

INDICE

	Resumen	
	Abstract	
	Resum	
I.	INTRODUCCIÓN	
1.	Desinfección de los suelos y sustratos: control de patógenos	1
1.1.	Utilización óptima de los métodos más comunes de desinfección de suelos	2
1.2.	Problemática del BM	4
1.3.	Alternativas al BM	9
1.3.1.	Alternativas químicas al BM	11
1.3.2.	Alternativas no químicas: solarización	17
1.3.2.1.	Beneficios adicionales de la solarización: incremento de crecimiento	21
1.3.2.2.	Solarización estructural	24
1.3.2.3.	Condiciones de la técnica	25
1.3.2.4.	Mecanismos para el control de enfermedades mediante solarización	26
1.3.2.5.	Limitaciones de la solarización	27
1.3.3.	Alternativas no químicas: biofumigación	28
1.3.3.1.	Condiciones de la técnica	32
1.3.3.2.	Materia orgánica y biofumigación	33
1.3.3.3.	Efectos de la biofumigación: problemática de los restos de cosechas	38
1.3.4.	Combinación de las técnicas expuestas	45
1.3.5.	Agentes de control biológico	54
1.3.5.1.	Principales agentes de control biológico	55
1.3.5.2.	Modos de acción y aplicación	62
2.	Patógenos ensayados	66
2.1.	<i>Ralstonia solanacearum</i>	66
2.1.1.	Caracterización bacteriana	68
2.1.2.	Ciclo del patógeno	72
2.1.3.	Sintomatología relacionada y patogenicidad	73
2.1.4.	Fuentes de inóculo, control y prevención	74
2.1.5.	Metodología de diagnóstico	81
2.2.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	83
2.2.1.	Caracterización bacteriana	84
2.2.2.	Ciclo del patógeno	85
2.2.3.	Sintomatología relacionada y patogenicidad	86
2.2.4.	Fuentes de inóculo, control y prevención	89
2.2.5.	Metodología de diagnóstico	93
2.3.	<i>Mycosphaerella brassicicola</i>	93

2.3.1.	Clasificación fúngica	94
2.3.2.	Ciclo del patógeno	94
2.3.3.	Sintomatología relacionada	95
2.3.4.	Fuentes de inóculo, control y prevención	96
II.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	99
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	
1.	Biofumigación y biosolarización en condiciones controladas	101
1.1.	Medios de cultivo y crecimiento de cepas bacterianas	101
1.1.1.	<i>Ralstonia solanacearum</i>	101
1.1.2.	<i>C.m.michiganensis</i>	102
1.2.	Reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco	103
1.3.	Inoculación en plantas de tomate: infección controlada	105
1.3.1.	Técnica serológica <i>Double Antiserum Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (DAS-ELISA)	106
1.4.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	109
1.5.	Tratamiento en macetas: adición de restos de tomate como enmienda orgánica	110
1.5.1.	Diseño de la experiencia de biofumigación y biosolarización en condiciones de invernadero	110
1.5.2.	Análisis estadísticos	113
1.6.	Introducción y recuperación de cepas bacterianas en sustratos infectados artificialmente	114
1.7.	Determinación de la supervivencia de los patógenos en asociación con tejidos vegetales	116
1.8.	Identificación de aislados bacterianos mediante PCR y secuenciación	118
2.	Biocontrol de <i>Mycosphaerella brassicicola</i> : efecto de diferentes tratamientos sobre restos de coles de Bruselas	122
2.1.	Experiencia en campo	122
2.2.	Aplicación de tratamientos	128
2.3.	Muestreos y procesamiento de muestras	129
2.4.	Conteo de esporas	130
2.4.1.	Análisis estadísticos	131
2.5.	Cuantificación de ADN: PCR en tiempo real	131
2.5.1.	Procesado de muestras	131
2.5.2.	Extracción de ADN	132
2.5.3.	PCR en tiempo real	132
2.5.4.	Análisis estadísticos	133
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1.	<i>Clavibacter michiganensis</i> subs. <i>michiganensis</i>	135
1.1.	Crecimiento en placa y test de patogenicidad en tabaco	135

1.2.	Inoculación artificial en plantas de tomate: sintomatología asociada	137
1.3.	Microscopía electrónica de barrido de tallos de tomate inoculados artificialmente	139
1.4.	Diseño de la experiencia de biofumigación y biosolarización en condiciones de invernadero	142
1.4.1.	Tratamiento de biofumigación en macetas: 25 °C	142
1.4.2.	Tratamiento de biosolarización en macetas: 45 °C	152
1.5.	Introducción y recuperación de <i>C.m.michiganensis</i> en sustratos infectados artificialmente	158
1.6.	Determinación de la supervivencia de <i>C.m.michiganensis</i> en asociación con tejidos vegetales	164
2.	<i>Ralstonia solanacearum</i>	169
2.1.	Crecimiento en placa y test de patogenicidad en tabaco	169
2.2.	Inoculación artificial en plantas de tomate: sintomatología asociada	172
2.3.	Microscopía electrónica de barrido de tallos de tomate inoculados artificialmente	174
2.4.	Diseño de la experiencia de biofumigación y biosolarización en condiciones de invernadero	176
2.4.1.	Tratamiento de biofumigación en macetas: 25 °C	176
2.4.2.	Tratamiento de biosolarización en macetas: 45 °C	181
2.5.	Introducción y recuperación de <i>R. solanacearum</i> en sustratos infectados artificialmente	184
2.6.	Determinación de la supervivencia de <i>R. solanacearum</i> en asociación con tejidos vegetales	188
3.	Biofumigación y biosolarización en el control de bacterias fitopatógenas: discusión general	189
4.	Efecto de diferentes tratamientos sobre restos de coles de Bruselas para el control de la enfermedad de mancha en anillo causada por <i>Mycosphaerella brassicicola</i>	192
4.1.	Experiencia en campo	192
4.1.1.	Lesiones en hojas	193
4.1.2.	Conteo de esporas	196
4.1.3.	Cuantificación de ADN: PCR en tiempo real	199
4.1.4.	Descomposición de las hojas en función de los tratamientos	202
4.1.5.	Efectos observados en los packs de hojas ensayados	203
4.2.	Control de <i>M. brassicicola</i> en restos de coles de Bruselas: Discusión general	204
V.	CONCLUSIONES	209
	CONCLUSIONS	213
VI.	BIBLIOGRAFÍA	217

VII.	ANEJOS	
1.	Identificación de muestras del trabajo en campo	257
2.	Volumen de suspensión aplicada por pulverización y tratamiento	265
3.	Estudio de lesiones en hojas	267
4.	Conteo de esporas	279
5.	Resultados de cuantificación por Taqman PCR	297
6.	Tabla resumen de resultados del ensayo en campo	301

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Calendario para la eliminación del uso de bromuro de metilo como fumigante de suelos acordado en septiembre de 1997	5
Tabla 2	Cultivos con mayor consumo de BM en España en el año 1995	7
Tabla 3	BM concedido como usos críticos para España en el año 2005	8
Tabla 4	BM concedido como usos críticos para España en el año 2008	9
Tabla 5	Alternativas al bromuro de metilo y su empleo en España	10
Tabla 6	Compuestos encontrados asociados a plantas de tomate	44
Tabla 7	Algunas alternativas al BM ensayadas durante los últimos años en España	51
Tabla 8	Aplicación de control biológico en algunas investigaciones realizadas en España	60
Tabla 9	Principales huéspedes de <i>R. solanacearum</i>	67
Tabla 10	Características bioquímicas y fisiológicas de <i>R. solanacearum</i>	69
Tabla 11	Incidencia de la enfermedad, expresada en porcentaje de plantas mostrando resultado positivo por DAS-ELISA a la presencia de <i>C.m.michiganensis</i> tras las semanas de tratamiento a 25 °C	147
Tabla 12	Resultados obtenidos del análisis de la varianza de los valores medios de la incidencia de la enfermedad para los factores dosis de material infectado, semanas de duración del tratamiento térmico y tipo de macetas (abiertas o cerradas), así como para sus interacciones, para los tratamientos a 25 °C.	150
Tabla 13	Resultados obtenidos mediante la realización de la prueba de Fisher (LSD con $P < 0,05$) para los diferentes factores considerados en los tratamientos a 25 °C: dosis, tipo de macetas (NB=sin bolsa, B=con bolsa) y semanas de tratamiento, transcurridos 40 días tras el trasplante. Las medias representan la incidencia de la enfermedad según el porcentaje de plantas afectadas por <i>C.m.michiganensis</i> .	151
Tabla 14	Incidencia de la enfermedad, expresada en porcentaje de plantas mostrando resultado positivo por DAS-ELISA a la presencia de <i>C.m.michiganensis</i> tras las semanas de tratamiento a 45 °C	153

Tabla 15	Resultados obtenidos del análisis de la varianza de los valores medios de la incidencia de la enfermedad para los factores dosis de material infectado, semanas de duración del tratamiento térmico y tipo de macetas, así como para sus interacciones	154
Tabla 16	Resultados obtenidos mediante la realización de la prueba de Fisher (LSD con $P < 0,05$) para los diferentes factores considerados en los tratamientos a 45 °C: dosis, tipo de macetas (NB=sin bolsa, B=con bolsa) y semanas de tratamiento, transcurridos 40 días tras el trasplante. Las medias representan la incidencia de la enfermedad según el porcentaje de plantas afectadas por <i>C.m.michiganensis</i>	155
Tabla 17	Promedio del conteo de colonias de <i>C.m.michiganensis</i> procedentes del sustrato tratado tras un periodo de 6 semanas a 25°C	159
Tabla 18	Incidencia de la enfermedad, expresada en porcentaje de plantas mostrando resultado positivo por DAS-ELISA a la presencia de <i>R. solanacearum</i> tras las semanas de tratamiento a 25 °C	177
Tabla 19	Resultados obtenidos del análisis de la varianza de los valores medios de la incidencia de la enfermedad para los factores dosis de material infectado, semanas de duración del tratamiento térmico y tipo de macetas (abiertas o cerradas), así como para sus interacciones, para los tratamientos a 25 °C contra <i>R. solanacearum</i>	179
Tabla 20	Resultados obtenidos mediante la realización de la prueba de Fisher (LSD con $P < 0,05$) para los diferentes factores considerados en los tratamientos a 25 °C: dosis, tipo de macetas (NB=sin bolsa, B=con bolsa) y semanas de tratamiento, transcurridos 40 días tras el trasplante. Las medias representan la incidencia de la enfermedad según el porcentaje de plantas afectadas por <i>R. solanacearum</i>	180
Tabla 21	Promedio del conteo de colonias de <i>R. solanacearum</i> en el sustrato tras un periodo de 6 semanas a 25°C	184
Tabla 22	Diferencia de superficie dañada (mm ²) en las hojas transcurrido un mes desde los diferentes tratamientos (T1)	196
Tabla 23	Comparación de esporulación entre lesiones de hojas procedentes de distintas localidades	198
Tabla 24	Diferencia de ascosporas ($\log(x+1)$ donde x es el número de esporas por mm ²) en las muestras sometidas a distintos tratamientos	199
Tabla 25	Diferencia en la cuantificación de ADN de <i>M. brassicicola</i> para los diferentes tratamientos para T1	201
Tabla 26	Ascosporas y cuantificación de ADN en las diferentes posiciones de los packs	204

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	(A) Solarización. (B) Quema de restos en campos de chufa (<i>Cyperus sculentum</i>) (B) localizados ambos en la provincia de Valencia	20
Fig. 2	Cromatografía de gases de aceites esenciales en hojas de tomate	43
Fig. 3	Distribución mundial de <i>Ralstonia solanacearum</i>	68
Fig. 4	Distribución mundial de <i>Clavibacter michiganensis</i> subs. <i>michiganensis</i>	85
Fig. 5	Método de las diluciones seriadas	104
Fig. 6	Preparación de los lotes de macetas para ser sometidas a los tratamientos térmicos	112
Fig. 7a	Esquema de la introducción y recuperación semanal de cepas bacterianas en sustratos infectados artificialmente	117
Fig. 7b	Esquema de la supervivencia de los patógenos en asociación con tejidos vegetales	118
Fig. 8	Mapa de Holanda	123
Fig. 9	Parrillas preparadas con 4 hojas y “pack” de 7 hojas	124
Fig. 10	Esquema de tratamiento en campo	125
		126
		127
Fig. 11	Aspecto de las colonias de <i>C.m.michiganensis</i> en D2	136
Fig. 12	Avance de la respuesta hipersensible de <i>C.m.michiganensis</i> en plantas de tabaco, en las condiciones de ensayo en invernadero. A: avance de síntomas transcurrido 1 día desde la inoculación. B: estado de la zona infiltrada transcurridos 4 días desde la inoculación	136
Fig. 13	Plantas de tomate con síntomas de chancros observados tras la inoculación de <i>C.m.michiganensis</i>	138
Fig. 14	Imágenes observadas por microscopía electrónica de barrido de una sección transversal de un tallo infectado de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) colapsado por masas bacterianas. A: Masas bacterianas emanando desde los vasos conductores obstruidos B: Bacterias bloqueando los vasos xilemáticos	140
Fig. 15	Diferencia de crecimiento observada entre plantas del lote 0 (sin ningún tipo de tratamiento térmico) crecidas sobre sustrato conteniendo restos de tomate sanos y plantas sobre sustrato con restos de tomate infectados	143
Fig. 16	Comparación de raíces de plantas de tomate crecidas sobre sustratos conteniendo distintas dosis de restos de tomate infectados con <i>C.m.michiganensis</i> y detalle de daños ocasionados en raíces de plantas crecidas sobre sustratos con 15g de material infectado en comparación con raíces de plantas totalmente sanas	144

Fig. 17	Comparación de daños observados en raíces de plantas de tomate dependiendo de la forma de penetración del patógeno, de izquierda a derecha: por contacto directo con sustrato infectado o por inoculación infiltrando las axilas de las hojas y con una raíz de planta sana	146
Fig. 18	Efecto de los tratamientos a 25 °C en la incidencia final de la enfermedad, expresada como porcentaje de plantas de tomate infectadas por <i>C.m.michiganensis</i> en macetas encerradas en bolsas de plástico (B) y en macetas sin bolsa (NB) a los 40 días del trasplante. Los histogramas representan el porcentaje de infección obtenido en cuatro repeticiones por tratamiento y dosis de material vegetal infectado e incorporado	149
Fig. 19	Efecto de los tratamientos a 45 °C en la incidencia final de la enfermedad, expresada como porcentaje de plantas de tomate infectadas por <i>C.m.michiganensis</i> en macetas encerradas en bolsas de plástico (B) y en macetas sin bolsa (NB) a los 40 días del trasplante. Los histogramas representan el porcentaje de infección obtenido en cuatro repeticiones por tratamiento y dosis de material vegetal infectado e incorporado	154
Fig. 20	Rhizopus creciendo en placa de YDA sembrada con 100µl de la dilución 10 ⁵ del sustrato tratado durante 4 semanas a 45 °C	161
Fig. 21	Crecimiento de colonias bacterianas diferentes a <i>C.m.michiganensis</i> en los medios de crecimiento tras los tratamientos térmicos a 25 °C y 45 °C	163
Fig. 22	Efecto del tratamiento térmico a 25 °C en la dinámica poblacional de <i>C.m.michiganensis</i> y otras colonias de bacterias en los medios nutritivos ensayados (YDA y D2)	164
Fig. 23	Reacción de antibiosis observada bajo lupa y SEM en placas de YDA. La bacteria responsable de la inhibición de crecimiento (A) se identificó como <i>Bacillus subtilis</i> (A: <i>Bacillus subtilis</i> ; B: zona de inhibición de crecimiento) y zona de inhibición observada por SEM (C: colonia bacteriana; D: zona de inhibición causada por <i>Bacillus subtilis</i>)	168
Fig. 24	Antagonismo <i>in Vitro</i> entre <i>Bacillus subtilis</i> y <i>C.m.michiganensis</i> . <i>B. subtilis</i> se aplicó en la placa de KB a partir de una gota de 5µl de una suspensión del cultivo puro (10 ⁷ cfu ml ⁻¹). Tras 48h de crecimiento a 28 °C una suspensión de <i>C.m.michiganensis</i> (10 ⁷ cfu ml ⁻¹) fue pulverizada sobre las placas. Tras 24h se observaba la reacción	169
Fig. 25	Aspecto de las colonias de <i>R. solanacearum</i> observadas en YDA (A y B) y en TTC (C y D)	170

Fig. 26	Avance de la respuesta hipersensible de <i>R. solanacearum</i> en plantas de tabaco, en las condiciones de ensayo. A: avance de síntomas transcurrido 1 día desde la inoculación. B: estado de la zona infiltrada transcurridos 4 días desde la inoculación	172
Fig. 27	Plantas de tomate con síntomas observados tras la inoculación de <i>R. solanacearum</i>	174
Fig. 28	Imágenes observadas por microscopía electrónica de barrido de una sección transversal de un tallo infectado de tomate inoculado con <i>R. solanacearum</i> . A: se observan vasos obstruidos B: se observan vasos obstruidos y desprendimiento de tejido en la parte inferior derecha debido a la degradación de los tejidos.	175
Fig. 29	Efecto de los tratamientos a 25 °C en la incidencia final de la enfermedad, expresada como porcentaje de plantas de tomate infectadas por <i>R. solanacearum</i> en macetas sin bolsa (NB) y en macetas encerradas en bolsas de plástico (B) a los 40 días del trasplante	178
Fig. 30	Efecto de los tratamientos a 45 °C en la incidencia final de la enfermedad, expresada como porcentaje de plantas de tomate infectadas por <i>R. solanacearum</i> en macetas encerradas en bolsas de plástico (B) y en macetas sin bolsa (NB) a los 40 días del trasplante	182
Fig. 31	Crecimiento de colonias bacterianas diferentes a <i>R. solanacearum</i> en los medios de crecimiento tras los tratamientos térmicos a 25 °C y 45 °C	185
Fig. 32	Efecto del tratamiento térmico a 25 °C en la dinámica poblacional de <i>R. solanacearum</i> y del resto de colonias de bacterias observadas en los medios nutritivos ensayados (YDA y TTC)	187
Fig. 33	Esporas de <i>M. brassicicola</i> observadas en el microscopio óptico (20 x 1,25)	193
Fig. 34	Lesiones de mancha en anillo, causadas por <i>M. brassicicola</i> , observadas en hojas procedentes de las localidades A (campo biológico) y B (campo tradicional)	194
Fig. 35	Estimación de la superficie dañada por localidad. Los valores para T0 (sin ningún tratamiento) y para T1 (diferentes tratamientos y control) se muestran juntos	195
Fig. 36	Resultados de la cuantificación de ADN de <i>M. brassicicola</i> (fg ADN mg ⁻¹ de peso seco) por localidad. Los valores para T0 (sin ningún tipo de tratamiento) y para T1 (diferentes tratamientos y control) se muestran conjuntamente	200
Fig. 37	Relación entre las cantidades de ADN (fg mg ⁻¹) y la superficie dañada en las hojas afectadas (mm ²)	202
Fig. 38	Porcentaje de descomposición de las hojas tras un mes de la aplicación de los tratamientos	203

ABREVIATURAS

BM	Bromuro de metilo
cc	Centímetros cúbicos
cm	Centímetro
d	Día
DAS-ELISA	Double Antiserum Sándwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPS	Exapolisacáridos o Polisacáridos extracelulares
g	Gramo
h	Hora
ha	Hectárea
HR	Respuesta hipersensible
IM	Ioduro de metilo
IPM	Integrated Pest Management
kg	Kilogramo
LSD	Least Significant Difference
m	Metro
MBTOC	Methyl Bromide Technical Option Committee
ml	Mililitro
min	Minuto
mm	Milímetros
nm	Nanometro
OEPP/EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Polietileno
PIC	Cloropicrina
PM	Protocolo de Montreal
tn	Tonelada
TSA	Trypticase Soy Agar
TTC	Cloruro de Trifenil Tetrazolio
UFC/cfu	Unidades formadoras de colonias
VBNC	Viable no cultivable
VIF	Film Virtualmente Impermeable
v/v	Relación volumen volumen
YDA	Yeast Dextrose Agar
°C	Grados centígrados
1,3-D	1,3-Dicloropropeno
µl	Microlitro
µm	Micras

