se utilizó para preparar tanto las sondas del ensayo de infectividad como las del ensayo de viabilidad. Una parte de la solución, la destinada al ensayo de infectividad, se trató con 20 mg/ml de enzimas de *Trichoderma harzianum* durante 48 h a 20 °C (Glucanex®, SIGMA L1412. España) para eliminar los posibles restos de micelio y esporangios y poder asegurar que la infección se produce únicamente por las oosporas. Tras 48 h de la adición de las enzimas a la solución, se lavó con agua destilada estéril y se centrifugó tres veces sucesivas (1350 rpm, 10 minutos). Tras cada centrifugado se retiró el sobrenadante y se añadieron 10 ml de agua destilada estéril.

La concentración de oosporas en la solución se estimó utilizando una cámara de recuento Fuchs-Roshental.

## ***Lectura de las sondas biológicas***

### VIABILIDAD

La viabilidad se ha estimado mediante el método de plasmólisis descrito por Jiang y Erwin (1990). Las mallas con las oosporas se sumergieron durante 1 h en una solución de NaCl 4 M. Posteriormente, se observaron al microscopio óptico (x400), considerando viables las oosporas que se habían plasmolizado. El porcentaje de oosporas viables se estimó sobre un total de 100 oosporas por sobre.

### INFECTIVIDAD

La infectividad se ha determinado mediante la técnica de la capa de suelo infectado (Bowers y Mitchell, 1991).

Los 100 ml de suelo de cada sonda se introducen en macetas de 200 ml de capacidad aproximada, en las que se introduce en primer lugar una tela de agril para evitar la pérdida de sustrato a través de los agujeros de drenaje, seguido de una capa de perlita para facilitar el drenaje, y finalmente el suelo procedente de cada una de las sondas. En cada maceta se pone una planta de pimiento de la variedad Derio, sensible a *Phytophthora*, en estado de 2 hojas verdaderas, para comprobar si las oosporas son capaces de infectarla. Las plantas permanecen 12 semanas en la cámara de cultivo bajo las condiciones descritas anteriormente.

Las macetas se dispusieron dentro de bandejas provistas de “altillos” para prevenir las posibles contaminaciones entre tratamientos por contacto con las aguas de drenaje.

Periódicamente se realizó una inspección visual del estado sanitario de las plantas.

Se determinó, mediante un análisis específico, la presencia del patógeno en el suelo de cada una de las sondas. También se analizó la capacidad de infección del mismo analizando el material vegetal de cada una de las plantas que se pusieron en contacto con cada una de las sondas. Las

plantas muertas se analizaron en el momento en que se detectaron, y el resto de plantas al final del ensayo. El análisis del material vegetal consistió en el cultivo de fragmentos de raíces y del cuello en un medio selectivo para Pitiáceas (V8 modificado por la adición de antibióticos o PARH).

La tierra de la rizosfera se analizó de forma cualitativa por el método de las trampas vegetales (pétalos inmaduros de clavel) descrita por Tello *et al.*, 1991. A los 4-5 días se realizaban las lecturas de los análisis microscópicos, tanto del suelo como del material vegetal, para determinar la presencia/ausencia de *P. capsici*.

Se pusieron las siguientes sondas control:

a) 12 sondas conservadas a 5 °C (T<sup>a</sup> a la que se mantienen latentes las oosporas) en cámara y transplantadas al desenterrar las sondas del resto de tratamientos (a las 6 semanas).

b) 12 sondas sin inocular (control negativo), transplantadas el mismo día que el resto, a las 6 semanas.

### **Diseño experimental y estadístico**

Se realizó un diseño de bloques al azar, con 3 repeticiones por tratamiento desinfectante. La superficie de la parcela elemental fue de 52,5 m<sup>2</sup>. El experimento es de tipo factorial, los 10 tratamientos son el resultado de la combinación de los distintos niveles de cada factor. El BM se aplica en los 2 niveles de profundidad, pero solamente en 1 régimen térmico, ya que su eficacia no depende de la temperatura en el momento de aplicación, siempre que supere los 10 °C.

a) Desinfectantes de suelo, 3 niveles:

BM 98 %: cloropicrina 2 %

BS pellets *B. carinata* + EFO

BS pellets *B. carinata*

b) Regímenes térmicos, 2 niveles:

Agosto

Octubre

c) Profundidad, 2 niveles:

15 cm

30 cm

Los datos de incidencia de la enfermedad en las plantas de pimiento usadas en el bioensayos de infectividad, los datos de viabilidad y los datos de análisis del desarrollo del cultivo, se analizaron mediante análisis de varianza ANOVA a una, dos o tres vías, dependiendo del número de variables a analizar. Se realizaron test de comparaciones múltiples mediante test LSD al 95 %. ( $P < 0,05$ ).

Se comprobó la normalidad de los datos, la homogeneidad de varianzas y la de sus transformadas.

Para la normalización de los índices de enfermedad se realizó la transformación  $y = \arcsen(\sqrt{x/n})$ , donde  $x$  = número de plantas enfermas y  $n$  = número total de plantas. (Sokal y Rohlf, 1995).

Los datos de viabilidad se transformaron usando la raíz cuadrada ( $\sqrt{x}$ ), donde  $x$  = porcentaje de oosporas viables.

Los datos que miden el desarrollo del cultivo, altura y producción de frutos, se analizaron transformándolos mediante  $\log_{10}(x)$  y  $\log_{10}(x+1)$  respectivamente, donde  $x$  es la altura/producción de las plantas.

Se empleó el programa STATGRAPHICS PLUS 5.1 (Statistical Graphics Corp. 1994), para el análisis estadístico de todos los datos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la biosolarización con pellets de *Brassica carinata* sobre la viabilidad de oosporas de *Phytophthora capsici*

A continuación se muestran los resultados del ensayo de viabilidad. Se han realizado análisis de varianza ANOVA de una, dos y tres vías para determinar la influencia de cada una de las variables; tratamiento desinfectante (T), época de aplicación (F) y profundidad (P), sobre el porcentaje de plantas infectadas. Para ver las relaciones entre los niveles de cada una de las variables se han realizado test de comparaciones múltiples.

**Tabla 2.** Viabilidad<sup>u</sup> de oosporas de *Phytophthora capsici*, sometidas a diferentes tratamientos desinfectantes, en dos épocas<sup>f</sup> y profundidades<sup>p</sup>.

Tratamiento	<sup>f</sup> Agosto		Octubre	
	<sup>p</sup> 15cm	30cm	15cm	30cm
BM 98%: cloropicrina 2%	<sup>v</sup> 8,2a	6,5a	8,2a	6,5a
BS EFO + pellets <i>B. carinata</i>	0b	0b	9,59a	37,89b
BS pellets <i>B. carinata</i>	0b	0b	27,85b	41,37b

BM: Bromuro de metilo; BS: Biosolarización; EFO: Estiércol fresco de ovino.

Test LSD al 95 % con datos transformados mediante  $(\sqrt{x})$ , donde x= porcentaje de oosporas viables. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con el test LSD.

<sup>u</sup> Viabilidad de oosporas de *P. capsici* determinada mediante el método de la plasmólisis (Jiang y Erwin, 1990).

<sup>v</sup>Valores de viabilidad expresados en porcentaje. Valores medios en base a la lectura de 100 oosporas por sonda.

El porcentaje de oosporas viables difirió significativamente entre tratamientos ( $P_T= 0,0026$ ), épocas de aplicación ( $P_F=0,0000$ ) y profundidades ( $P_P= 0,0001$ ). Las interacciones entre las variables también resultaron altamente significativas.

El tratamiento desinfectante; “BM”, “pellets de *B. carinata*”, “pellets de *B. carinata* + EFO”, influye de manera determinante sobre el porcentaje de oosporas viables tras 6 semanas de desinfección, tanto si aplica en agosto ( $P_T=0,0000$ ) como si se aplica en octubre ( $P_T= 0,0000$ ). En la tabla 3 se puede observar que en agosto la influencia de los tratamientos es debida a la inclusión del BM en el análisis como elemento de comparación, no apreciándose diferencias entre los 2 tratamientos de biosolarización. Ambos tratamientos han reducido el porcentaje de oosporas viables a cero en el mes de agosto. Muestran una eficacia superior incluso a la del BM. Es interesante observar que si la biosolarización se realiza en el mes de agosto, la desinfección con pellets de *B. carinata* solos es totalmente eficaz, por lo que no sería necesario el suplemento de estiércol en estas fechas. Es posible que el efecto térmico sea el factor más determinante, y “enmascare” la influencia del tratamiento.

En octubre, tanto a 15 con a 30 cm de profundidad, el tratamiento desinfectante influye de manera determinante sobre la viabilidad de las oosporas de *P. capsici*. ( $P_{T15}= 0,0000$  ;  $P_{T30}= 0,034$ ). La enmienda orgánica, y en particular el suplemento con estiércol fresco de ovino, toma importancia en esta época, cuando la reducción de oosporas viables a 15 cm es significativamente superior que en el tratamiento de pellets de *Brassica carinata* solos. Su efectividad resulta similar a la del bromuro de metilo. Por el contrario, este suplemento orgánico no surge el mismo efecto a 30 cm de profundidad, ya que se muestra igual de ineficaz que el tratamientos con pellets de *B. carinata* solos, ambos muy inferiores al bromuro de metilo.

## Influencia de la profundidad

**Tabla 3.** Viabilidad<sup>u</sup> de oosporas de *Phytophthora capsici*, sometidas a diferentes tratamientos desinfectantes, evaluada a dos profundidades, 15 y 30 cm, para cada desinfectante<sup>t</sup> y época<sup>f</sup>.

Profundidad	<sup>f</sup> Agosto			Octubre		
	<sup>t</sup> BM	pellets	pellets+EFO	BM	pellets	pellets+EFO
15 cm	8,2a	0a	0a	8,2a	27,85a	9,59a
30 cm	6,5a	0a	0a	6,5a	41,37b	37,89b

BM: Bromuro de metilo; BS: Biosolarización; EFO: Estiércol fresco de ovino.

Test LSD al 95 % con datos transformados mediante  $(\sqrt{x})$ , donde x= porcentaje de oosporas viables. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con el test LSD.

<sup>u</sup> Viabilidad de oosporas de *P. capsici* determinada mediante el método de la plasmólisis (Jiang y Erwin, 1990).

<sup>v</sup> Valores de viabilidad expresados en porcentaje. Valores medios en base a la lectura de 100 oosporas por sonda.

En cuanto a la influencia de la profundidad sobre la viabilidad de las oosporas de *P. capsici* tras ser sometidas al proceso de biosolarización, resulta significativa en la época menos calurosa, octubre, cuando ambos tratamientos de biosolarización han resultado ser más eficaces a 15 que a 30 cm de profundidad, ( $P_{\text{pellets}} = 0,0000$ ;  $P_{\text{pellets+EFO}} = 0,0001$ ), siendo esa diferencia superior en el caso del tratamiento suplementado con estiércol fresco de ovino.

En agosto, en el rango de 0 a 30 cm de profundidad, la efectividad del tratamiento de biosolarización, medida como porcentaje de oosporas viables al final de la misma, resultó ser similar en todo el rango, para cada uno de los tratamientos.

En cuanto al testigo químico de referencia, como citan numerosos autores, su eficacia no se ve influenciada por la profundidad en el rango señalado.

## Influencia de la época de aplicación

**Tabla 4.** Viabilidad<sup>u</sup> de oosporas de *Phytophthora capsici*, sometidas a diferentes tratamientos desinfectantes, evaluada en dos épocas, agosto y octubre, para cada enmienda<sup>†</sup> y profundidad<sup>p</sup>.

Época	P <sup>15cm</sup>		30cm	
	pellets <sup>†</sup>	pellets+EFO	Pellets	pellets+EFO
Agosto	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
Octubre	27,9b	9,6b	41,4b	37,9b

BM: Bromuro de metilo; BS: Biosolarización; EFO: Estiércol fresco de ovino.

Test LSD al 95 % con datos transformados mediante  $(\sqrt{x})$ , donde x= porcentaje de oosporas viables. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con el test LSD.

<sup>u</sup> Viabilidad de oosporas de *P. capsici* determinada mediante el método de la plasmólisis (Jiang y Erwin, 1990).

<sup>v</sup> Valores de viabilidad expresados en porcentaje. Valores medios en base a la lectura de 100 oosporas por sonda.

Respecto a la influencia de la época de aplicación sobre la reducción de oosporas viables, en agosto, los tratamientos de biosolarización resultaron totalmente eficaces, tanto a 15 cm como a 30 cm de profundidad. Por el contrario, en octubre, entre el 9,6-41,4 % de las oosporas biosolarizadas continuaron siendo viables. Esta diferencia resultó altamente significativa para cada una de las enmiendas y profundidades evaluadas ( $P_{\text{pellets } 15\text{cm}} = 0,0000$ ;  $P_{\text{pellets+EFO } 15\text{cm}} = 0,0000$ ;  $P_{\text{pellets } 30\text{cm}} = 0,0000$ ;  $P_{\text{pellets+EFO } 30\text{cm}} = 0,0000$ ). A 15 cm de profundidad, las diferencias de efectividad de un tratamiento, atribuibles a la época de aplicación, fueron inferiores a las diferencias encontradas a 30cm de profundidad.

## Efecto de la biosolarización con pellets de *Brassica carinata* sobre la capacidad infectiva de *Phytophthora capsici*

Se ha seguido el mismo modelo que en el ensayo de infectividad. Se han realizado análisis de varianza ANOVA y test de comparaciones múltiples para establecer las razones entre cada una de las variables de manera independiente.

**Tabla 5.** Infectividad<sup>u</sup> de *Phytophthora capsici*, expresada como incidencia de la enfermedad en plantas de pimiento variedad Derio, tratadas con cada tipo de desinfectante, en cada época<sup>f</sup> y profundidad<sup>p</sup>.

Tratamiento desinfectante	†Agosto		Octubre	
	<sup>p</sup> 15cm	30cm	15cm	30cm
BM 98%: cloropicrina 2%	<sup>v</sup> 0,0a	0,0a	0,0a	0,0a
BS EFO + pellets <i>B. carinata</i>	8,3a	0,0a	0,0a	16,7ab
BS pellets <i>B. carinata</i>	0,0a	0,0a	0,0a	33,3b

BM: Bromuro de metilo; BS: Biosolarización; EFO: Estiércol fresco de ovino.

Test LSD al 95 % con datos transformados mediante  $\arcsen(\sqrt{x/n})$ , donde x = número de plantas enfermas y n = número total de plantas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con el test LSD.

<sup>u</sup> Infectividad de *P. capsici* expresada como incidencia de final de la enfermedad (en porcentaje), ha sido determinado mediante el análisis de las sondas biológicas por el método de “las trampas vegetales” (Tello *et al*, 1991) y mediante el “cultivo de fragmentos de raíz y cuello en un medio selectivo para Pitiáceas (V8 modificado o PARH)”.

<sup>v</sup>Valores de infectividad expresados en porcentaje son la media de tres repeticiones de 4 sondas.

En la tabla 5 se observa el porcentaje de plantas infectadas en cada caso. La incidencia final de la enfermedad difirió significativamente entre las épocas de aplicación ( $P_F= 0,038$ ) y entre las profundidades ( $P_P=0,038$ ) evaluadas. La interacción entre ambas variables también ha resultado significativa ( $P_{FP}=0,004$ ).

En agosto, la capacidad infectiva de las oosporas sometidas a cualquiera de los tratamientos ha sido similar ( $P_{T15}= 0,3794$ ). Todos los

tratamientos han resultados efectivos, tanto a 15 como a 30 cm de profundidad. La biosolarización con pellets de *B. carinata* ha resultado tan eficaz como la desinfección química con bromuro de metilo.

En octubre, a 15 cm de profundidad, la desinfección ha sido total para todos los desinfectantes. A 30cm, aunque de manera general el tratamiento no es significativo ( $P_T=0,083$ ) se pueden observar diferencias significativas entre el tratamiento con “pellets de *B. carinata*” y el tratamiento con BM cuando se aplica el test de comparación múltiple LSD. No existen diferencias en cuanto a eficacia de la biosolarización en octubre a 30cm de profundidad, entre el tratamiento realizado únicamente con “pellets de *B. carinata*” y el suplementado con estiércol fresco de ovino. Para obtener una eficacia próxima a la del bromuro de metilo, en octubre a 30cm, es necesario el suplemento con estiércol.

La eficacia de los tratamientos de biosolarización; “pellets *B. carinata* + EFO en agosto”, “pellets *B. carinata* en agosto” y “pellets *B. carinata* + EFO en octubre”, medida de manera directa sobre capacidad del patógeno de generar enfermedad en plantas de *Capsicum annum* sensibles a *P. capsici*, ha sido similar a la eficacia obtenida para el bromuro de metilo. Coincidiendo con Lazzerí *et al.* (2004), los pellets de brasicas ejercen un control sobre los patógenos de suelo. En la Región de Murcia, en agosto por si solos, y en octubre suplementados con estiércol fresco de ovino.

## Influencia de la profundidad

**Tabla 6.** Infectividad<sup>u</sup> de *Phytophthora capsici*, expresada como incidencia de la enfermedad en plantas de pimiento variedad Derio, evaluada a dos profundidades, 15 y 30 cm, para cada desinfectante<sup>t</sup> y época<sup>f</sup>.

Profundidad	<sup>f</sup> Agosto			Octubre		
	<sup>t</sup> BM	pellets	pellets+EFO	BM	pellets	pellets+EFO
15 cm	<sup>u</sup> 0,0a	0,0a	8,3a	0,0a	0,0a	0,0a
30 cm	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	33,3b	16,7a

BM: Bromuro de metilo; pellets: pellets de *B. carinata*; EFO: Estiércol fresco de ovino.

Test LSD al 95 % con datos transformados mediante  $\arcsen(\sqrt{x/n})$ , donde x = número de plantas enfermas y n = número total de plantas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con el test LSD.

<sup>u</sup> Infectividad de *P. capsici* expresada como incidencia de final de la enfermedad (en porcentaje), ha sido determinado mediante el análisis de las sondas biológicas por el método de “las trampas vegetales” (Tello *et al.*, 1991) y mediante el “cultivo de fragmentos de raíz y cuello en un medio selectivo para Pitiáceas (V8 modificado o PARH)”.

<sup>v</sup>Valores de infectividad expresados en porcentaje son la media de tres repeticiones de 4 sondas.

La biosolarización en agosto con pellets de *B. carinata*, solos o junto con estiércol fresco de ovino, es efectiva en todo el rango de profundidad evaluado. ( $P_{\text{pellets+EFO}} = 0,3293$ ). Es posible que a 15 cm el efecto térmico enmascare la influencia de otros factores como la enmienda a profundidades relativamente superficiales.

En octubre, la eficacia de la desinfección en el rango de profundidad estudiado, de 0 a 30 cm, no es tan homogénea como en agosto. La eficacia de la solarización depende de la profundidad (Guerrero *et al.*, 2004). La biosolarización con “pellets de *B. carinata*” ha resultado 100 % efectiva a 15 cm de profundidad, sin embargo, a 30 cm la efectividad disminuye significativamente ( $P_{\text{pellets}} = 0,0268$ ). La biosolarización suplementada con estiércol fresco de ovino, resulta por el contrario, tan efectiva a 15 como a 30 cm de profundidad ( $P_{\text{pellets+EFO}} = 0,1623$ ), coincidiendo en lo mismo, en octubre la biosolarización debe ser suplementada con EFO para que resulte efectiva en el rango de profundidad evaluado.

El bromuro de metilo es 100 % eficaz en las 2 profundidades ensayadas.

## Influencia de la época de aplicación

**Tabla 7.** Infectividad<sup>u</sup> de *Phytophthora capsici*, expresada como incidencia de la enfermedad en plantas de pimiento variedad Derio, testadas con inóculo desinfectado en dos épocas, agosto y octubre, para cada enmienda<sup>t</sup> y profundidad<sup>p</sup>.

Época	P15cm		30cm	
	<sup>t</sup> pellets	pellets+EFO	pellets	pellets+EFO
Agosto	<sup>u</sup> 0,0a	<sup>v</sup> 8,3a	0,0a	0,0a
Octubre	0,0a	0,0a	33,3b	16,7a

BM: bromuro de metilo; pellets: pellets de *B. carinata*; EFO: estiércol fresco de ovino. Test LSD al 95 % con datos transformados mediante  $\arcsen(\sqrt{x/n})$ , donde x = número de plantas enfermas y n = número total de plantas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con el test LSD.

<sup>u</sup> Infectividad de *P. capsici* expresada como incidencia de final de la enfermedad (en porcentaje), ha sido determinado mediante el análisis de las sondas biológicas por el método de “las trampas vegetales” (Tello *et al*, 1991) y mediante el “cultivo de de fragmentos de raíz y cuello en un medio selectivo para Pitiáceas (V8 modificado o PARH)”.

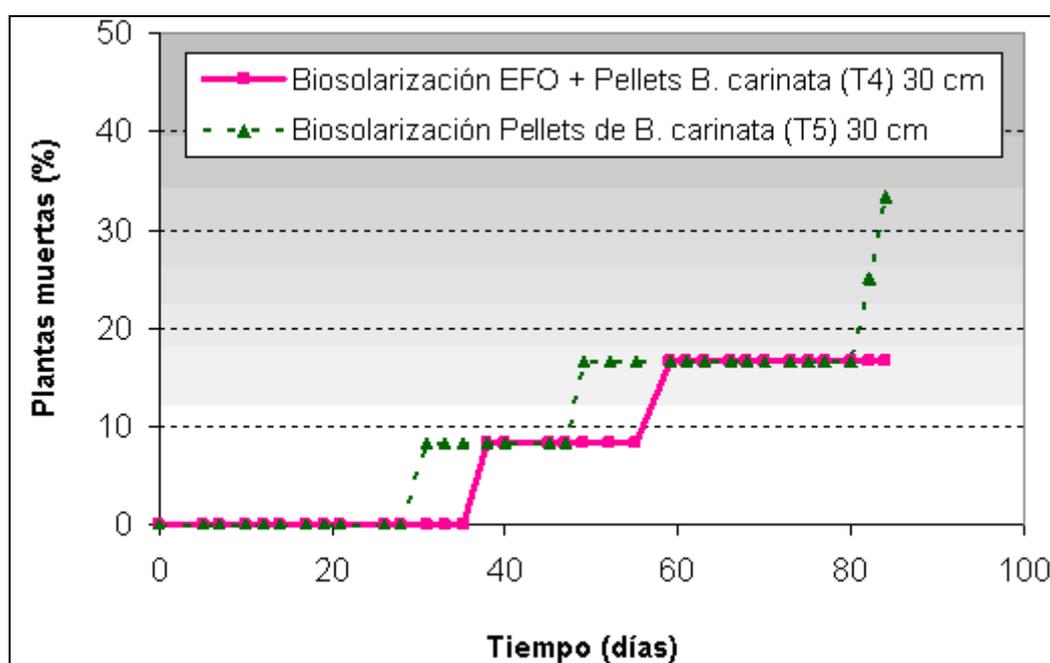
<sup>v</sup> Valores de infectividad expresados en porcentaje son la media de tres repeticiones de 4 sondas.

La eficacia de la biosolarización con “pellets de *B. carinata*” solos, a 15cm de profundidad, ha resultado independiente de la época de aplicación, siendo 100% eficaz tanto en agosto como en octubre. En cambio, a 30cm de profundidad, la eficacia de este tratamiento depende de la época de aplicación ( $P=0,0268$ ). La desinfección en agosto ha sido total, mientras que en octubre se infectaron un porcentaje significativo de plantas. Como comprobó Lacasa *et al.*, 2004, la biosolarización ejerce un control sobre *P.capsici*, obteniéndose los mejores resultados en la Región de Murcia en agosto.

El tratamiento suplementado con EFO muestra resultados similares a los “pellets de *B. carinata*” solos a 15 cm de profundidad ( $P_{\text{pellets+EFO}}= 0,3293$ ), en cambio atenúa las diferencias atribuidas a la época de aplicación a 30 cm ( $P_{\text{pellets+EFO}}= 0,1623$ ), resultando la eficacia de la desinfección con “pellets *B. carinata* + EFO” en octubre similar a la realizada en agosto.

Respecto de las sondas control, el 100% de las plantas testadas con las sondas de control positivas resultaron infectadas, por el contrario no se infectó ninguna de las plantas testadas con las sondas control negativas.

En la figura 1 se muestra la evolución de la enfermedad a lo largo del ensayo para los 2 tratamientos que han obtenido un índice de incidencia de la enfermedad mayor.



**Figura 1.** Evolución de la incidencia de la enfermedad a lo largo del bioensayo de infectividad.

La infección de las plantas testadas con el inóculo sometido a biosolarización únicamente con pellets de *B. carinata* ha sido mayor y más rápida que en las plantas testadas con el inóculo tratado con pellets más estiércol. La primera planta presentó los síntomas típicos de la enfermedad y murió una semana antes en el tratamiento de pellets exclusivamente, y la segunda planta murió unos 10 días antes.

Es probable que la densidad de inóculo resultante tras la desinfección se correlacione con el tiempo que transcurre hasta que comienza a manifestarse la enfermedad. Una extrapolación a campo de lo anterior podría traducirse en un aumento del tiempo que tarda el patógeno en penetrar en la planta y causar

la enfermedad, lo que en un cultivo de primor como es el pimiento en la Región de Murcia, se traduce en la posibilidad de alargar el ciclo de cultivo y consecuentemente la producción y la rentabilidad de la explotación.

### Temperatura del suelo durante el proceso de biosolarización

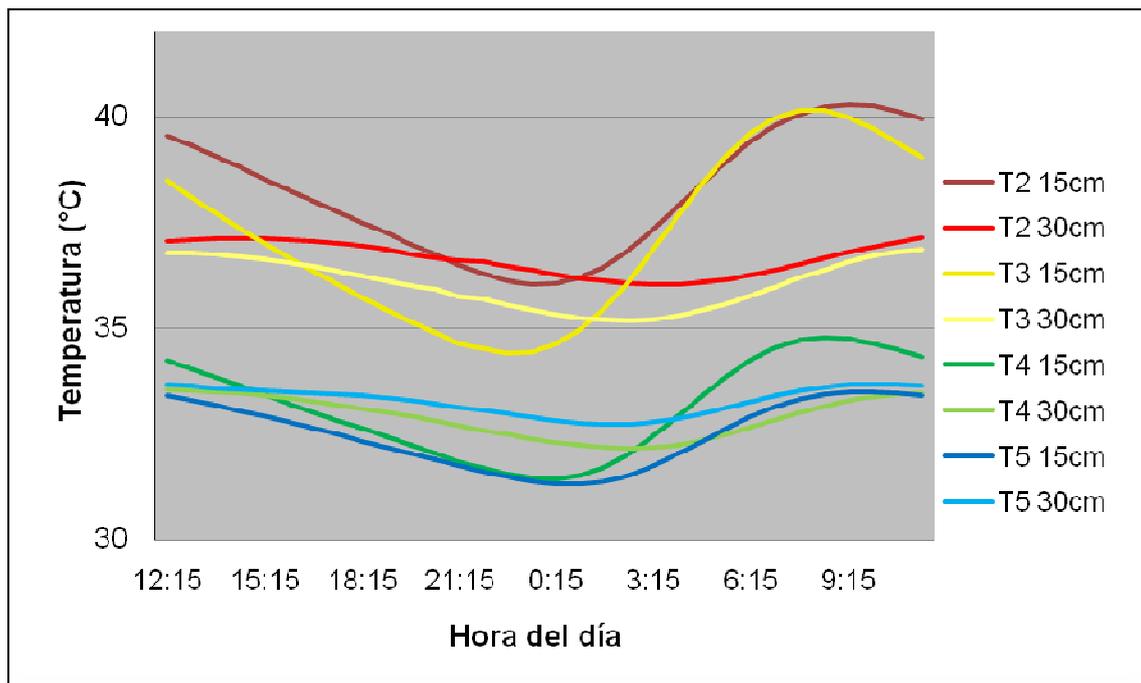
En la tabla 4 se muestra el porcentaje de horas acumuladas en cada rango de temperaturas para cada uno de los tratamientos de suelo, a 15 y 30 cm de profundidad, sobre el total de 1.008 horas, las 6 semanas que duró el ensayo.

**Tabla 8.** Porcentaje de horas acumuladas en cada rango de temperatura de suelo durante el periodo de 6 semanas en los tratamientos de agosto y octubre, a 15 cm y 30 cm de profundidad.

Tratamientos	15 cm									
	10-25 °C	25-27,5 °C	27-30 °C	30-32,5°C	32,5-35 °C	35-37,5 °C	37,5-40 °C	40-42,5 °C	42,5-45 °C	45-55 °C
T2	0,0	1,0	0,9	0,6	8,4	23,6	36,1	25,5	3,9	0,0
T3	0,0	0,5	0,9	4,6	15,1	32,8	25,7	17,9	2,6	0,0
T4	0,0	0,0	9,8	33,9	32,7	17,7	5,9	0,0	0,0	0,0
T5	0,0	0,2	11,8	41,1	30,4	16,0	0,4	0,0	0,0	0,0
30 cm										
T2	0,0	0,4	1,7	2,7	9,8	41,0	44,4	0,0	0,0	0,0
T3	0,0	0,3	1,4	2,9	22,3	45,4	27,7	0,0	0,0	0,0
T4	0,0	0,0	7,5	37,7	35,7	19,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T5	0,0	0,0	5,2	30,5	40,7	23,6	0,0	0,0	0,0	0,0

T2: BS pellets de *B.carinata* + EFO, agosto; T3: BS pellets de *B.carinata*, agosto; T4: BS pellets de *B.carinata* + EFO, octubre; T5: BS pellets de *B.carinata*, octubre.

La evolución de la temperatura a lo largo del día medio para cada uno de los tratamientos y profundidades registrados, se muestra en la figura 3. La temperatura del día medio fue entre 3 y 5 °C mayor en los tratamientos realizados en agosto en comparación con los realizados en octubre.



**Figura 2.** Evolución de la temperatura a lo largo del día medio para cada uno de los tratamientos y profundidades registrados.

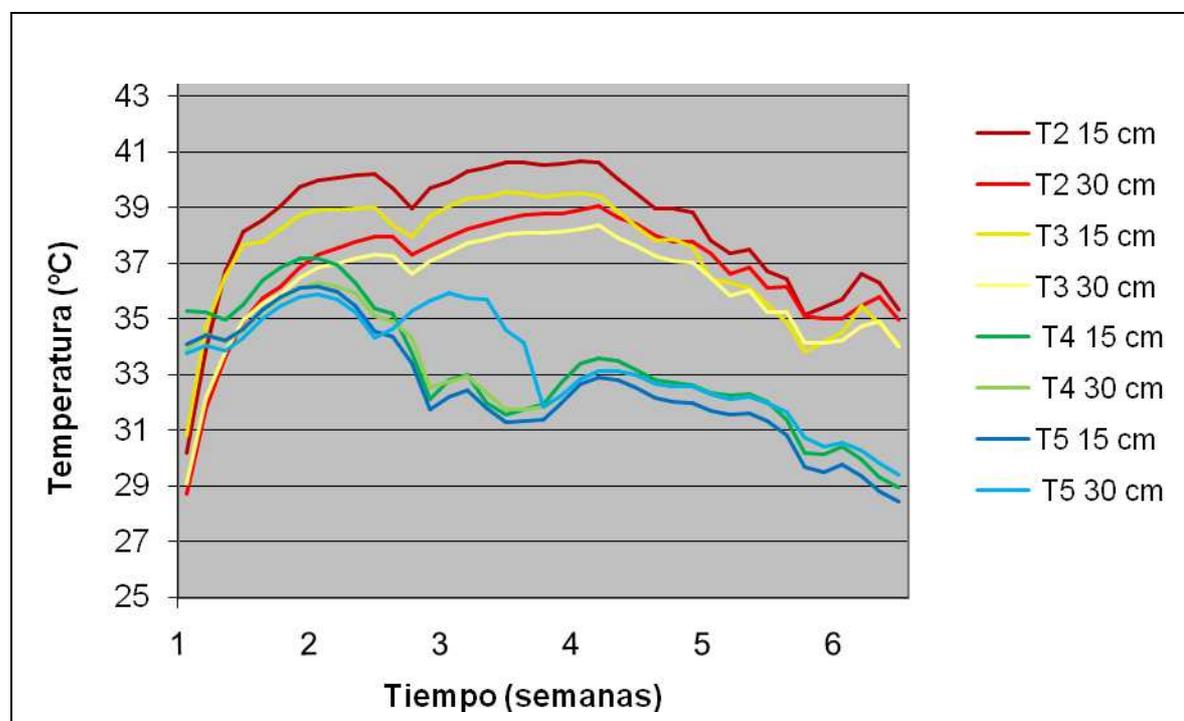
Los tratamientos de agosto se mantienen de manera casi permanente entre 34-40 °C. El suelo enmendado con “EFO + pellets de *B. carinata*”, se mantuvo durante el 89,1 % del tiempo que duró la biosolarización por encima de 35 °C a los 15cm de profundidad y el 85,4 % del tiempo a los 30cm de profundidad. El tiempo por encima de 35 °C en el suelo enmendado exclusivamente con pellets fue inferior que para los tratamientos suplementados con estiércol, el 79 % del tiempo a 15 cm y el 73,1 % a 30 cm, es decir, 898,1h; 860,8 h; 796,3 h y 736,8 h respectivamente por encima de los 35 °C de temperatura.

La temperatura del día medio de todos los tratamientos de octubre se mantiene por debajo de los 35 °C a lo largo de todo el día. De manera absoluta, el suelo de los tratamientos de octubre acumula menos del 25 % del tiempo por encima de esa temperatura. T4 a 15 cm se mantiene durante el 23,6 % de las horas por encima de 35 °C; T5 a 15 cm el 16,4 %; T4 a 30 cm el 19,0 % y T5 a 30 cm el 23,6 %, es decir 237,8 h; 165,3 h; 191,5 h y 237,8 h respectivamente.

El tratamiento con pellets en agosto sobrepasó los 40 °C a 15 cm de profundidad durante 206,6 horas de un total de 1.008 horas, mientras que el suelo del tratamiento con pellets en octubre no alcanzó esa temperatura, solo superó los 37,5 °C durante 4 de las 1.008 horas que duró el tratamiento. Además se mantuvo por debajo de los 35 °C durante el 83,6 % del tiempo.

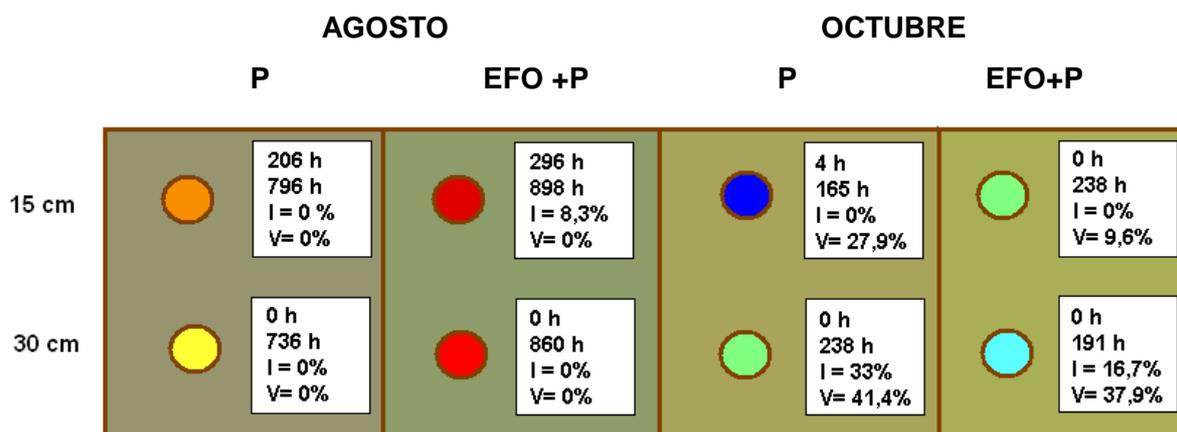
A 15 cm de profundidad la variación térmica a lo largo del día ha sido mayor que a 30 cm, donde la temperatura es más estable. La variación térmica también es más acentuada en agosto que en octubre.

La temperatura del suelo a 15 cm de profundidad ha sido superior que a 30 cm en los tratamientos de agosto durante la mayor parte del día. Esta variación ha sido más acentuada en el tratamiento con pellets más estiércol que en el tratamiento con pellets solos. En octubre, en cambio, la variación térmica entre los 15 y los 30 cm de profundidad es menor, llegando incluso a invertirse en el tratamiento 5, donde la temperatura a lo largo del día medio a 30 cm es superior a la temperatura a 15 cm.



**Figura 3.** Evolución de la temperatura media diaria a lo largo de las 6 semanas del ensayo de biosolarización.

El siguiente esquema muestra el perfil térmico del suelo de los cuatro tratamientos de biosolarización. Los datos, ordenados en columnas, expresan el número de horas acumuladas por encima de 40 y 35°C. Los últimos 2 datos muestran la incidencia de la enfermedad y el porcentaje de oosporas viables tras la biosolarización.



**Figura 4.** Representación del número de horas acumuladas por encima de 40 y 35°C para cada uno de los tratamientos en las 2 profundidades evaluadas. Incidencia de la enfermedad y porcentaje de oosporas viables en cada caso.

El inóculo de *P. capsici* sometido a biosolarización en agosto a 15 cm de profundidad, tanto con “pellets de *B. carinata*” como con “pellets de *B. carinata* + EFO”, ha superado las 199 horas acumuladas superiores a 40 °C que Etxeberia *et al*, (2011) estiman necesarias para matar al 100 % de las oosporas en suelo húmedo. Se han alcanzado 206 y 296 horas acumuladas respectivamente.

El suelo de los tratamientos de agosto no ha alcanzado los 40 °C a 30 cm de profundidad. Es posible que el tiempo acumulado por encima de 35 °C (736 y 860 horas) haya sido suficiente para incidir de forma total tanto en la viabilidad, como la capacidad infectiva del inóculo. Los niveles térmicos letales para los patógenos y parásitos telúricos se sitúa entre 36-50 °C (Katan, 1981). Etxeberia *et al* (2011), encuentran una reducción del 75 % de la viabilidad de las oosporas de *P. capsici* sometidas a un régimen 5 horas diarias a 35 °C durante 70 días en suelo húmedo, que suman 350 horas acumuladas.

Lacasa *et al*. (2004), relacionan la eficacia de la solarización con la profundidad. La solarización es efectiva por si sola hasta los 30-40 cm de

profundidad. Es posible que el efecto de la temperatura “enmascare” las diferencias que puedan existir debido a la enmienda biofumigante en los tratamientos de agosto, mientras que en octubre, cuando la temperatura es más baja y la solarización no llega por si sola a ser efectiva como desinfectante de suelo, se puedan observar diferencias debidas al desinfectante utilizado.

En octubre, a 15 cm se han acumulado más horas por encima de 35 °C en el tratamiento con estiércol que en el tratamiento con pellets exclusivamente. Esto podría ser debido al aumento de temperatura durante el proceso de fermentación de la materia orgánica.

A 30 cm de profundidad, el suelo enmendado únicamente con pellets de *B. carinata* ha acumulado las mismas horas por encima de 35 °C que el tratamiento suplementado con estiércol a 15 cm de profundidad. El porcentaje de oosporas viables y el índice de mortalidad de las plantas testadas, han sido mayores para el tratamientos enmendado con brasicas exclusivamente (“pellets *B. carinata* a 30cm” 41 % viabilidad y 33 % de infectividad; “pellets *B. carinata* + EFO a 15cm” 9,6 % viabilidad y 0 % de infectividad), lo que sugiere que la temperatura no ha sido la única responsable de la respuesta del inóculo a la biosolarización. Puede ser que la distribución desigual de la humedad o de los gases en el suelo determinen la diferencia entre ambos tratamientos.

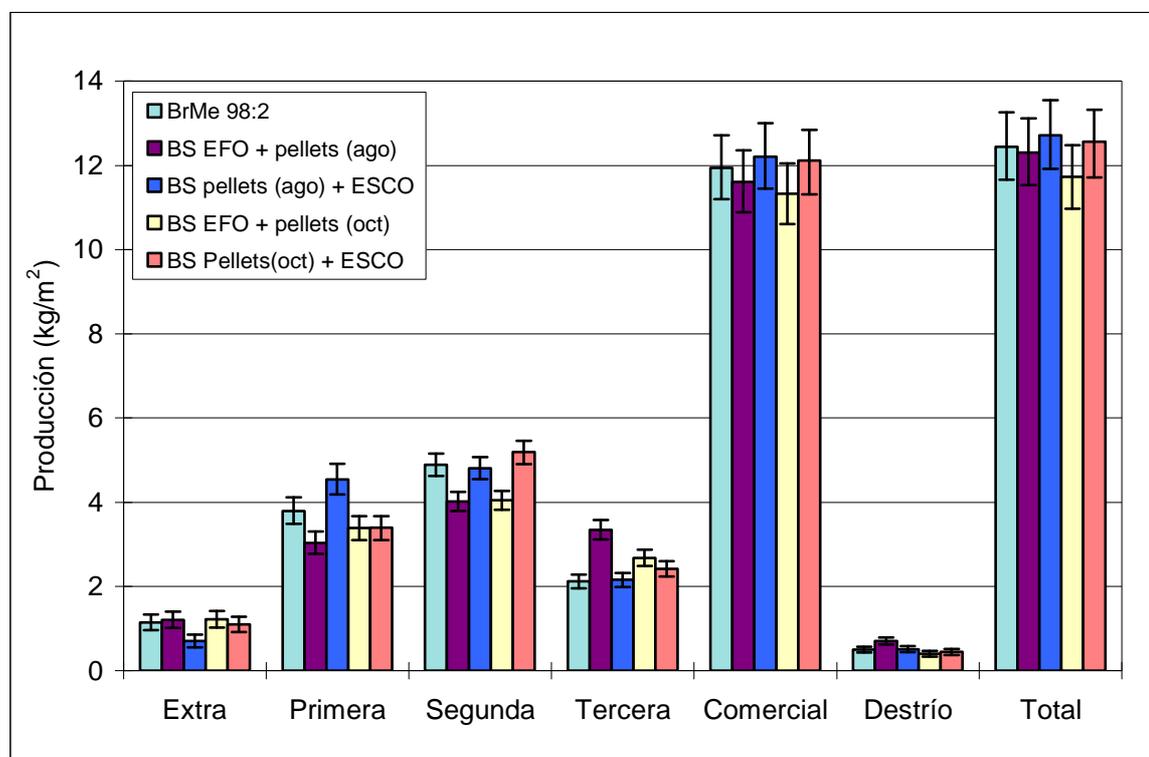
El debilitamiento de las oosporas de *P. capsici* bajo calentamiento subletal, constituye una observación útil que puede aplicarse en el control del patógeno mediante biosolarización. (Lacasa *et al.*, 2004). La combinación de temperaturas subletales con enmiendas orgánicas puede realizar un control de la enfermedad en regiones con condiciones climáticas adecuadas y calendarios de cultivo que no se ajusten a los calendarios normales de solarización.

## Desarrollo del cultivo

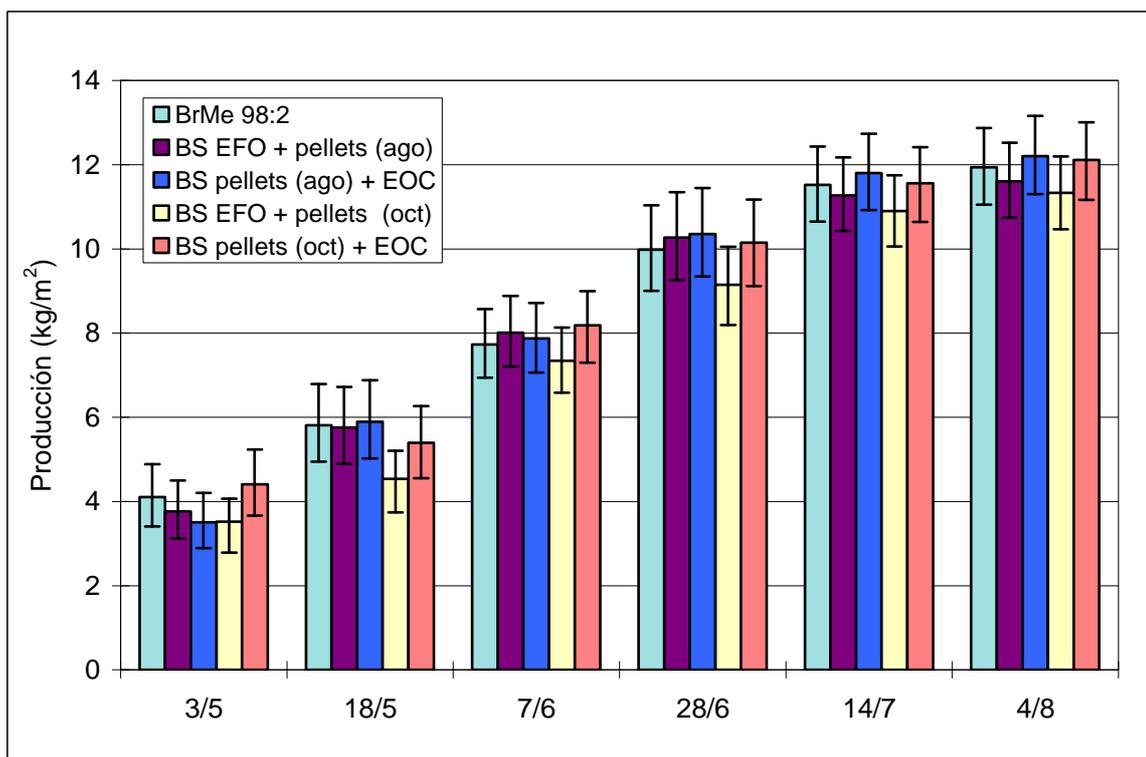
A continuación se muestran los resultados de los parámetros medidos que describen la influencia de la biosolarización sobre el desarrollo del cultivo.

### **Producción**

La producción final acumulada de cada una de las categorías obtenida para cada tratamiento se muestra en la Figura 5. La evolución de la producción comercial a lo largo del tiempo para cada tratamiento se muestra en la Figura 6



**Figura 5.** Producción final media por categorías comerciales. Intervalos LSD al 95% con los datos transformados con  $\text{Log}_{10}(x+1)$ .



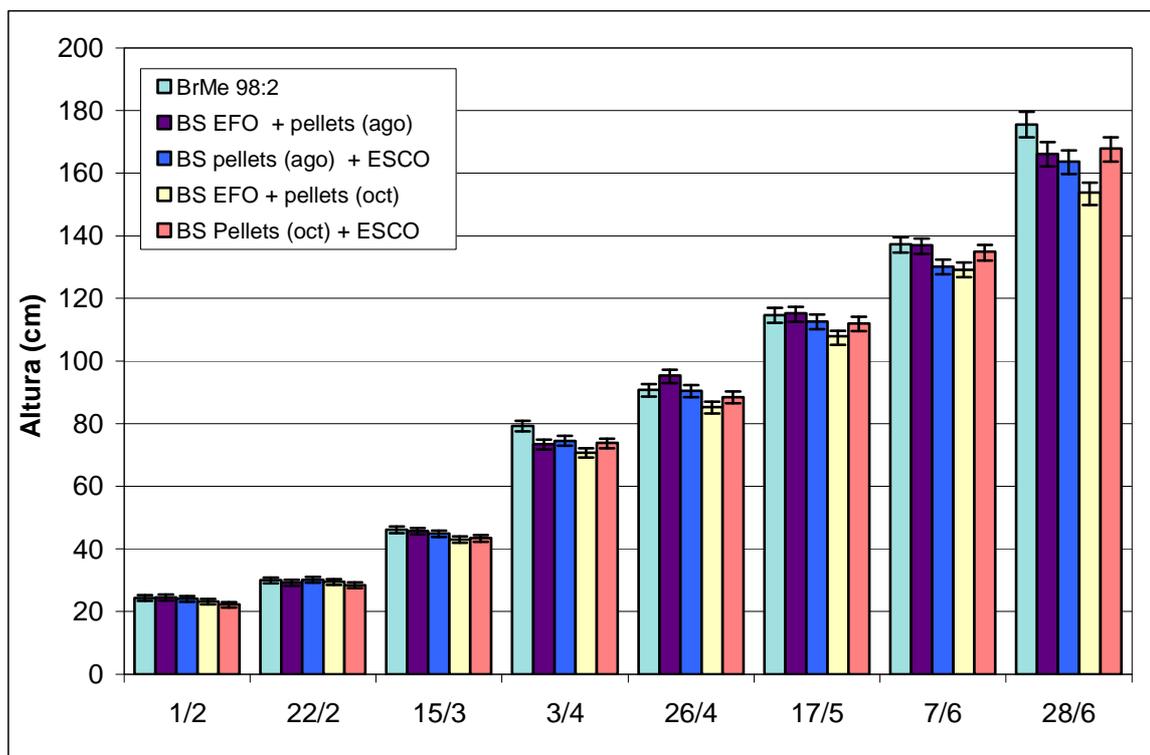
**Figura 6.** Evolución de la producción comercial media acumulada. Intervalos LSD al 95% con los datos transformados con  $\text{Log}_{10}(x+1)$ .

La capacidad productiva de las plantas cultivadas en las parcelas desinfectadas, ha sido similar en todos los tratamientos. Las plantas cultivadas en suelo biosolarizado han obtenido una producción comercial similar a la obtenida para el caso del bromuro de metilo. La producción se ha situado en torno a 12 Kg/m<sup>2</sup>.

Sin embargo, si se han encontrado mejoras en algunas categorías comerciales. El tratamiento con “pellets de *B. carinata*” realizado en agosto, más estiércol de ovino semi-compostado antes de plantar, ha proporcionado una producción de frutos de categoría extra, inferior al resto de tratamientos, siendo a su vez el tratamiento con mayor producción de frutos de primera.

## Desarrollo vegetativo de las plantas: altura.

La evolución de la altura media de las plantas se muestra la Figura 7.



**Figura 7.** Altura media a lo largo del tiempo. Intervalos LSD al 95% con los datos transformados con  $\text{Log}_{10}(x)$ .

Las parcelas desinfectadas con BM proporcionan plantas significativamente más altas que el resto de tratamientos.

La biosolarización con “pellets de *B. carinata* + EFO” realizada en octubre, proporcionó plantas significativamente más bajas que en parcelas desinfectadas con el desinfectante químico de referencia y que en las parcelas desinfectadas en agosto.

## CONCLUSIONES

La eficacia de la biosolarización sobre la viabilidad y sobre la capacidad infectiva de las oosporas de *Phytophthora capsici*, depende entre otros factores, de la fecha en que se realice la misma y de la profundidad a la que se evalúe, así como de la interacción entre ambas, tal y como han descrito anteriormente Lacasa *et al.* (2004). La desinfección mediante biosolarización a 15 cm de profundidad resulta independiente de la época de aplicación; agosto u octubre, mientras que a 30cm se muestra dependiente de la misma.

El tratamiento influye sobre la viabilidad y sobre la infectividad de *P. capsici* en la época de menor acumulación térmica, octubre. Todos los tratamientos han resultado eficaces en la reducción de la infectividad de *P. capsici* a 15 cm de profundidad, tanto en agosto como en octubre.

La homogeneidad de la eficacia de los tratamientos de biosolarización de octubre, en el rango de profundidad ensayado, se muestra deficiente. La reducción de la viabilidad, y de capacidad de infectar del inóculo de *P. capsici* a 30 cm de profundidad es inferior que en agosto.

La biosolarización con pellets de *B. carinata* solos es suficiente en agosto para reducir la viabilidad y la capacidad infectiva de las oosporas de *P. capsici*. En el mes de octubre se muestra insuficiente. El suplemento de estiércol fresco de ovino se hace necesario para aumentar la eficacia de la biosolarización, llegando a ser similar a la eficacia del bromuro de metilo a 15 cm de profundidad. En algunos tratamientos, aunque la viabilidad no se reduce significativamente, la infectividad si que lo hace. Es posible que aunque la biosolarización no reduzca totalmente la viabilidad, parte de las oosporas pierdan su capacidad infectiva.

La temperatura alcanzada en agosto a 15 cm de profundidad fue suficiente para eliminar la capacidad infectiva de *P. capsici*. Es probable que la eficacia de la biosolarización a 30 cm también se deba al efecto térmico. La temperatura no es el único parámetro responsable de la respuesta de pérdida de capacidad infectiva de *P. capsici* cuando es sometida a biosolarización.

Debido a gran variabilidad de las condiciones agroclimáticas en los ecosistemas agrarios, sería interesante realizar la reiteración de estos ensayos varios años, con el objetivo de constatar las hipótesis planteadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Angus, J.F; P.A. Gardner; J.A. Kirkegaard; J.M. Desmarchelier. 1994. Biofumigation: Isothiocyanates released from Brassica roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil* 162, 107-112.
- Bartual R., Marsal, J.I., Carbonel, A., Tello, J.C., Campos, T.1991. Genética de la resistencia *Phytophthora capsici* Leon. En pimiento. *Bol. San. Veg. Plagas* 17:1-124.
- Bello, A. López-Perez, J.A., Díaz Viruliche L. 2002. Biofumigación y solarización como alternativas al bromuro de metilo. En: J.Z. Castellanos, F. Guerra (Eds). *Memoria del Simposio Internacional de la Fresa*, Zamora 2000, INCAPA, México, 24-50.
- Blok, W.J., Lamers, J.G., Termorshuizen, A.J., Bollen, G.T. 2000. Control of soil-borne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology* 90, 253-259.
- Bollen GJ. Lethal temperatures of soil fungi. In: Parker CA, Rovira AD, Moore KJ, Wong PTW, Kollmorgen JF, editors. *Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens*. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society;1985. p. 191–3.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C., Scala F.2007. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amedments. *Journal of plant Pathology* 89(3):311-324.
- Bowers, J. H., Papavizas, G. C., Johnston, S. A. 1990. Effect of soil temperature and soil-water matric solarisat on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. *Plant Disease* 74: 771-77.
- Bowers, J.H., Mitchell, D.J. 1991. Relationship between ilnoculum level of *Phytophthora capsici* and mortality of pepper. *Phytopathology* 81: 178-184.
- Brown, P. D. & Morra, M. J. 1997. Control of soil-borne plant pest using glucosinolate-containing plant. *Advance in Agronomy*, 61, 167-231.
- Bulluck, L.R., Ristaino, J.B: 2002. Effect of synthetic and organic soil fertility amendments on southern blight, soil microbiological communities, and yield of processing tomatoes. *Phytopathology* 92: 181-189.

- Coelho, L., Chellemi, D. O., Mitchell, D. J. 1999 Efficacy of soil solarization and cabbage amendment for the control of *Phytophthora* spp. In North Florida. *Plant Disease* 83 : 293-99.
- Erwin, D.C., Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Estadística agrarian de la Region de Murcia, 2010. [www.carm.es](http://www.carm.es).
- Etxeberria, A., Mendarte, S., Larregla, S 2011. Thermal inactivation of *Phytophthora capsici* oospores. *Revista Iberoamericana de Micología* 2011:28(2):83-90.
- Fernández-Pavía, S. P., Grünwald, N. J., Díaz-Valasis, M., Cadena-Hinojosa, M. & Fry, W. E. (2004). Soilborne oospores of *Phytophthora infestans* in Central Mexico survive winter fallow and infect potato plants in the field. *Plant Disease*, 88, 29-33.
- Gamliel, A., Katan, J. 1991. Involvement of fluorescent *Pseudomonas* and other microorganisms in increased growth response of plants in solarized soils. *Phytopathology* 81: 494-502.
- Gamliel, A., Stapleton, J. J. 1993a Characterization of Antifungal Volatile Compounds Evolved from Solarized Soil Amended with Cabbage Residues. *Phytopathology* 83: 899-905.
- Gamliel, A., Austerweil, M. & Kritzman, G. (2000). Non-chemical approach to soilborne pest management – organic amendment. *Crop Protection*, 19, 847-853.
- Guerrero, M.M.; Guirao, P.; Lacasa, A.; Ros, C.; Torres, J.; Martínez, M.C.; Oncina, M.; Bielza, P.; Contreras, J. 2004. La mezcla de dicloropropeno y cloropicrina, una alternativa al bromuro de metilo en la desinfección de suelos para pimiento. En A. Lacasa, MM. Guerrero, M. Oncina y JA. Mora Eds. *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*. Publicaciones de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Jornadas 16: 99-128.
- Guerrero, MM.; Lacasa, A.; Ros, C.; Bello A.; Martínez MC.; Torres J.; Fernández, P. 2004a. Efecto de la biofumigación con solarización sobre los hongos del suelo y la producción: fechas de desinfección y enmiendas. En A. Lacasa, MM. Guerrero, M. Oncina y JA. Mora Eds. *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*. Publicaciones de

- la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Jornadas 16: 209-238.
- Guerrero, MM.; Lacasa, A.; Ros, C.; Martínez, MC.; López, JA.; Guirao, P.; Bello, A.; Torres, J.; Martínez, MC.; González, A. 2004b. La reiteración de la biofumigación con solarización en la desinfección de suelos de invernaderos de pimiento. En A. Lacasa, MM. Guerrero, M. Oncina y JA. Mora Eds. *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*. Publicaciones de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. Jornadas 16: 239-258.
- Guerrero, MM.; Ros, C.; Martínez, MA.; Barceló, N.; Martínez, MC.; Guirao, P.; Bello, A.; Contreras, J.; Lacasa, A. 2004c. Estabilidad en la eficacia desinfectante de la biofumigación con solarización en cultivos de pimiento. *Actas de Horticultura*, 42: 20-32.
- Guerrero, M.M., Ros, C., Guirao, P., Martínez, M.A., Martínez, M.C., Barceló, N., Bello, A., Lacasa, A. and López, J.A. 2005. Biofumigation plus solarisation efficacy for soil disinfestation in sweet pepper greenhouses in the Southeast of Spain. *Acta Horticulturae*. 698:293-297.
- Guerrero, M.M., Ros, C., Martínez, M.A., Martínez, M.C., Bello, A. and Lacasa, A. 2006. Biofumigation vs biofumigation plus solarisation to control *Meloidogyne incognita* in sweet pepper. *Bulletin OILB/srop* 29(4):313-318.
- Guerrero, M.M., Martínez, M.A., Ros, C., Bello, A., Fernández, P., Martínez, M.C. y Lacasa, A. 2007. Eficacia de la biosolarización como desinfectante del suelo en invernaderos de pimiento. *Actas de Horticultura* 48:451-454.
- Guerrero M.M., Lacasa C.M., Ros C., Martínez V., Fenoll J., Torres J., Beltrán C., Fernández P., Bello A., Lacasa A., 2009. Pellets de brasicas como enmiendas para biosolarización de invernaderos de pimiento. *Actas Horticultura* 54: 424-429.
- Guerrero M.M., Ros C., Lacasa C.M., Martínez V., Lacasa A., Fernández P., 2010. Effect of biosolarization using pellets of *Brassica carinata* on soil-borne pathogens in protected pepper crops. Proc. VIIth IS on Chem. and Non-Chem. Soil and Substrate Disinfestation. Eds. Gamliel et al. *Acta Horticulturae*. 883, ISHS 2010.

- Guirao, P., Guerrero, M.M., Ros, C., Lacasa, A., Beltrán, C., Martínez, M.C., Torres, J., Oncina, M. y Contreras, J. 2004. La reducción de dosis del bromuro de metilo en el cultivo de pimiento y el calendario de retirada. P.61-77. In: A. Lacasa, M.M. 341 Guerrero, M. Oncina and J.A. Mora (eds.), *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*, Vol. 16, Publicaciones de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, Región de Murcia.
- Hausbeck, M.K., Lamour, K.H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease* 88 (12): 1292-1303.
- Hoitink, H. A. J., Boehm, M. J. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:427–446.
- Jeffers, S.N., S.B. Martin. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*. 70:1038-1043.
- Jiang, J., Erwin, D.C. 1990. Morphology, plasmolysis, and tetrazolium bromide stain as criteria for determining viability of *Phytophthora* oospores. *Mycologia* 82: 107-113.
- Juarez-Palacios, C., Felix-Gastelum, R., Wakeman, R.J., Paplomatas, E.J. DeVay, J.E. 1991. Thermal sensitivity of three species of *Phytophthora* and the effect of soil solarization on their survival. *Plant Dis.* 75:1160-1164.
- Katan, J. 1981. Solar heating (solarisation) of soil control of soilborne pests. *Annu. Rev. Phytopathol.* 19: 211-236.
- Kirkegaard, J.A.; J.F. Angus; P.A. Gardner; H.P. Cresswell. 1993a. Benefits of *Brassica* break crops in the Southeast wheatbelt. *Proc. 7th Aust. Agron. Cons. Adelaide*, 19-24 Sept., 282-285.
- Kirkegaard, J. A.; J. Gardner; J. M. Desmarchelier; J. F Angus. 1993b. Biofumigation using *Brassica* species to control pest and diseases in horticulture and agriculture. In: N. Wrather; R. J. Mailes (Eds). *Proc. 9th Australian Research Assembly on Brassicas (Wagga Wagga)* . 77-82.
- Kirkegaard, J.A.; M. Sarwar. 1998. Biofumigation potential of *Brassicas*: I. variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown *Brassicas*. *Plant and Soil* 201, 71-89.

- Lazzeri L., Leoni O., Manici L.M., 2004. Biocidal plant dried pellets for biofumigation. *Industrial Crops and Products* 20: 59-65.
- Lacasa, A., Guerrero, M. M., Oncina, M. & Mora, J. A. (2004). *Desinfección de suelos en invernaderos de pimiento*, vol.16. (Murcia: Publicaciones de la Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua.)
- Lumsden R.D., 1980. A nylon fabric technique for studying the ecology of *Phytium aphanidermatum* and other fungi in soil. *Phytopathology* 71: 282-285.
- Martínez, M.A., Martínez, M.C., Bielza, P., Tello, J., Lacasa, A. Effect of biofumigation with manure amendments and repeated biosolarization on *Fusarium* density in pepper crops. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 37 (10). 2010.
- Matthiesen, J.N.; Kirkegaard J.A., 1993. Biofumigation, a new concept for 'clean and green' pest and disease control. *Western Australian Potato Grower*, October, 14-15.
- Pittis J.E., Shattock R.C., 1994. Viability, germination and infection potential of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 43: 387-396.
- Stapleton, J. J. (2000). Soil solarisation in various agricultural production systems. *Crop Protection*, 19, 837-841.
- Stapleton, J. J. & Bañuelos, G. S. (2009). Biomass crops can be used for biological disinfestation and remediation of soils and water. *California Agriculture*, 63, 41-46.
- Sokal, R. R., Rohlf, F. J., 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3<sup>rd</sup> edition. W. H. Freeman and Co. New York. 887pp.
- Tello, J., Varés, F, Lacasa, A. 1991. *Manual de laboratorio*. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. MAPA. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Madrid. 485pp.
- Tello, J.C.; A. Lacasa. 1997. Problemática fotosanitaria del suelo en el cultivo de pimiento en el Campo de Cartagena. In: A.López, J.A. Mora (Eds) *Posibilidad de alternativas viables al bromuro de metilo en pimiento de invernadero*, Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua de la Región de Murcia, Spain, Jornadas 11, 11-18.

- Tenuta, M., Lazarovits, G. 2002. Ammonia and Nitrous Acid from Nitrogenous Amendments Kill the Microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92:255-264.
- Tasao, P.H. y Ester, J.J: 1981. Relation of ammonia and nitrous acid to suppression of *Phytophthora* in soils amended with nitrogenous organic substances. *Phytopathology* 71:53-59.