



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y FORMACIÓN AGRARIA Y PESQUERA**

**TESIS DOCTORAL**

**“Evaluación de la eficacia de tratamientos de desinfección de suelo en el control de hongos patógenos en el cultivo de la fresa, en las condiciones de cultivo de la provincia de Huelva”**

**D. Manuel Chamorro Rodríguez**

**Directora:**

**Dra. Berta de los Santos García de Paredes**

**Tutora:**

**Dra. Carolina Sousa Martín**

**Sevilla, 2014**





**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y FORMACIÓN AGRARIA Y PESQUERA**

**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**“Evaluación de la eficacia de tratamientos de desinfección de suelo en el control de hongos patógenos en el cultivo de la fresa, en las condiciones de cultivo de la provincia de Huelva”**

Tesis presentada por Manuel Chamorro Rodríguez en satisfacción de los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla. Dirigida por: Dña. Berta de los Santos García de Paredes, Investigadora del IFAPA Centro de Las Torres-Tomejil (Sevilla) y como Tutora; Dña. Carolina Sousa Martín, Investigadora de la Universidad de Sevilla en la facultad de farmacia (departamento de parasitología y microbiología).

**Doctorando**

**D. Manuel Chamorro Rodríguez**

**VºBº - directora:**

**Dra. Berta de los Santos García de Paredes**

**Tutora:**

**Dra. Carolina Sousa Martín**



Dña. Berta de los Santos García de Paredes, Investigadora del IFAPA Centro de Las Torres-Tomejil (Sevilla) Investigadora del Área de Producción Ecológica y Recursos Naturales del IFAPA en el departamento de fitopatología en el Centro “Las Torres-Tomejil”, en calidad de directores de esta Tesis Doctoral; y Dña. Carolina Sousa Martín, Investigadora de la Universidad de Sevilla en la facultad de farmacia (departamento de parasitología y microbiología), en calidad de Tutor;

**AUTORIZAN** a Manuel Chamorro Rodríguez, Ldo. en Biología, para la presentación del trabajo con el título “Evaluación de la eficacia de tratamientos de desinfección de suelo en el control de hongos patógenos en el cultivo de la fresa, en las condiciones de cultivo de la provincia de Huelva”, ha realizado bajo su dirección y tutorización para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, dan su conformidad para la presentación de la referida Tesis en la Universidad de Sevilla.

Sevilla, a                      de 2014.

Fdo.: Dr. Berta de los Santos García de Paredes

Fdo.: Dr. Carolina Sousa Martín



*A las tres mujeres de mi vida,*

*padre y abuelo...*



## AGRADECIMIENTOS

Llegó el momento por el que tanto he luchado y por el que tanto nos hemos esforzado, en plural porque esta tesis no es solo mía, sino de todos los que han estado a mi lado. Recuerdo con una sonrisa en la cara, una primavera de 2010, el día que tuve que decidir entre, seguir en una empresa que había empezado recientemente o una beca de 4 años que no sé muy bien cómo acabaría, eligiendo finalmente lo que mi abuela me decía que era lo más importante ... los estudios, es decir, mi doctorado. En esta tesitura entre elegir una empresa internacional o hacer la tesis sin saber lo que me iba a deparar el futuro, es donde entra mi primer agradecimiento a D. Enrique Figueroa, que me recomendó que si quería aprender, este era mi momento.

Uno de los agradecimientos más especiales tiene que ser a la persona que me eligió, me ha asesorado y ayudado en todo lo que ha estado en su mano a la hora de hacer la tesis, mi directora, jefa y amiga Berta de los Santos. Todo el departamento de fitopatología de las Torres, del grupo de D. Fernando Romero, que me ha ayudado a la hora de tomar decisiones y aconsejado mucho y bien, sobre todo lo relacionado con mi tesis y el mundo agrícola. María del Carmen Gómez (mi Mari, si hubieras esperado cuatro años más ...), Olga Gómez (mi morena, como nos lo hemos pasado juntos estos 4 años, si no fuera por tí...), Esther Rodríguez (Esthercita, pedazo de trabajadora ... me has ayudado muchísimo con esta tesis). Agradecer a todo el personal de las torres en las que más que trabajadores hemos sido amigos, Maria del Carmen (teléfono), Jorge (como me he reído contigo), Miguel Ángel (mira el tonto, leyendo una tesis☺), Ana Aguado (gran amiga y mejor consejera), Mari Carmen Sánchez, Irene, Maria José Basallote, Nieves Capote, Ana María (cuatro años juntos que hemos sido buenos amigos, espero seguir siéndolo contigo como doctores), Clemente (mi cari y nuestras estancias IFAPA) y todos los becarios IFAPA y el grupo koala.

A mis compañeros de El cebollar, en mi primer viaje hacia la finca, mi jefa me dijo: “este camino te lo sabrás de memoria”, pues ... creo que si cierro los ojos sería capaz de llega. Cuando llegue a mi segunda casa, me encontré a un grupo de trabajadores INCREIBLES, viven el trabajo, luchan por él y lo más importante, creen en él. D. Juan Jesús Medina, creo que habrá poca gente en el mundo que sepa más del cultivo de la fresa, muchas gracias por todo lo que he aprendido a tu lado y espero seguir aprendiendo. Los siguientes son dos personas muy especiales para mí en mi tesis,

porque creo que junto a mi jefa y Fernando Romero, han sido las dos personas que más me han enseñado del cultivo de la fresa, Don Pedro Domínguez y Don Luís Miranda, que para mí más que trabajadores son amigos, con los que he podido contar, un Lunes que un Domingo cuando tenía cualquier duda, ahí estaban ellos. Agradecer también a TODO el personal de El cebollar y que sin ellos tampoco habría sido posible hacer esta tesis.

Recuerdo como a finales de Septiembre 2012, una vez concluido el congreso de la SEF, tenía una estancia que me cambió la vida, University of Florida. Iba a un sitio donde no sabía qué me iba a encontrar, en medio de la nada, sin mucho nivel de inglés y algunos problemas familiares y personales, pero sigo creyendo que ha sido una de las experiencias de mi vida, que más me ha enseñado laboral y personalmente. I met to my other family in Florida ... my mom, Lorna Carter, what would I had done without her? She has been the star that I followed up and have learnt a lot of things from her: Songs at the church, going to the mass every Sunday, charity, humble, to sum up one of the best person that I have known and will know in my whole life (This include all carter's family: My dad, Mallory, Courtney and Justin). My boss and friend, Natalia Peres, I would like to say, thank you so much, for giving me the opportunity to join at GCREC. Until I arrived Natalia made easier my intership over there, helping me in all from looking a partner to play tennis to make that her husband (Renato) took me to surf in hurricanes season ... and I cannot forget my future girl Mariana, so pretty as Luca, so sweet. Jim Mertely, Do you know how much I have learnt from you? So much, you are a really hard worker and hope I could keep working together, in GCREC. Teresa Seijo, thank you for giving me too many ideas and be patient with me when I tried to understand a protocol or whatever. Achour, thank you for help me with some articles. My friends and brothers in Florida, Justin (you still have a long way to know how to play ping pong well, I'll teach you, no worries), Leandro (my bro, without you, Florida it wouldn't had been Florida). Adrian (Buena gente!!), Tomas Hasing and Bo Botond were a good tennis players and better friends of mine. Thanks all Phytopathology member of GCREC.

Estos dos últimos párrafos, son esenciales e imprescindible para la culminación de la tesis, mis dos mejores amigos, uno en el extranjero y otro en Sevilla, como me acuerdo de uno de mis hermanos, que se fue a Londres a aprender inglés y ya lleva más de 5 años, Pedro Jesús Sayago, gracias por estar ahí cuando te he necesitado y que tan

buenos momentos hemos pasado juntos (los mejores de mi vida). Kike, hermano ... que digo de tí? Gracias, gracias y gracias, por enseñarme lo que la palabra amistad means, por no dejarme dormir ni un fin de semana, por darme esos domingo de fútbol con el agujetas, por todos los años que llevamos riéndonos y la tranquilidad con la que vamos a todos sitios, que tanto mosquea a mamá y a nuestra hermana. Los grupos de club y agujetas, buenos amigos. También recordar a la persona que tanto me enseñó y ayudó, Rebecca, gracias por todo.

Quería dejar lo mejor para el final ... Mi familia, aunque no somos la típica familia de 30 personas, dicen que las grandes esencias se guardan en frascos pequeños, pues eso creo que pasa con mi familia, gracias Tito, gracias primos, GRACIAS PAPÁ (si algún día supiera la mitad que tú, estaría orgulloso de mí mismo, te quiero ☺), gracias yankito ☺, no sabes cuánto te echo de menos ... y gracias a una de las personas más especiales en mi vida y que desafortunadamente se fue ... Mi ABUELO (el goleada), cuánto me has enseñado y cuánto me parezco a tí. Por último agradecer a las 3 mujeres de mi vida ... mi GERSITA (es media vida mía, no habrá nadie que me quiera cómo ella, seguro), y las 2 mujeres que querré más que a nadie en el mundo mi ABUELA y mi MADRE, que pena la gente que piensa, que ser madrero es malo, yo me pregunto, ¿Hay algo más bonito, que querer a tú madre? !!!!!!!!!!! Orgulloso de ser madrero y abuelero !!!!!!!!!!! OS QUIERO.

Espero que la palabra que más se haya repetido sea gracias, porque si no para mi esta sección sería un fracaso, seguro que olvidaré a alguien, pero de corazón, GRACIAS A TODOS.

## INDICE GENERAL

	Pág.
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>V</b>
<b>INDICE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIII</b>
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>1</b>
1.1. – El cultivo de la fresa. ....	1
1.1.1. – <i>Historia del cultivo.</i> ....	1
1.1.2. – <i>Importancia del cultivo.</i> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.2. – Desinfestación de suelo. ....	5
1.2.1. - <i>Situación actual de los desinfestantes químicos.</i> .....	6
1.2.2. - <i>Desinfestaciones de tipo no químicas como alternativas al BM.</i> .....	10
1.3.- <i>Macrophomina phaseolina, agente causal de podredumbre carbonosa en fresa</i> 15	
1.4. – Objetivos.....	<b>2¡Error! Marcador no definido.</b>
1.5. – Estructura de la tesis .....	24
1.6. - Bibliografía.....	25
<b>CAPITULO 2. EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DE BIOSOLARIZACIÓN PARA EL CONTROL DE PODREDUMBRE CARBONOSA (AGENTE CAUSAL: MACROPHOMINA PHASEOLINA) EN FRESAS.</b> .....	<b>35</b>
2.1. - Resumen / Abstract.....	35
2.2. – Introducción. ....	37
2.3. - Materiales y métodos.....	42
2.3.1. - <i>Parcela experimental.</i> .....	42
2.3.2. - <i>Diseño experimental y descripción de los tratamientos.</i> .....	43
2.3.3. - <i>Determinación de las poblaciones de M. phaseolina en el suelo.</i> .....	47
2.3.4. - <i>Determinación de la incidencia de podredumbre carbonosa en campo.</i> ...	49
2.3.5. - <i>Influencia de los tratamientos en los rendimientos de cultivo.</i> .....	50
2.3.6. - <i>Registro de datos meteorológicos.</i> .....	50
2.3.7. - <i>Análisis estadísticos.</i> .....	50
2.4. – Resultados. ....	51
2.4.1. - <i>Determinación de las poblaciones de M. phaseolina en suelo.</i> .....	51
2.4.2. - <i>Incidencia de podredumbre carbonosa.</i> .....	52
2.4.3. - <i>Influencia de los tratamientos en los rendimientos de cultivo.</i> .....	56
2.5. - Discusión .....	57
2.6. - Bibliografía.....	61

**CAPITULO 3. EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS QUÍMICOS Y DE BIOSOLARIZACIÓN PARA EL CONTROL DE MACROPHOMINA PHASEOLINA EN EL CULTIVO DE LA FRESA. .... 67**

3.1. - Resumen / Abstract.....	67
3.2. – Introducción, .....	68
3.2.1. - <i>Situación actual de los fumigantes químicos</i> .....	69
3.2.2. - <i>M. phaseolina, agente causal de podredumbre carbonosa en el cultivo de la fresa</i> .....	70
3.3. - Materiales y métodos.....	71
3.3.1. - <i>Historial y características de las fincas experimentales.</i> .....	71
3.3.2. - <i>Diseño experimental y descripción de los tratamientos.</i> .....	73
3.3.3. - <i>Determinación de la población de M. phaseolina, en suelo</i> .....	77
3.3.4. - <i>Efecto de los tratamientos en la podredumbre carbonosa de fresa.</i> .....	77
3.3.5. - <i>Efecto de los tratamientos en la producción comercial de fresa.</i> .....	77
3.3.6. - <i>Análisis estadísticos.</i> .....	78
3.4. – Resultados. ....	78
3.4.1. - <i>Efecto de los tratamientos en la población de M. phaseolina en suelo.</i> .....	78
3.4.2. - <i>Mortalidad de plantas e incidencia de podredumbre carbonosa.</i> .....	79
3.4.3. - <i>Efecto de los tratamientos en la producción de fresa.</i> .....	82
3.5. – Discusión.....	82
3.6. – Bibliografía. ....	85

**CAPITULO 4. EVALUACION DE LA RESISTENCIA DE CULTIVARES DE FRESA A MACROPHOMINA PHASEOLINA, AGENTE CAUSAL DE PODREDUMBRE CARBONOSA. .... 89**

4.1. - Resumen. ....	89
4.2. - Introducción.....	90
4.3. - Materiales y métodos.....	91
4.3.1. - <i>Inoculación de M. phaseolina en condiciones controladas.</i> .....	91
4.3.2. - <i>Ensayo de campo, en parcelas naturalmente infestadas con M. phaseolina.</i> .....	93
4.3.2.1. - <i>Determinación de la población de M. phaseolina en suelo</i> .....	93
4.3.2.2. - <i>Determinación de la incidencia de podredumbre carbonosa en campo.</i> .....	94
4.3.3. - <i>Análisis estadístico.</i> .....	94
4.4. - Resultados.....	94
4.4.1. - <i>Incidencia de la podredumbre carbonosa en la inoculación de M. phaseolina en condiciones controladas.</i> .....	94
4.4.2. - <i>Ensayo de campo: determinación de la población de M. phaseolina en suelo.</i> .....	96
4.4.3. - <i>Ensayo de campo: determinación de la incidencia de podredumbre carbonosa.</i> .....	96
4.5. - Discusión .....	97
4.6. - Bibliografía.....	99

<b><i>CAPITULO 5. EFICACIA DE FUMIGANTES ALTERNATIVOS AL BROMURO DE METILO, EN EL CONTROL DE M. PHASEOLINA, EN CULTIVOS DE FRESA EN FLORIDA.</i></b> .....	<b>103</b>
5.1. – Resumen.....	103
5.2. - Introducción.....	104
5.2.1. - Producción de fresa en Florida (EEUU.).....	104
5.2.2. - Problemas patológicos en campos de fresa de Florida. ....	105
5.3. - Materiales y métodos.....	108
5.3.1. - <i>Diseño experimental y descripción de los tratamientos.</i> .....	108
5.3.2. - <i>Efecto de los fumigantes en bolsas con mazorca de maíz y coronas infectadas con M. phaseolina.</i> .....	108
5.3.3. - <i>Procesamiento de bolsas con mazorca de maíz y coronas infectadas con M. phaseolina.</i> .....	111
5.3.4. - <i>Determinación de la incidencia de podredumbre carbonosa en campo.</i> .	112
5.3.5 - <i>Análisis estadístico</i> .....	113
5.4. – Resultados. ....	113
5.4.1. - <i>Efecto de los fumigantes en bolsas con mazorca de maíz inoculadas y coronas de fresa infectadas con M. phaseolina</i> .....	113
5.4.2. - <i>Efecto de los fumigantes en la incidencia de podredumbre carbonosa, en la campaña 2013-14</i> .....	119
5.5. – Discusión.....	121
5.6. - Bibliografía.....	123
<b><i>CAPITULO 6. CONCLUSIONES.</i></b> .....	<b>127</b>
<b><i>BREVE CURRÍCULUM VITAE.</i></b> .....	<b>129</b>



## INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1.1. - ALTERNATIVAS QUÍMICAS Y NO QUÍMICAS AL BROMURO DE METILO EN LOS CULTIVOS DE ESPAÑA.....	8
TABLA 2.1. - TRATAMIENTOS APLICADOS AL SUELO EN CAMPO DE PRODUCCIÓN DE FRUTO DE FRESA (MOGUER, HUELVA).....	44
TABLA 2.2.- POBLACIÓN DE <i>M. PHASEOLINA</i> (UFC/G DE SUELO SECO) ANTES Y DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS DE BIOSOLARIZACIÓN, Y AL FINAL DE CADA CAMPAÑA EN SUELOS DONDE SE CULTIVA FRESA, EN TRES CAMPAÑAS CONSECUTIVAS. ....	52
TABLA 2.3.- EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE DESINFESCIÓN DE SUELO EN EL PORCENTAJE DE MORTALIDAD, OCASIONADA POR <i>M. PHASEOLINA</i> , DURANTE LAS CAMPAÑAS AGRÍCOLAS 2009-10, 2010-11 Y 2011-12. MORTALIDAD ACUMULADA HASTA EL FINAL DE CADA CAMPAÑA (MAYO).....	54
TABLA 2.4.- PRODUCCIÓN TOTAL (KG/HA Y G/PL) EN SUELOS TRATADOS MEDIANTE BIOSOLARIZACIÓN EN PRE-PLANTACIÓN (CV. ‘CAMAROSA’) (MOGUER, HUELVA). ....	56
TABLA 2.5.- COEFICIENTES DE CORRELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE <i>M. PHASEOLINA</i> EN SUELO, EL PORCENTAJE ACUMULADO DE PLANTAS MUERTAS Y LOS RENDIMIENTOS DE CULTIVO (CV. ‘CAMAROSA’) (MOGUER, HUELVA).....	57
TABLA 3.1. – COMPOSICIÓN DEL SUELO EN LAS FINCAS OCCIFRESA S.L. (MOGUER), Y FRES-GÓMEZ S.C:A. (PALOS DE LA FRONTERA).....	72
TABLA 3.2. – CARACTERÍSTICAS DEL AGUA DE REGADÍO EN LAS FINCAS OCCIFRESA S.L. (MOGUER), Y FRES-GÓMEZ S.C.A. (PALOS DE LA FRONTERA). ....	73
TABLA 3.3. - DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE DESINFESCIÓN DE SUELO (OCCIFRESA S.C.A., MOGUER, Y FRES-GÓMEZ S.L., PALOS DE LA FRONTERA, EN LA PROVINCIA DE HUELVA).....	76
TABLE 3.4. - POBLACIÓN DE <i>M. PHASEOLINA</i> (UFC/G DE SUELO SECO) ANTES, DESPUÉS Y AL FINAL DE CADA CAMPAÑA EN OCCIFRESA S.C.A, EN TRES CAMPAÑAS CONSECUTIVAS.....	80
TABLE 3.5. - EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS DE DESINFESCIÓN DE SUELO EN EL PORCENTAJE ACUMULADO DE PLANTAS MUERTAS (PM) Y EN LA INCIDENCIA DE PODREDUMBRE CARBONOSA (PMRC), CAUSADA POR <i>M. PHASEOLINA</i> , DESDE LA CAMPAÑA 2009-10 HASTA 2011-12 EN LAS FINCAS OCCIFRESA S.C.A. (MOGUER) Y FRES-GÓMEZ S.L. (PALOS DE LA FRONTERA). MORTALIDAD DE PLANTAS ACUMULADA HASTA EL FINAL DE CADA CAMPAÑA (MEDIADOS DE MAYO).....	81

TABLA 4.1.- ESCALA DE SEVERIDAD EN PLANTAS.....	<b>92</b>
TABLA 5.1. – FUMIGANTES QUÍMICOS ALTERNATIVOS AL BROMURO DE METILO EN EL CONTROL DE PATÓGENOS Y MALAS HIERBAS, EN FLORIDA. ....	<b>107</b>
TABLA 5.2.- APLICACIONES DE DIFERENTES FUMIGANTES DURANTE DOS CAMPAÑAS AGRÍCOLAS, EN UNA FINCA EN BRANDON, (FLORIDA). ....	<b>109</b>
TABLE 5.3. – COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO RB EN 1 L DE AGUA DESTILADA ESTÉRIL. ....	<b>112</b>
TABLA 5.4. – EFECTO DE LOS FUMIGANTES, EN LA VIABILIDAD DE ESCLEROCIOS EN MAZORCA DE MAÍZ Y CORONAS SECAS DE FRESA, INFECTADAS CON <i>M. PHASEOLINA</i> , EN UNA FINCA EN BRANDON (FLORIDA), DURANTE 2012-13 Y 2013-14. ....	<b>115</b>
TABLA 5.5. – EFECTO DE LOS FUMIGANTES EN EL PORCENTAJE DE PLANTAS MUERTAS (PM%) Y EL PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE PODREDUMBRE CARBONOSA CAUSADA POR <i>M. PHASEOLINA</i> (PMCR%), EN UNA FINCA EN BRANDON (FLORIDA), DURANTE 2013-14. ....	<b>120</b>

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1.1. - FORZADO DEL CULTIVO DE FRESA MEDIANTE SISTEMA DE MACROTÚNELES. ....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 1.2. - FORZADO DEL CULTIVO MEDIANTE SISTEMA DE MICROTÚNELES O TUNELILLOS. ....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 1.3. - PRODUCCIÓN MUNDIAL DE FRESA 2012 (FAO DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICA). ....	4
FIGURA 1.4. - REDUCCIÓN DEL USO DE BROMURO DE METILO SEGÚN PROTOCOLO DE MONTREAL A NIVEL MUNDIAL. <a href="http://ozone.unep.org">HTTP://OZONE.UNEP.ORG</a> . ....	7
FIGURA 1.5. - EMPLEO DE SOLARIZACIÓN EN UN CAMPO DE FRESA EN HUELVA .....	11
FIGURA. 1.6. - PLANTAS DE FRESAS AFECTADAS POR PODREDUMBRE CARBONOSA. ....	17
FIGURA. 1.7. - A) CORTE LONGITUDINAL DE CORONA DE FRESA, QUE MUESTRA NECROSIS EN VASOS OCASIONADAS POR <i>M. PHASEOLINA</i> . B) MICROESCLEROCIOS DE <i>M. PHASEOLINA</i> EN TEJIDO DE CORONA DE FRESA. ....	17
FIGURA. 1.8. - A) ROTURA DE UN PICNIDIO DE <i>M. PHASEOLINA</i> Y DISPERSIÓN DE CONIDIAS 10X. B) CONIDIAS DE <i>M. PHASEOLINA</i> A 40X. ....	18
FIGURA. 1.9. - MICROESCLEROCIO DE <i>M. PHASEOLINA</i> EN MEDIO DE CULTIVO DE PDA. ....	21
FIGURA 2.1. - EN CORTE LONGITUDINAL, NECROSIS EN CORONA DE FRESA OCASIONADA POR <i>M. PHASEOLINA</i> . ....	37
FIGURA 2.2. - VISTA AÉREA DE LA FINCA EXPERIMENTAL “EL CEBOLLAR” (MOGUER, HUELVA). ....	43
FIGURA 2.3. - A). APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO DE VINAZA DE REMOLACHA. B). BIOFENCE®. C). TUSAL®. ....	45
FIGURA 2.4. – A). APLICACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA AL SUELO. B). RIEGO POR ASPERSIÓN. C). COLOCACIÓN DE LÁMINAS DE POLIETILENO (SOLARIZACIÓN). D). ELABORACIÓN DE LOS LOMOS DE CULTIVO E INSTALACIÓN DE CINTA DE RIEGO. ....	46
FIGURA 2.5. - PLANTACIÓN DEL CULTIVAR 'CAMAROSA' EN LOMOS DE FRESA DE LA PROVINCIA DE HUELVA. ....	46

FIGURA 2.6. - TOMA DE MUESTRA DE SUELO A 20CM DE PROFUNDIDAD, EN EL LOMO CENTRAL DE LA PARCELA, CON UNA SONDA VERTICAL GRADUADA.....	47
FIGURA 2.7. - SONDA VERTICAL GRADUADA.....	48
FIGURA 2.8. - EN MEDIO PDA-DOPCNB, COLONIAS DE <i>M. PHASEOLINA</i> PROCEDENTE DE SUELO EN LOS QUE SE CULTIVA FRESA.....	48
FIGURA 2.9. - EN MEDIO DE CULTIVO PDA, COLONIAS DE <i>M. PHASEOLINA</i> PROCEDENTE DE AISLAMIENTOS DE TEJIDOS DE RAÍZ Y CORONA DE FRESA. ....	49
FIGURA 2.10. - PLANTAS DEL CULTIVAR ‘CAMAROSA’ CON SÍNTOMAS DE PODREDUMBRE CARBONOSA.....	53
FIGURA 2.11.- PORCENTAJE DE MORTALIDAD OCACIONADA POR <i>M. PHASEOLINA</i> EN DISTINTOS TRATAMIENTOS DE DESINFESCIÓN DE SUELO, EN TRES CAMPAÑAS AGRÍCOLAS. ....	55
FIGURA 3.1. – LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LAS FINCAS OCCIFRESA S.L. (MOGUER), Y FRES-GÓMEZ S.C:A (PALOS DE LA FRONTERA).....	72
FIGURA 3.2. - A). APLICACIÓN DE 1,3 DICLOROPROPENO:CLOROPICRINA EN INYECCIÓN A LOMO, EN EL CULTIVO DE FRESA. B). APLICACIÓN DE DAZOMET A TODO TERRENO. ....	75
FIGURA 3.3. - PRODUCCIÓN TOTAL (KG/HA) EN SUELOS FUMIGADOS Y BIOSOLARIZADOS EN PRE-PLANTACIÓN EN LAS FINCAS DE OCCIFRESA (MOGUER) Y FRES-GÓMEZ (PALOS DE LA FRONTERA) (CV. ‘CAMAROSA’)	83
FIGURA 4.1. - ENSAYO EN CÁMARA DE CULTIVO, EN CONDICIONES CONTROLADAS. ....	91
FIGURA 4.2. - SUSPENSIÓN DE ESCLEROCIOS DE LOS AISLADOS TOR-102 Y TOR-99. ....	92
FIGURA 4.3. - INCIDENCIA DE PODREDUMBRE CARBONOSA (PORCENTAJE DE PLANTAS MUERTAS), TRAS LA INOCULACIÓN CON DOS AISLADOS DE <i>M. PHASEOLINA</i> , EN CONDICIONES CONTROLADAS. ....	95
FIGURA 4.4. - RESPUESTA DE CINCO CULTIVARES DE FRESA A LA INOCULACIÓN CON DOS AISLADOS DE <i>M. PHASEOLINA</i> , EN CONDICIONES CONTROLADAS.....	95
FIGURA 4.5. - NÚMERO MEDIO DE ESCLEROCIOS DE <i>M. PHASEOLINA</i> POR GRAMO DE SUELO SECO (UFC/G), MEDIA DE DOS CAMPAÑAS AGRÍCOLAS	96
FIGURA 4.6.- PORCENTAJE DE MORTALIDAD E INCIDENCIA DE PODREDUMBRE CARBONOSA (PORCENTAJE DE PLANTAS MUERTAS), MEDIA DE DOS CAMPAÑAS AGRÍCOLAS .....	97
FIGURA 5.1. - PRODUCCIÓN DE FRESA EN EE.UU, DESDE 2000-2012. (HTTP://WWW.NASS.USDA.GOV). ....	105

FIGURA 5.2. – A). PLANTAS DE FRESA CON VASOS NECROSADOS POR PODREDUMBRE CARBONOSA. B). PLANTA DE FRESA COLAPSADA. .... 106

FIGURA 5.3. – BOLSAS DE NYLON CON MAZORCA DE MAÍZ Y CORONAS SECAS DE FRESAS INFECTADAS CON *M. PHASEOLINA*. .... 110

FIGURA 5.4.- LOMO DE FRESA CON 4 AGUJEROS PARA LA COLOCACIÓN DE LAS BOLSAS DE PIENSO CON MAZORCAS DE MAÍZ Y CORONAS INFECTADAS CON *M. PHASEOLINA*, A DISTINTAS PROFUNDIDADES DURANTE LA CAMPAÑA 2013-14. .... 111

FIGURA 5.5. – EFECTO DE DOS FUMIGANTES, EN LA VIABILIDAD DE ESCLEROCIOS EN MAZORCA DE MAÍZ, INFESTADAS CON *M. PHASEOLINA*, EN DIFERENTES PROFUNDIDADES Y DILUCIONES. .... 117

FIGURA 5.6. – EFECTO DE UN FUMIGANTE Y UN CONTROL, EN LA VIABILIDAD DE ESCLEROCIOS EN MAZORCA DE MAÍZ, INFESTADAS CON *M. PHASEOLINA*, EN DIFERENTES PROFUNDIDADES Y DILUCIONES ..... 118



## RESUMEN

El cultivo de la fresa está muy extendido en los cinco continentes, siendo China y Estados Unidos los mayores productores del mundo. A nivel mundial, el cultivo de fresa se ha visto incrementado significativamente en los últimos años, llegando a 241.109 hectáreas, en 2012. En ese año, la superficie cultivada en la provincia de Huelva (costa suroeste de España) alcanzó las 7.600 ha con una producción de 289.900 toneladas. Para esta provincia, el cultivo de la fresa ha supuesto una gran revolución desde que, a mediados de los años sesenta del pasado siglo, se iniciara en la zona. En la actualidad, supone uno de sus principales motores de desarrollo económico junto con la producción de cítricos y el turismo. Huelva es la principal área de cultivo en Europa y la cuarta después de Estados Unidos, México y Turquía, por lo que se considera a España un referente a nivel mundial en prácticas de este cultivo. Los principales países importadores de la fresa española son Francia, Alemania y Portugal con más del 80% de la exportación total.

El cultivo de la fresa ha sido altamente dependiente de la utilización del bromuro de metilo para la desinfección del suelo. Como resultado del Protocolo de Montreal y la Regulación de la Comunidad Europea (CE) nº 2037/2000 del 29 de Junio sobre sustancias que deterioran la capa de ozono, la prohibición del bromuro de metilo (BM) para la producción de fresas fue irreversible en los países de la Unión Europea desde 2007 (Decisión de la comisión de EC, 2006). Actualmente, en la UE, los únicos fumigantes autorizados con restricciones son los generadores de metil isocianato: dazomet, metam sodio y metam potasio. Aunque, 1,3-dicloropropeno y cloropicrina han sido utilizados como las principales alternativas al BM, están excluidas del Anexo I (Directiva Europea CE 91/414) desde 2010 y 2013, respectivamente, manteniéndose en la actualidad para usos de emergencia nacional mediante permisos temporales renovables de 120 días por año para la industria agrícola.

En los países donde se cultiva la fresa, se ha observado, durante los últimos años, la aparición de nuevas enfermedades fúngicas y el resurgir de otras que estaban prácticamente erradicadas. Un gran número de autores relacionan este hecho con los cambios realizados en los productos utilizados para la desinfección de suelos y en su forma de aplicación. Entre las enfermedades emergentes que afectan al cultivo de la fresa se encuentra la podredumbre carbonosa (charcoal rot, en la literatura anglosajona) ocasionada por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich. En la provincia de Huelva se detectó por primera vez en el año 2006. Las condiciones climáticas de esta zona, así como el tipo de suelo, favorecen el desarrollo de esta enfermedad, que ya se considera una seria amenaza en todas las zonas donde se cultiva la fresa.

Aún no está lo suficientemente claro si la reciente aparición de información sobre la podredumbre carbonosa es debida al incremento de dispersión del patógeno, la prohibición del BM o el creciente conocimiento de la misma como nueva enfermedad en fresa.

Se han estudiado numerosas técnicas de producción de fresa sin BM u otros químicos: cultivos hidropónicos, desinfección anaerobia del suelo, por vapor, solarización, biosolarización y utilización de variedades resistentes, entre otros. A pesar de ello, solo en el caso de que estas técnicas permitan unos rendimientos adecuados, podrían ser consideradas como alternativas viables al uso de fumigantes para el cultivo de la fresa.

La finalidad de este trabajo es determinar la eficacia de métodos de desinfección de suelo en el control de las poblaciones de *Macrophomina phaseolina* en suelo, la incidencia de podredumbre carbonosa y la influencia de los mismos en la producción, así como analizar la respuesta de resistencia o susceptibilidad de variedades de fresa a dicho patógeno y determinar las posibles diferencias entre aislados del patógeno, concretándose en los siguientes objetivos parciales:

1. Determinar la eficacia de los tratamientos de desinfección en el control de las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo.
2. Evaluar la incidencia de podredumbre de corona (podredumbre carbonosa, “charcoal rot”) en plantas de fresa en suelos fumigados.
3. Analizar el efecto de los tratamientos de desinfección de suelo en los rendimientos del cultivo.
4. Determinar la relación entre la población de *M. phaseolina* en suelo con la incidencia de podredumbres de corona, así como con los rendimientos del cultivo.
5. Determinar la respuesta de resistencia/susceptibilidad de variedades de fresa de uso común a *M. phaseolina*.

Para la consecución de estos objetivos se han llevado a cabo distintos ensayos en campo y en condiciones controladas. Los ensayos de campo se realizaron en tres fincas ubicadas en el suroeste de la provincia de Huelva (España) y en una finca colaboradora de la Universidad de Florida, situada en Dover (Florida, EEUU). El resto de los trabajos se realizaron en el Centro IFAPA Las Torres (Alcalá del Río, Sevilla, España), dependiente de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (Junta de Andalucía).

En la finca experimental El Cebollar (Moguer, Huelva), se ha analizado la eficacia de diversos tratamientos de biosolarización, técnica que combina la biofumigación y la solarización, durante tres campañas agrícolas. Estos tratamientos redujeron las poblaciones de *M.*

*phaseolina* en el suelo, siendo los tratamientos de biosolarización con gallinaza a 25.000kg/ha o vinaza de azúcar de remolacha a 15.000kg/ha muy eficaces en el control de la podredumbre carbonosa. En ensayos realizados en dos fincas comerciales, con distinto historial de desinfección, se compararon distintos tratamientos químicos y el tratamiento de biosolarización con gallinaza a 25.000kg/ha. La mayoría de los tratamientos químicos redujeron las poblaciones de *M. phaseolina* y disminuyeron la incidencia de podredumbre carbonosa. La aplicación repetida del tratamiento de biosolarización resultó en una incidencia de podredumbre carbonosa del 1% y en rendimientos del cultivo similares a los obtenidos con la aplicación del tratamiento estándar 1,3-dicloropropeno:cloropicrina. Las aplicaciones con dazomet, fumigante autorizado, fueron tan eficaces como el tratamiento estándar.

En una finca colaboradora del Gulf Coast Research and Education Center (Wimauma, Florida, EEUU), se llevó a cabo durante dos campañas agrícolas, un trabajo de campo cuyo objetivo era determinar la eficacia de distintos tratamientos químico de desinfección de suelo con diferentes formas de aplicación, en la erradicación de varios tipos de inóculo de *M. phaseolina*, enterrados en suelo. Los compuestos generadores de isotiocianatos (metam sodio y potasio) fueron tan eficaces como aplicaciones de BM:cloropicrina.

Se determinó la respuesta de resistencia/susceptibilidad de variedades de fresa comerciales a *M. phaseolina*, mediante inoculación artificial, en condiciones controladas, y en condiciones de campo, en suelos naturalmente infestados. Los resultados obtenidos en ambas condiciones fueron similares, siendo el cultivar ‘Splendor’ el más resistente a la enfermedad.

**Estos trabajos han sido financiados por el Convenio INIA CC09-074-C5, Proyecto TRANSFORMA PP.TRA.TRA201300.6, fondos FEDER y la beca postdoctoral número 11 de IFAPA y Fondo Social Europeo 2007-2013.**



## ABSTRACT

Strawberry crop is widespread in the five continents, and being EEUU the most productive among theirs. In the worldwide, strawberry crop has been increasing the last years, reaching to 241.109 ha in 2012. During this year, the cultivation area in Huelva region (south-western coast of Spain) had 7,600 ha cultivated yielding 289,900 metric. Strawberry cultivation has brought a great revolution since the mid-sixties of the last century, began in the area. Nowadays, is one of the main engines of economic development along with citrus production and tourism. Huelva is the main growing area in Europe and the fourth after the United States, Mexico and Turkey, so Spain is considered an example in the world for this culture practices. The main importers of Spanish strawberries are France, Germany and Portugal with over 80% of total imports.

The strawberry crop has been highly dependent on the use of methyl bromide in soil desinfección. As a result of the Montreal Protocol (MP) and the Regulation of the European Community (EC) 2037/2000 of 29 June on substances that deplete the ozone layer, the phase out of methyl bromide (MB) for strawberry production was irreversible in European Union countries by 2007 (Commission Decision EC, 2006). Currently, in the EU, the only restrictions are authorized fumigants generators of methyl isocyanate: dazomet, metam sodium and metam potassium. Although 1,3-dichloropropene and chloropicrin they have been used as the main alternatives to the BM, are excluded of Annex I since 2010 and 2013, respectively, remaining in use today for national emergency renewable temporary permits by 120 days per year for agricultural industry.

In countries where the strawberry is grown, in recent years, have appeared the emergence of new fungal diseases and the resurgence of others that were virtually eradicated. A large number of authors relate this with changes to products used for soil and desinfección as applicable. Among emerging diseases affecting the cultivation of strawberries is charcoal rot, caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich. Huelva was detected in 2006. Climatic conditions in this area, as well as soil type, will favor the development of this disease, which is already considered a serious threat in all areas where it is grown strawberry.

It is not entirely clear whether this recent surge of reports is due to increased dispersal of the pathogen, loss of methyl bromide, or expanding recognition of charcoal rot as a recently disease of strawberry. Several approaches to production of strawberry without MB or other chemicals have been studied: soil-less production, anaerobic soil disinfestation, heat disinfestation, biosolarization, among others. Instead, only in the case that these techniques

allow an adequate crop yield could be considered a viable alternative to the use of chemical fumigants for strawberry crops.

The goal of this work is determined the efficacy of several fumigants of soil to control soil-borne pathogens and the incidence of: Charcoal rot (causal agent *M. phaseolina*), sum up in the partial objectives as follow:

1. Determinated the efficacy of disinfestation treatment in the control of *M. phaseolina* population in soil.
2. Evaluation of the incidence of charcoal of the crown (“charcoal rot”) in strawberry plant on fumigated soil.
3. Analyzed the effect of disinfestation treatment in the yield of the strawberry crop.
4. Determinated the relation between *M. phaseolina* population in soil with the incidence of charcoal rot and the yield for each season.
5. Determinated the resistance/susceptibility response to different strawberries cultivars for *M. phaseolina*.

To achieve these objectives have been carried out several experimental field and under controlled conditions. The experimental fields were conducted on three farms in the southwestern province of Huelva (Spain) and a cooperating farm of the University of Florida, located in Dover (Florida, USA). The rest of the work was conducted in IFAPA Center Las torres (Alcalá del Río, Sevilla, Spain), belong to the Ministry of Agriculture, Fisheries and Rural Development (Junta de Andalucía).

In fields of El Cebollar (Moguer, Huelva), we analyzed the effectiveness of various biosolarization treatments techniques that combines biofumigation and solarization for three seasons. These treatments reduced populations of *M. phaseolina* in soil, being biosolarization treatments with fresh chicken manure at 25.000kg/ha or sugar beet vinasse at 15.000kg/ha, very effective in controlling charcoal rot. In tests performed on two commercial farms with different history of desinfestation, various chemical treatments and biosolarization with fresh chicken manure at 25.000kg/ha compared. Most chemical treatments reduced the populations of *M. phaseolina* and decreased the incidence of charcoal rot. Repeated application of biosolarization treatments resulted in an incidence of 1% charcoal rot and similar yields to those obtained with the application of 1,3-dichloropropene: chloropicrin that was our standard treatment. Applications with dazomet, one of the fumigant alternative for methyl bromide, were as effective as the standard treatment.

In cooperating fields from Gulf Coast Research and Education Center (Wimauma, Florida), was conducted for two strawberry seasons, several assays were conducted determined the effectiveness of different chemical treatments for desinfestation of soil, with different ways of application to eradicated the inoculum of *M. phaseolina*, buried in soil. The generating compounds isothiocyanates (metam sodium and potassium) were as effective as BM:chloropicrin and 1,3-dichloropropene:chloropicrin applications.

The response of resistance/susceptibility for commercial strawberry cultivar was determined by artificial inoculation under controlled conditions and in field on a naturally infested soil with *M. phaseolina*. The results were similar in both conditions, with the cultivar 'Splendor' as the most resistant to the disease.

**These works have been financed by the agreement INIA CC09-074-C5, TRANSFORMA project PP.TRA.TRA201300.6, FEDER funds and PhD grant number 11 of IFAPA and Fondo Social Europeo 2007-2013.**



**1.1.- El cultivo de la fresa.**

**1.1.1.- Historia del cultivo.**

La fresa es una planta conocida desde la antigüedad, existiendo referencias griegas y romanas sobre su delicado olor y sabor. Autores como Plinio y Ovidio la citan en sus poemas; Plinio la distingue por su sabor aplicándole el apelativo de “fragum” (Maroto y López, 1988; Brazanti, 1989). En Europa, las primeras referencias a su cultivo, como plantas ornamentales, datan de 1330; probablemente las especies utilizadas fueran *Fragaria moschata* Duchesne y *F. viridis* Duch. (Maroto y López, 1988). El cultivo extensivo no comenzó hasta el siglo XV, a partir de la mejora de plantas silvestres de *F. vesca* L., que ofrecía un fruto pequeño de poco interés. Tras años de cultivo y por medio de cruces naturales practicados por hortelanos franceses, y más tarde por ingleses y alemanes, se consiguió un incremento del tamaño y la calidad del fruto (Maroto y López, 1988). A partir del siglo XVI hay constancia de la aparición de otras especies europeas, más septentrionales, y cultivadas desde el siglo XVII. El Descubrimiento de América proporcionó la aparición de nuevas especies, entre ellas *F. virginiana* Duch. y *F. chiloensis* (L.) Duch. La primera de ellas procedía de Virginia (EEUU) y era utilizada por los nativos como condimento y bebida, mientras que la segunda, oriunda de Chile, proporcionaba frutos gruesos y firmes, siendo resistente a la sequía. Estas especies llamaron la atención de los colonizadores españoles. Ambas, se introdujeron en Europa en los siglos XVII y XVIII, siendo descritas y clasificadas por Duchesne, quién en 1776 describió los híbridos naturales de *F. virginiana* Duch. y *F. chiloensis* (L.) Duchesne como *F. × ananassa* Duch., por el intenso aroma de sus frutos (Hancock, 1999).

En el siglo XVIII aparecieron los primeros cultivares de fresa en Francia (‘Fraise a Bouquet’ y ‘Fraisier de Barguemot’), en Alemania (‘Haarbeer’ y ‘Brösling’) y Bélgica (‘Capiton’) (Wilhelm y Sagen, 1974). A principios del siglo XIX, Knight, presidente de la *Royal Horticultural Society* (Reino Unido), impulsó los trabajos de hibridación entre *F. virginiana* y *F. chiloensis* que dieron como resultado la aparición de algunos de los primeros cultivares de *F. × ananassa*: ‘Elton’ y ‘Dawton’ (Darrow, 1966; Folquer, 1986). En España, se citan dos zonas de cultivo tradicional: Aranjuez y el Alt Maresme (Castell, 1995). Felipe V, en 1710, importó desde Versalles fresas que se cultivaron en los Jardines Reales de Aranjuez (López-

## Capítulo 1

Aranda y Medina, 1996). En el siglo XVI, se inició su cultivo en pequeños huertos de Valencia y Cataluña.

En España durante los últimos 30 años, se ha observado un cambio importante en la distribución geográfica del cultivo. Mientras que, a finales de los años ochenta del siglo XX, las zonas productoras se situaban fundamentalmente en Andalucía, Galicia, Comunidad Valenciana y Cataluña; en la actualidad el 93% de la superficie dedicada a este cultivo se concentra en Andalucía y, fundamentalmente, en la provincia de Huelva. En dicha provincia, se introdujeron, a principios de los años 60 del pasado siglo, las primeras variedades de origen californiano (Universidad de California, USA), que se han sucedido a lo largo del tiempo. Desde entonces, el cultivo en esta provincia se ha caracterizado por ser monovarietal. La primera variedad importante, y que supuso un gran cambio en el cultivo de la fresa, fue 'Tioga', que se mantuvo desde principios de los 60 hasta principios de los años 80 siendo sustituida por diferentes variedades hasta 1997, año en que comienza a cultivarse de forma casi mayoritaria la variedad 'Camarosa' (López-Aranda, 1998). En los últimos años esta tendencia de cultivo monovarietal ha ido desapareciendo y en la actualidad cualquier explotación fresera cuenta con tres o cuatro variedades, que se plantan en diferentes fechas y que permiten abastecer a los mercados europeos desde Diciembre a Junio.

Mediante programas de mejora genética se han obtenido un gran número de cultivares, adaptados a distintas circunstancias climáticas y edafológicas, respondiendo no sólo a una alta productividad sino también a la mejora de otras características: frutos de gran calibre para facilitar la recolección, buena calidad gustativa, firmeza, color y precocidad (Juscafresca e Ibar, 1987; Maroto y López, 1988). Desde mediados de los años 80, los programas de mejora han estado orientados al desarrollo de resistencias a enfermedades (Bringhurst y Voth, 1979; Juscafresca e Ibar, 1987; Maroto y López, 1988).

Las técnicas de cultivo de fresa en Huelva han evolucionado junto con el material vegetal. Paralelamente a la llegada de las variedades se produce, a lo largo de la segunda mitad de los sesenta y principios de los setenta del siglo pasado, el desembarco de nuevas tecnologías de cultivo. El cultivo tradicionalmente plurianual pasa a ser anual, se comienza a cultivar sobre caballones acolchados con plástico, se implantan sistemas de riego por aspersión y se comienzan a realizar las primeras desinfecciones de suelo (Aguilar, 1985). Así, en la actualidad, el sistema de cultivo convencional se basa en el cultivo anual sobre caballones realizados en suelos desinfectados químicamente y acolchados con film de polietileno negro; el sistema de riego es localizado utilizándose cintas de goteo y el cultivo se protege bajo plástico (film de polietileno térmico transparente) en macrotúneles (Figura 1.1), que es el sistema utilizado en un 80% de la superficie y que sustituyó al tunelillo (Figura 1.2) (López-Aranda,

2008). Otro sistema de cultivo que se inició en la fresa en Huelva hace 10 años, es el cultivo sin suelo. Existen en la actualidad unas 200 has de cultivo de fresa sin suelo en Huelva bajo diversas modalidades: sistemas abiertos o cerrados, suspendidos o apoyados, con o sin sustrato (hidropónico). Los sustratos usados principalmente son: fibra de coco, lana de roca, perlita y turba. Uno de los problemas actuales del sistema de cultivo sin suelo es la falta de variedades realmente adaptadas a tal sistema. (López-Aranda *et al.*, 2009).

Según datos de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural-Junta de Andalucía, en 2012, el 70% (4.510 has) de la superficie dedicada al cultivo de la fresa se maneja según la normativa de Producción Integrada de la Fresa (Anónimo, 2008).

**Figura 1.1.** - Forzado del cultivo de fresa mediante sistema de macrotúneles.



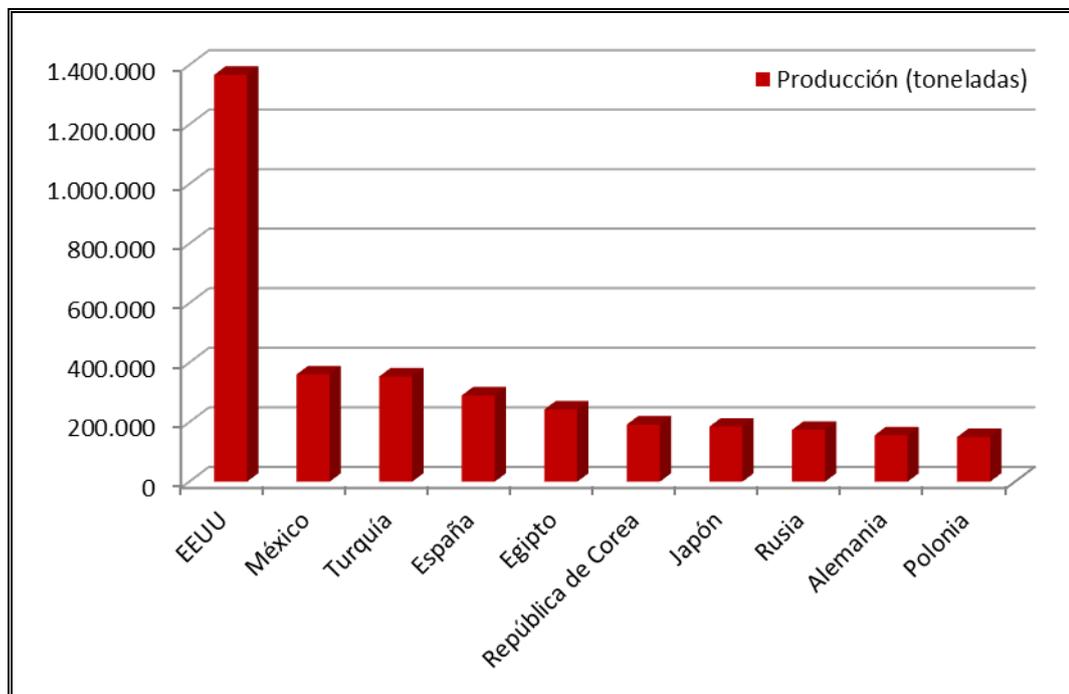
**Figura 1.2.** - Forzado del cultivo mediante sistema de microtúneles o tunelillos.



1.1.2.- Importancia del cultivo.

La fresa es uno de los cultivos con mayor consumo de fruta en el mundo. Su producción mundial se ha multiplicado por seis en los últimos 60 años, desde 754.516 toneladas en 1961 hasta 4.516.810 toneladas en 2012 (Anónimo, 2014c). Este gran desarrollo se debe en parte al incremento de la demanda, al ser considerada por los consumidores una fruta de alto contenido en vitamina C, casi análogo al de los cítricos, y al haberse potenciado sus posibilidades de utilización industrial. Según datos de la FAO (2012), la producción de fresa a nivel mundial se sitúa alrededor de 4,5 millones de toneladas y una superficie aproximada de 250.000 hectáreas (Anónimo, 2014a). Por continentes, América y Europa son los que concentran los mayores porcentajes de producción de fresa, entorno al 65%. California es responsable de que Estados Unidos sea primer productor mundial. Huelva es la principal área de cultivo en Europa, aportando alrededor del 6,3% de la producción mundial y el 27% a nivel europeo, situando a España como cuarto país productor tras Estados Unidos, México y Turquía, lo que hace de nuestro país un referente a nivel mundial en prácticas de cultivo (Figura 1.3).

Figura 1.3. - Producción mundial de fresa 2012 (FAO Dirección de Estadística).



En 2012, se dedicaron al cultivo de la fresa en la provincia de Huelva 7.600 has, con una producción de 289.900 toneladas, con una fluctuación desde 2008 a 2011 de 249.410, 225.800, 245.000 y 302.600 toneladas, respectivamente. En la actualidad, este cultivo supone uno de sus principales motores de desarrollo económico junto con la producción de cítricos y el turismo

(De Vicente, 2008). La superficie cultivada ocupa el 3% de las tierras labradas de la provincia, aportando más del 50% de la producción total agrícola, por tanto este sector tiene una elevada repercusión económica y un bajo consumo de recursos naturales, tanto de suelo como de agua (Anónimo, 2003). Es uno de los productos con mayor cuota en la exportación de frutas y hortalizas en España. Los principales países importadores de la fresa española son Francia, Alemania y Portugal con más del 80% de la importación total. Sin embargo, en Holanda, Bélgica, Polonia, Austria y Dinamarca la importación de fruta ha sido inferior al 10% del total de la producción española (Domínguez *et al.*, 2014).

En la provincia de Huelva podemos distinguir 3 zonas productoras de fruto de fresa: la Comarca Litoral, que comprende los municipios de Moguer, Palos de la Frontera, Lucena del Puerto y Almonte, y que representa la zona pionera del cultivo en la provincia; la Comarca de la Costa, al oeste de la primera, que abarca los municipios de Lepe, Cartaya, Isla Cristina y Villablanca, y que ha registrado una progresión muy importante en los últimos años; y la Comarca de la Campiña, compuesta por los términos municipales de Rociana, Bollullos del Condado, Palma del Condado, Villalba, Bonares y Niebla (Márquez-Domínguez, 2008). El cultivo de fresa moderno, tal y como se conoce actualmente, tiene un origen relativamente reciente (Medina-Mínguez, 2008).

### **1.2. - Desinfestación de suelo.**

El suelo es un reservorio para muchos patógenos de plantas. La salud e integridad del suelo es, por sí mismo, el factor principal que afecta a los niveles de patógenos. Un suelo sano es una combinación de minerales, aire, agua y materia orgánica. Los minerales en forma de arena, limo y arcilla componen cerca de 50% de un suelo adecuado. La materia orgánica constituye sólo una pequeña porción de los suelos, pero es fundamental para la transferencia de los iones químicos necesarios para el crecimiento de las plantas y la producción de frutas y hortalizas. Los suelos bien estructurados y estables son un ecosistema con su propio equilibrio e interacción de los organismos. Es este ambiente sano alrededor de la zona de la raíz de una planta, el que permite la supresión biológica de patógenos de plantas y previene el parasitismo y el daño a las plantas. El suelo es un ambiente extremadamente complejo, siendo difícil entender los aspectos que influyen en el desarrollo de los patógenos en el suelo y en el de las enfermedades que ocasionan (Koike *et al.*, 2003). Los microorganismos habitantes de suelo causan grandes pérdidas en la mayoría de los cultivos, afectando tanto a los rendimientos como a la calidad (Katan, 1996). En agricultura intensiva, como es el caso de la fresa, con frecuencia se utiliza la misma parcela durante años consecutivos, lo que ocasiona un rápido aumento de las poblaciones de microorganismos en el suelo, especialmente aquellos que causan

enfermedades en las raíces. Es necesario, por tanto, desarrollar métodos de control efectivos para asegurar la productividad de los cultivos y estabilizar el rendimiento. Además de ser efectivos, esos métodos tienen que ser económica, ambiental y tecnológicamente viables (Katan, 1999).

Los niveles poblacionales de los patógenos de suelo (soilborne pathogens, en la literatura anglosajona), entre los que se incluyen bacterias, hongos, nematodos y algunos virus, pueden ser reducidos en el suelo por tratamientos de desinfección apropiados. La desinfección del suelo es una práctica fundamental en el cultivo de determinadas especies de interés agronómico, como es el caso de la fresa. Básicamente consiste en la aplicación al suelo, antes de la instalación del cultivo, de algún agente biocida de naturaleza física o química.

Así, según la naturaleza del agente biocida, las técnicas de desinfección de suelos se pueden clasificar como químicas o no químicas, existiendo la posibilidad de combinarlas, con la finalidad de aprovechar y mejorar al máximo los efectos beneficiosos que estas ofrecen y, en algunas ocasiones, la combinación de técnicas químicas con otros métodos de control garantiza un buen resultado (Rodríguez-Kábana, 1998). Entre las técnicas empleadas, las prácticas de control más difundidas tanto en los cultivos hortícolas como ornamentales son: la desinfección con fumigantes químicos y el uso de calor tanto seco como húmedo, incluyendo el aprovechamiento de la radiación solar o las desinfecciones con vapor de agua (Diáñez, 2005). Lo más frecuente es recurrir al uso de productos químicos debido, principalmente, a la facilidad de aplicación (Barres, 2006). El bromuro de metilo (BM) o metilbromuro ( $\text{CH}_3\text{Br}$ ) se ha utilizado de forma mayoritaria en los sistemas de cultivo intensivos, ya que se trata de cultivos de alto valor y con una frecuencia de producción casi continua, que se interrumpe sólo durante el tiempo suficiente para esterilizar el suelo (Calatrava, 2002).

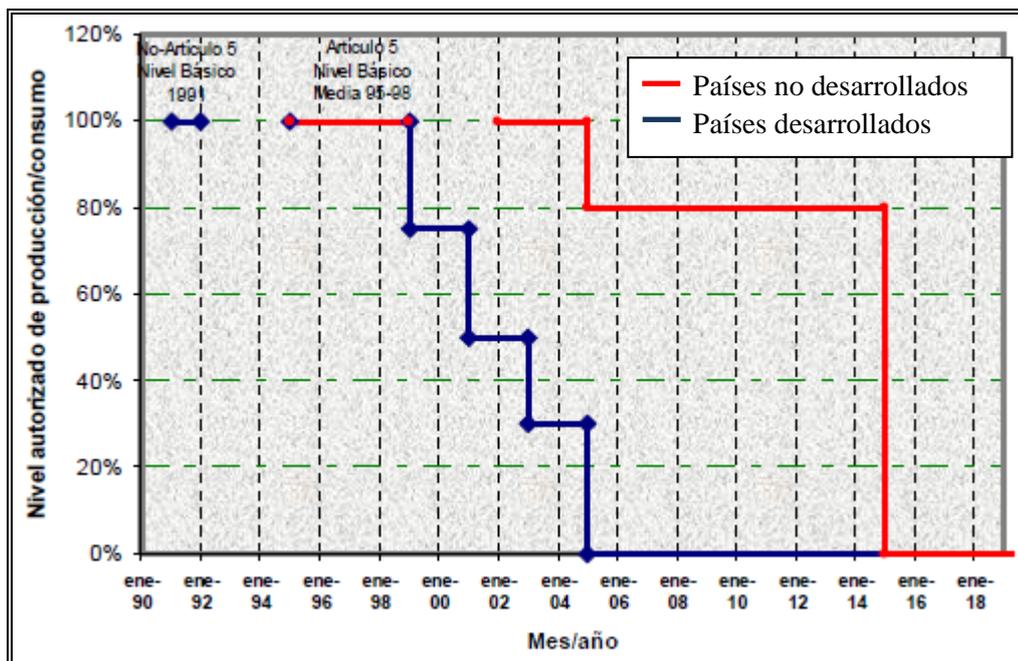
### *1.2.1. - Situación actual de los desinfectantes químicos.*

Una de las principales ventajas de la desinfección química de los suelos es su sencillez a la hora de la aplicación, además de su elevada eficacia insecticida, nematicida, fungicida y herbicida. La toxicidad de los productos para tratamientos de suelos es un factor que aconseja limitar su utilización (Cenis, 1991). A la hora de seleccionar este tipo de desinfección conviene conocer el alcance medioambiental de los efectos de su aplicación así como de la evaporación y degradación de los productos químicos, de la formación de metabolitos, de su capacidad de percolación y de su posible translocación en las plantas (Barres, 2006).

El cultivo de la fresa ha sido altamente dependiente del uso de BM como fumigante de suelo para el control de malas hierbas, nematodos y hongos patógenos, tanto en campos de

producción de fruto como en viveros de altura (Medina *et al.*, 2009). El *Protocolo de Montreal* y el reglamento CE n° 2037/2000 de 29 Junio de 2000 subrayaron la necesidad de eliminar gradualmente el uso de BM, dada su importante contribución al agotamiento de la capa de ozono estratosférica y las posteriores consecuencias que pudiera tener para el medio ambiente (Yates y Gan, 1997) (Figura 1.4). El *Protocolo de Montreal* establecía enero de 2005, como fecha tope para la prohibición de la utilización del BM, marcándose, para algunos países, un periodo transitorio de uso, llamado de “Usos Críticos”. En el caso de España, el consumo de BM se restringió a 230 toneladas entre 2005-2006, 217 toneladas en 2007, 200 toneladas en 2008 y llamado a desaparecer en 2009 (Reglamento CE n° 2037/2000 del Parlamento Europeo).

**Figura 1.4.** - Reducción del uso de Bromuro de Metilo según Protocolo de Montreal a nivel mundial. <http://ozone.unep.org>.



El BM es considerado uno de los fumigantes de suelo más efectivos. Algunas de las ventajas de su uso residen en su facilidad de aplicación en un amplio rango de tipos de suelo, con distintos niveles de humedad, temperatura y a diferentes profundidades, manteniendo una alta eficacia en el control de patógenos de suelo. Otras alternativas químicas son menos flexibles en cuanto a forma de aplicación y a las condiciones necesarias para mantener su eficacia (Santos, 2007). Muchos de los productos químicos registrados y disponibles son efectivos contra hongos, nematodos o malas hierbas, es decir son mucho más específicos, pero carecen del amplio espectro de acción del BM (Barres, 2006; Matthiessen y Kirkegaard, 2006; Noling, 2002; Rodríguez-Kábana, 1998). Además, al contrario de lo que sucede con el BM, su eficacia

y la respuesta del cultivo, depende de las condiciones climáticas y edáficas durante los momentos anteriores y posteriores a su aplicación (Noling, 2002).

El *Methyl Bromide Technical Option Committee* (MBOTC) define una “alternativa” como aquellos tratamientos o procedimientos químicos y no químicos que son técnicamente viables para el control de organismos patógenos permitiendo la eliminación del BM y establece diferencias entre las consideradas “alternativas existentes” y “alternativas potenciales”. Las primeras se corresponden con las que se están aplicando o se han aplicado en alguna región concreta mientras que las últimas están en proceso de investigación o desarrollo (Bello y Díez-Rojo, 2004). Estas alternativas, a su vez, se clasifican en tres grupos: alternativas no químicas, alternativas químicas y alternativas de control integrado (Tabla 1.1) (Rodríguez-Kábana, 1998; Tello y Bello, 2002).

**Tabla 1.1.-** Alternativas químicas y no químicas al bromuro de metilo en los cultivos de España.

<b>No químicas</b>	<b>Químicas</b>
Rotación de cultivo	1,3 Dicloropropeno
Solarización	Metam-sodio
Biofumigación	Metam-potasio
Biosolarización	Dazomet
Cultivos sin suelo y sustratos	Cloropicrina
Variedades resistentes	Combinaciones
Vapor de agua	
Uso de semillas o plantas libres de patógenos	
Otros	

Debido al elevado consumo de BM, que le llevó a ocupar el cuarto puesto tras países como EEUU, Italia y Japón, España ha sido uno de los países de referencia en la búsqueda de alternativas a este fumigante (Bello y Díez-Rojo, 2004).

La Directiva 91/414/CEE del Consejo Europeo, de 15 de Julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios y posteriormente bajo la Regulación Europea N°1107/2009 y 540/2011 (UE) relativa a la comercialización de Productos de Protección de Plantas, establece normas uniformes en materia de evaluación, autorización, comercialización

y control de productos fitosanitarios y de las sustancias activas que contienen, reduciendo dramáticamente el número de fumigantes disponibles dentro de la Unión Europea. La aplicación de la modificación de esta directiva sobre fumigantes químicos de suelos agrícolas implica que los compuestos que en la actualidad son utilizados como alternativas al BM como 1,3 dicloropropeno (1,3 D) o cloropicrina tienen los días contados en el territorio de la Unión Europea, y luego seguirían, indefectiblemente, otros como dazomet, metam sodio y metam potasio, entre otros (López-Aranda, 2008).

Entre las alternativas químicas al BM utilizadas de forma mayoritaria por los productores de fruto de fresa se encuentran 1,3 D:cloropicrina, metam sodio, dazomet y yodo metamo (Pinzon, 2011). Las formas más comunes de los productos formulados con 1,3 D son los isómeros *cis*- o *trans*- de 1,3 D contenidos en mezclas con el agente fungicida cloropicrina, en proporción de 65% 1,3 D y 35% de cloropicrina (Nelson *et al.*, 2001). Aunque estas sustancias están excluidas del Anexo I de la Directiva 91/414/CEE (399) desde 2010 y 2013, respectivamente, aún se siguen utilizando, debido a la posibilidad legal de los estados miembros de la UE de solicitar permisos temporales (120 días/año) para la industria agrícola (usos de emergencia nacional) (De Cal *et al.*, 2004).

En la actualidad, los únicos fumigantes autorizados en la UE son: dazomet, metam sodio y metam potasio, compuestos generadores de metil isotiocianato (MITC), con restricciones de uso. Según el Anexo I de la Directiva 91/414/CEE (399), trasladadas al anexo I del REGLAMENTO CE) N° 1107/2009, el uso de estos productos está permitido como nematocida, fungicida, herbicida e insecticida para su aplicación como agente fumigante del suelo antes de la plantación, limitados a 1 aplicación cada 3 años en un mismo campo, pudiendo autorizarse la aplicación en campo abierto por inyección en el suelo o riego por goteo, y en invernadero mediante riego por goteo únicamente, prescribiéndose el uso de una película de plástico estanca a los 15 gases para el riego por goteo. La tasa de aplicación máxima es de 153kg/ha (correspondiente a 86,3kg/ha de MITC) en el caso de las aplicaciones en campo, estando su aplicación limitada a usuarios profesionales.

Otros compuestos químicos estudiados para reemplazar al BM como yoduro de metilo, azida sódica, entre otros, no han alcanzado el mercado, mientras que dimetil disulfuro (DMDS) está aún en desarrollo en varios países (Gullino *et al.*, 2007), aunque se ha registrado como Paladin™ en Israel y Florida (USA) (López-Aranda, 2012, Qin *et al.*, 2011;), estando pendiente de registro en la Unión Europea (UE).

Los fumigantes químicos suelen ser aplicados dos semanas antes de la plantación, aunque, ocasionalmente este periodo puede incrementarse hasta un mes. El fundamento de la desinfección de suelos o sustratos empleando productos químicos se basa en la capacidad de

dichos productos de pasar a estado gaseoso en el momento de ser liberados, haciéndose necesario impedir el escape de dichos gases al medio ambiente, reteniéndolos durante el tiempo necesario para que su acción resulte efectiva. La desinfección de suelo se ha realizado mediante aplicaciones a toda superficie, cubriendo el suelo con lámina de polietileno virtual o totalmente impermeable (VIF o TIF), para reducir las emisiones de los gases a la atmósfera (Yates *et al.*, 2002). Hoy en día, los fumigantes se aplican durante el proceso de formación de los lomos, que son inmediatamente cubiertos con polietileno negro o VIF. De esta forma los pasillos entre lomos no se tratan, lo que permite reducir las tasas de aplicación, promoviendo así la reducción de dosis (Nelson *et al.*, 2001). Otro método de aplicación, desarrollado recientemente, es la aplicación de fumigantes emulsionados en agua mediante el riego por goteo y directamente en el lomo (Duniway, 2002). El uso de plásticos con alta capacidad de retención es un componente muy importante para incrementar la actividad fumigante contra los patógenos de suelo. El uso de plástico VIF incrementa la duración de concentraciones relativamente altas del fumigante en el suelo, lo que permite más tiempo de exposición de los patógenos a dosis letales y, también, una mejor distribución lateral en el suelo (Santos *et al.*, 2007).

En general, el uso de agroquímicos en agricultura intensiva ha disminuido en más de un 30% debido a la política agro-ambiental europea y la presión de la opinión pública. Las regulaciones de la UE están incrementando las restricciones de usos de pesticidas (y fumigantes químicos), estimulando a las industrias al propósito de nuevos retos debido a que actualmente la disponibilidad de nuevos químicos como alternativas al BM es incierta. En la campaña agrícola 2012-13, y para el cultivo de la fresa en Huelva, los tratamientos de desinfección de suelo utilizados fueron: 1,3 D:cloropicrina (73% de la superficie), cloropicrina (12%), dazomet solo o mezclado con 1,3 D (10%), metam sodio o metam potasio (2,5%) y cultivos sin suelo (2,5%) (López-Aranda, 2013).

Portavoces del sector fresero de Huelva han señalado importantes reducciones de la producción, cifradas entre un 15 y un 25% de la cosecha, en los últimos años, como consecuencia de la rápida desaparición del BM, por lo que se hace urgente un cambio en el manejo del cultivo. Según López-Aranda (2008), este brusco cambio tecnológico en el cultivo de la fresa en zonas de clima mediterráneo podría suponer el incremento de la incidencia de enfermedades fúngicas, ocasionadas por patógenos de suelo.

1.2.2. - Desinfestaciones de tipo no químicas como alternativas al BM.

La presión legislativa y social para restringir el uso de fumigantes químicos ha creado un interés en evaluar el aprovechamiento de alternativas no químicas para el manejo de enfermedades del suelo (Chellemi *et al.*, 1994). Entre estas alternativas se encuentran: la solarización, la biofumigación y la combinación de ambas: biosolarización (Tabla 1.1).

La técnica de la solarización fue descrita por Katan y colaboradores en 1976. Fue ensayada en Israel, donde el método más utilizado para la desinfección de suelos era la fumigación, cuyo alto coste era su principal inconveniente. Esta práctica se lleva a cabo durante los meses más cálidos del año y consiste en cubrir el suelo con láminas de polietileno transparente, selladas en los márgenes y mantenidas sobre el mismo durante varias semanas (Figura 1.5). Esta cubierta plástica permite el paso de las radiaciones solares de onda corta. Una vez que la luz solar atraviesa la cubierta, se produce el calentamiento del suelo hasta temperaturas de entre 35-60°C, que son letales para la mayoría de los patógenos de plantas (incluyendo hongos, bacterias, malas hierbas, nematodos e insectos) (Stapleton y DeVay, 1995). De esta forma se consigue reducir las poblaciones de determinados patógenos, así como la incidencia de las enfermedades asociadas a los mismos. Este método es similar al calentamiento artificial del suelo por vapor u otros medios, con la ventaja de que no es necesario conducir el calor desde su fuente al campo (Katan, 1981).

Figura 1.5. - Empleo de solarización en un campo de fresa en Huelva.



Para la aplicación de esta técnica es necesaria la ocupación del suelo de forma no productiva durante un largo periodo de tiempo, existiendo además una dependencia de las condiciones

climáticas, por lo que su uso se encuentra restringido a zonas con alta intensidad lumínica y temperaturas (Berg, 2007; Ros *et al.*, 2008). Además, en el caso de la fresa, la solarización proporciona el control de malas hierbas pero se observa una reducción de los rendimientos debido a que no controla las poblaciones de algunos hongos patógenos y nematodos (Locascio *et al.*, 1999). Otra de las desventajas de esta técnica, es que afecta de forma negativa a microorganismos beneficiosos, aunque los cambios en la microflora y la descomposición de la materia orgánica que se producen tras la solarización pueden incrementar el crecimiento de las plantas e inducir la supresividad hacia los organismos patógenos. Algunos microorganismos beneficiosos, como *Trichoderma* spp. son capaces de sobrevivir a las altas temperaturas (Pinkerton *et al.*, 2002)

Stapleton (2000), aconseja combinar la solarización con otras técnicas que resulten compatibles para la mejora de su eficacia en caso de situaciones adversas como: condiciones medioambientales marginales; presencia de organismos patógenos termotolerantes, o que se distribuyen en el suelo a gran profundidad; y con el objetivo añadido de minimizar la duración del tratamiento. La solarización se puede combinar con otros métodos de control físico, químico o biológico.

La biofumigación es una técnica que utiliza como fumigantes para el control de patógenos de suelo, las sustancias volátiles y otros productos que se originan en el suelo como consecuencia de la biodegradación de enmiendas orgánicas y otros residuos agroindustriales (Bello *et al.*, 2004). Los compuestos de nitrógeno (como amonios y nitratos), sulfuro de hidrógeno, los ácidos orgánicos y un gran número de sustancias volátiles así como enzimas (peroxidadas, quitinas) y fenoles son responsables de esta actividad biocida (Barres, 2006; Bello *et al.*, 1997; Gamliel y Stapleton, 1993a, b; Mian *et al.*, 1982; Rodríguez-Kábana, 1998). Los patógenos son susceptibles a los compuestos volátiles que se desprenden durante la descomposición de la materia orgánica así como al incremento de la temperatura del suelo que se produce al incorporarse la materia orgánica (Bello *et al.*, 2000, 2001). La emisión de compuestos volátiles durante la biofumigación no es constante; se produce un marcado descenso después de tres semanas (Gamliel y Stapleton, 1993a). Además, el oxígeno en el suelo disminuye mientras que el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) aumenta, el pico máximo de CO<sub>2</sub> ocurre en los primeros días de tratamiento.

La biofumigación es una aproximación del uso de plantas que contienen sustancias biológicamente activas y específicas para el control contra hongos, nematodos y plagas de los cultivos agrícolas. El principio de la biofumigación se basa en el uso de plantas con altos niveles de glucosinolatos, compuestos de azufre que se producen de forma natural en las plantas y que mejoran la protección de la planta. Cuando las plantas se incorporan al suelo,

estos glucosinolatos son hidrolizados por la enzima de la planta “mirosinasa”, a pH neutro, que produce sustancias químicas activas y volátiles, como los isotiocianatos (ITCs). Las especies de plantas más efectivas son las del genero *Brassica*, entre ellas *B. napus* y *B. oleracea* (Bianco *et al.*, 2000; Mazzola, 2011). Los isotiocianatos son el ingrediente activo de los fumigantes comerciales metam sodio y dazomet, y son muy tóxicos para insectos y patógenos. Las *brassicas* producen glucosinolatos como metabolitos secundarios, cuyos perfiles y por tanto los de los ITCs, varían entre las especies de *Brassica*. Las crucíferas se pueden aplicar como abono verde plantando en la parcela material vegetal, o esparciendo las hojas o restos de plantas troceados sobre el terreno e incorporándolo mediante una labor (Bello *et al.*, 2000, 2001).

Además de los residuos de *Brassicaceae*, se han ensayo otros materiales orgánicos como productores de compuestos biofumigantes para la desinfestación del suelo, entre estos compuestos orgánicos se incluyen los compost o enmiendas verdes, enmiendas animales (como la gallinaza) y residuos agroindustriales como cáscara de arroz, piel de cítricos, etc. Son materiales con alto contenido en nitrógeno (relación C/N menor de 20), que al descomponerse generan amoniaco (NH<sub>3</sub>), con efecto nematicida y fungicida (Tello y Bello, 2002). Para una correcta biodesinfestación es fundamental usar materiales orgánicos en vías de descomposición, con una relación C/N entre 8-20 (Bello *et al.*, 2000). Se recomienda el uso de estiércol fresco, ya que, genera más amoniaco que el fermentado al descomponerse. El uso de estiércoles como biofumigantes conlleva un riesgo medioambiental y de posible fitotoxicidad para los cultivos. Desde el punto de vista medioambiental se puede producir la contaminación de los acuíferos por nitratos, sobre todo al aplicar gallinaza, por su alto contenido en nitrógeno (Díaz *et al.*, 2005), existiendo legislación relativa a la protección de aguas contra la contaminación producida por los nitratos usados en agricultura (Directiva 91/676/CEE) (Cebolla *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2004).

A diferencia de los tratamientos químicos más agresivos y de la desinfestación con vapor, la biofumigación produce un vacío ecológico parcial que es ocupado después del tratamiento por microorganismos de suelo, impidiendo la recolonización del mismo por organismos patógenos (Katan, 1981).

El calentamiento del suelo ha demostrado tener efectos variables en el control de enfermedades, pero algunas de las carencias de este tipo de tratamiento pueden compensarse mediante la combinación de distintas técnicas (Katan, 1981; Katan *et al.*, 1983). Combinando enmiendas del suelo con la solarización se incrementa la efectividad frente a patógenos y se reduce la cantidad de materia orgánica aplicada por hectárea (Bello *et al.*, 1997; De los Santos, *et al.* 2012; Gamliel y Stapleton, 1993 a). Esta combinación de biofumigación y solarización

recibe el nombre de solarización biológica o biosolarización (Ros *et al.*, 2008). Este tipo de tratamiento a suelo puede ser realizado de distintas formas y también se ha denominado: “desinfestación anaeróbica de suelo” (anaerobic soil disinfestation, ASD), “desinfestación biológica”, “esterilización reductora” y “desinfestación reductora del suelo” (Butler *et al.*, 2012). Esta técnica puede ser utilizada en aquellas zonas donde la solarización o el encharcamiento no son posibles (Shennan *et al.*, 2007). ASD utiliza métodos de desinfestación de suelos en pre-plantación desarrollados en Japón y Holanda (Butler *et al.*, 2012). Esta técnica se realiza en tres pasos: incorporación de materia orgánica (fuente de carbono para los microorganismos del suelo), riego (hasta saturación) y tapado con una cubierta plástica impermeable al O<sub>2</sub> (limitando el suplemento de oxígeno, y manteniendo las condiciones de agua en el suelo por debajo de la capacidad de campo, permitiendo la descomposición anaeróbica del suelo) (Shennan *et al.*, 2007). Estrictamente, la solarización y la biosolarización están basadas en el riego a capacidad de campo (Katan, 1981). Entre los beneficios del uso de la biosolarización se encuentra la reducción de las temperaturas necesarias para el control de las poblaciones de patógenos, ventaja especialmente importante en aquellas zonas donde la aplicación de la técnica quedaba restringida debido a condiciones ambientales adversas (Keinath, 1996).

La repetición de este tipo de desinfestación y la adición continua de materia orgánica puede llevar asociados problemas de contaminación por metales pesados y por lixiviación de nitratos (Yélamos *et al.*, 2002). La calidad del suelo tras biosolarización con estiércol de pollo ha sido determinada mediante el estudio de parámetros fisicoquímicos, químicos, biológicos y bioquímicos. Mediante el estudio por luminiscencia de *Vibrio fischeri*, un biosensor utilizado para identificar cualitativa y cuantitativamente la presencia de diferentes compuestos o condiciones incluyendo toxicidad, en ambientes complejos como el suelo, se determinó que mientras que el BM redujo de forma significativa la luminiscencia, la biosolarización no resultó tóxica. No se observaron incrementos significativos en el contenido de metales pesados en el suelo, aunque la acumulación de metales pesados tras las aplicaciones repetidas de estiércoles es una de las razones habitualmente esgrimidas para no recomendar la biosolarización (Ros *et al.*, 2008). Flores y colaboradores (2006), estudiaron la acumulación de metales pesados en suelos sometidos a sucesivas desinfestaciones mediante biosolarización, concluyendo que, tras seis años de repetición, no se observó acumulación de los metales estudiados (Cd, Co, Cu, Cr, Pb, Ni y Zn), por lo que califican esta técnica como una alternativa de desinfestación segura. Pascual y colaboradores (2006), centraron sus investigaciones en la dinámica del nitrógeno y la potencial contaminación por lixiviación de nitratos en la reiteración de biosolarización, añadiendo importantes cantidades de materia orgánica, durante 5 años. Mientras que en suelos tratados con BM la cantidad de nitratos lixiviados fue de 8,010 mg, en suelos biosolarizados fue de 1,453 mg.

La biosolarización realizada de forma reiterada tiene efectos de mejora sobre los valores nutricionales del suelo, incrementa los niveles de materia orgánica, revitaliza la actividad microbiana y mejora los ciclos biogeoquímicos (Diez-Rojo *et al.*, 2008 a, b, c; Guerrero *et al.*, 2008; Ozores-Hampton *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008).

### ***1.3. - Macrophomina phaseolina, agente causal de podredumbre carbonosa en fresa.***

*Macrophomina phaseolina* es un patógeno de suelo, ubicuo y con un amplio rango de huéspedes, que afecta a más de 500 especies cultivadas y silvestres, es de gran longevidad y con capacidad saprofitica altamente competitiva (Babu *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2001). La enfermedad ocasionada por *M. phaseolina* se denomina “podredumbre carbonosa” (charcoal rot, en la literatura anglosajona), debido a la decoloración o ennegrecimiento de los tejidos de corona y raíces ocasionada por la presencia de este hongo en las plantas afectadas (Agostini, 2011) y a la acumulación de los microesclerocios, visibles macroscópicamente, de color negro, que parasitan los tejidos del huésped, causando la muerte de la planta (Pratt, 2006).

La podredumbre carbonosa se está convirtiendo en una enfermedad importante en los sistemas de producción de fresa que han abandonado la fumigación del suelo con bromuro de metilo, y que están en el período de transición en la aplicación de alternativas (Avilés *et al.*, 2008; Mertely *et al.*, 2005; Zveibil y Freeman 2005; Zveibil *et al.*, 2012). Se informa de la aparición en fresa desde: Argentina, donde se observó en granjas comerciales en 2007, y se considera como una amenaza potencial para la industria de este sector en el noroeste de Argentina (Baino *et al.*, 2011); Irán (Sharifi y Mahdavi, 2011); Italia (Angelini y Faedi, 2010); España (Avilés *et al.*, 2008.); Australia, donde se produjeron brotes devastadores de podredumbre de corona y necrosis de raíces que afectaron a la producción de fresas durante las campañas de 2007 a 2009 (Fang *et al.*, 2011; Golzar *et al.*, 2007;.); Grecia, donde en suelos no fumigados, casi un 25% de las plantas sintomáticas fueron infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* y *Macrophomina phaseolina* (Tjamos *et al.*, 2006.); Turquía, donde se reportó como *Macrophomina* spp. (Benlioğlu *et al.*, 2004.); e Israel, donde un estudio sugiere que el sistema actual de fumigación de suelo actual para el control de hongos patógenos, utilizando las actuales alternativas al BM, puede no ser adecuado para mantener el material vegetal sano en todas las etapas de producción (Zveibil y Freeman, 2005). En Estados Unidos, *M. phaseolina* fue aislado, por primera vez, de plantas de fresa marchitas y muertas procedentes de un campo comercial situado en Florida (Mertely *et al.*, 2005). Posteriormente, Koike (2008), observó plantas de fresa con esta enfermedad en campos comerciales del sur de California. Este autor señaló que muchos de los campos de California afectados no habían sido fumigados en pre-

plantación con BM:Cloropicrina. Sin embargo, Sánchez y colaboradores (2012) advirtieron la presencia de *M. phaseolina* en suelos fumigados y no fumigados con BM, sugiriendo que la aparición de este patógeno en los cultivos de fresa en Chile no estaba relacionada con el abandono del BM.

El primer registro de podredumbre carbonosa en fresa data de 1958, en campos de Illinois (Estados Unidos) (Tweedy y Powell, 1958; Maas, 1998). Otros más recientes proceden de India, Francia y Egipto. En Egipto, *M. phaseolina* se detectó ocasionando una severa podredumbre de raíz en fresas (Madkour y Aly, 1981; Maas, 1998). En 1989, en algunos campos de fresas de Aquitania (suroeste de Francia), se aisló *M. phaseolina* de lesiones internas de la corona de plantas de varios cultivares de fresa. La enfermedad se observaba, habitualmente en campos en los que se había cultivado girasol (Baudry y Morzières, 1993). En India, se detectaron síntomas en hoja, descritos como tizón de la hoja, y en corona, determinando que el agente causal *M. phaseolina* (sinónimos *Rhizoctonia bataticola* (Taubenhaus) EJ Butler y *Sclerotinia bataticola* Taubenhaus) (Lele y Phatak 1965; Maas, 1998), aunque para nuestro conocimiento, este es el único informe sobre *M. phaseolina* ocasionando tizón de la hoja en fresa. Según la descripción de Maas (1998), los síntomas en hojas consisten en manchas más o menos circulares con el centro de color gris y márgenes con una tonalidad violácea, que adquieren una forma ovoide conforme la infección progresa. Las lesiones se extienden desde el margen hacia el centro de la hoja, provocando deformación y defoliación en las plantas más viejas. Los estolones y la corona de las plantas infectadas presentan lesiones de color marrón oscuro o negro con forma irregular. El crecimiento de nuevas hojas o estolones ve bastante mermado, además las nuevas raíces tienen un escaso desarrollo y las más viejas se desintegran.

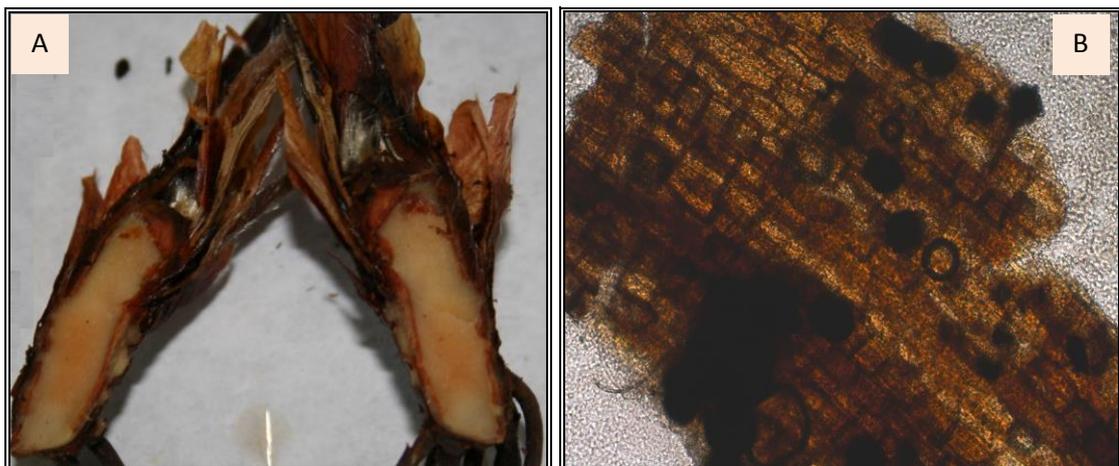
Los síntomas de podredumbre carbonosa en fresa son muy característicos ya que vienen marcados por el retraso del crecimiento de la planta, marchitamiento inicial del follaje, el secado y muerte de las hojas más viejas, eventual colapso y posterior muerte de la planta (Koike, 2008) (Figura 1.6). Estos síntomas son similares a los marchitez ocasionados por *Verticillium* spp., en ambos casos las hojas centrales se mantienen vivas y verdes durante un tiempo. A diferencia de la mayoría de las infecciones provocadas por *Verticillium* spp, *M. phaseolina* ocasiona necrosis en los tejidos internos de la corona, que afectan tanto a la zona vascular, como al resto de la corona, observándose áreas necróticas anaranjadas o marrón oscuro, que llegan a afectar a toda la corona de la planta (Figura 1.7 A y B) (Bolda y Koike, 2012; Mertely *et al.*, 2005;), además de podredumbre o necrosis de la raíz (Avilés *et al.*, 2008; Koike *et al.*, 2012). Koike (2008) no observó cuerpos fructíferos del hongo u otras estructuras directamente en los tejidos vegetales, Avilés y colaboradores (2008), detectaron microesclerocios negros de forma oblonga en tejidos de corona infectados por *M. phaseolina*.

Mertely y colaboradores (2005) observaron el desarrollo de picnidios ostiolados en los tejidos del huésped, después de 8 a 10 días de incubación (Figura 1.8 A y B).

Figura. 1.6. - Plantas de fresas afectadas por podredumbre carbonosa.



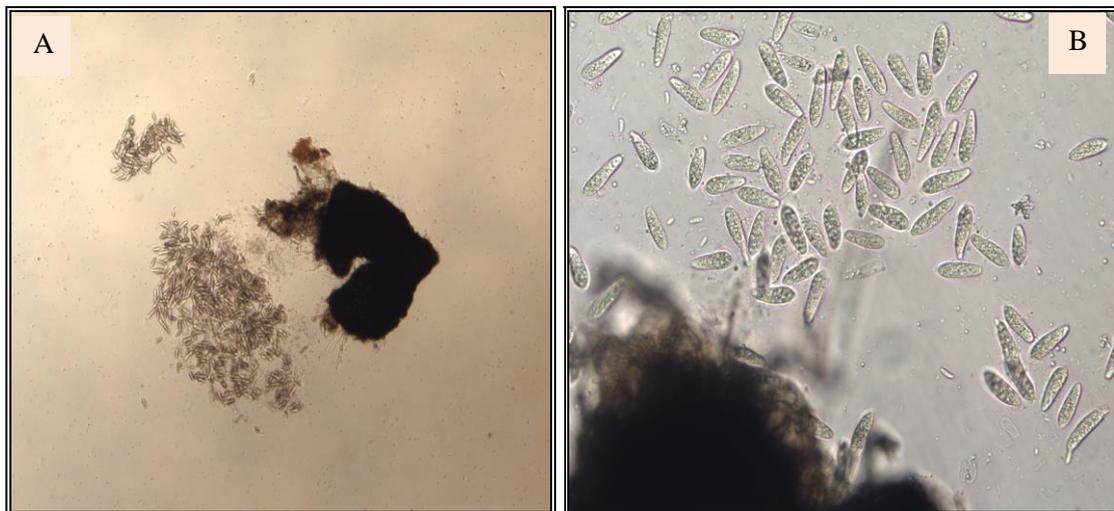
Figura. 1.7. - A) Corte longitudinal de corona de fresa, que muestra necrosis en vasos ocasionadas por *M. phaseolina*. B) Microesclerocios de *M. phaseolina* en tejido de corona de fresa.



*M. phaseolina* está considerado como un patógeno de climas cálidos. Los primeros registros de plantas de fresa afectadas por este patógeno provenían de la India y Egipto, donde las altas

temperaturas (33-47°C) y las condiciones de baja humedad del suelo prevalecen. Sin embargo, se han registrado brotes adicionales en regiones templadas (temperatura del suelo 8-27°C), como España y Francia (Zveibil *et al.*, 2012). El desarrollo de la enfermedad puede verse agravada por múltiples factores como la combinación de estrés debido al calor, el déficit de agua, el suelo de textura ligera, o el estrés asociado con la reproducción del huésped (Mihail, 1989). En ensayos realizados bajo condiciones controladas, *M. phaseolina* fue más virulenta y ocasionó síntomas más severos en plantas mantenidas a 32°C, mientras que no se observaron síntomas de la enfermedad a temperaturas de entre 17 y 22°C. Esto puede estar relacionado a la dominancia de este patógeno en los meses más cálidos del año y, en particular, el predominio de *M. phaseolina* en el final de la primavera hasta principios de verano, cuando a menudo las temperaturas superan los 30°C y un gran número de plantas se marchitan y mueren rápidamente en el campo (Colmillo *et al.*, 2011b). En el suroeste de España, los síntomas de la podredumbre carbonosa aparecieron en campos de fresas al final de la campaña, cuando las temperaturas superan los 25°C (Miranda *et al.*, 2012).

**Figura. 1.8.** - A) Rotura de un picnidio de *M. phaseolina* y dispersión de conidias 10x. B) Conidias de *M. phaseolina* a 40x.



El estrés producido en la planta por las condiciones físicas ya citadas, favorece el desarrollo de los síntomas que causa *M. phaseolina* y la mortalidad de plantas. Sin embargo, cuando las temperaturas del suelo son elevadas se observa la inhibición de *M. phaseolina* en el proceso de infección de raíces tempranas, en el cultivo del melón (*Cucumis melo* L.) (Bruton *et al.*, 1987). Zveibil y colaboradores (2012) demostraron que, una parte importante en la mortalidad de las plantas en el cultivo de la fresa causada por *M. phaseolina* tiene que ver con la importancia de la elevada temperatura combinada con baja humedad en el suelo, aunque tan solo fueron evaluados dos niveles de humedad. La viabilidad de los microesclerocios disminuyó más

rápidamente en suelos mantenidos a 25°C ó a temperaturas fluctuantes de 18 a 32°C, comparado con la viabilidad en suelos mantenidos a 30°C. Después de 30 a 40 semanas de exposición en el suelo, el inóculo mantenido a 25°C, 30°C, ó a temperaturas fluctuantes en invernadero disminuyó hasta niveles muy bajos. Además, se observó un aumento significativo en la mortalidad de las plantas en suelos infestados mantenidos a 30°C frente a los mantenidos a 25°C, mientras que el estrés hídrico a 25°C ó 30°C no afectó a la mortalidad de las plantas en los suelos infestados con *M. phaseolina* (Zveibil *et al.*, 2012). En ensayos in vitro, Khan (2007) demostró que el crecimiento de *M. phaseolina* fue insignificante a bajas temperaturas y comenzó su crecimiento a 15°C, encontrando que la temperatura óptima de crecimiento fue de 30°C, siendo fuertemente inhibida por temperaturas de 40°C ó superiores.

El contenido de humedad del suelo ha sido considerado como uno de los principales factores que afecta a la supervivencia de *M. phaseolina* (Pratt, 2006). La humedad del suelo y el nivel del agua tienen efectos significativos sobre la supervivencia de los microesclerocios de *M. phaseolina*. Así, en suelos húmedos, tanto a altas temperaturas (> 50°C) como a bajas (-5 ó 5°C) afectan de forma negativa a la supervivencia y al crecimiento de *M. phaseolina* (Papavizas y Klag, 1975). Zveibil y colaboradores (2012) observaron que una combinación de una alta humedad e inundaciones causaban una disminución de la viabilidad de los microesclerocios en comparación con los suelos secos. Aunque, los resultados del estudio realizado por Pratt (2006) no mostraron de manera clara que los suelos secos favorecieran la supervivencia de microesclerocios de *M. phaseolina*, como sugieren algunos autores, debido a que la supervivencia óptima ocurre en suelos relativamente húmedos y con una capacidad de retención de agua en torno a 50-100%. En este estudio, los resultados y las observaciones de los experimentos a diferentes niveles de humedad del suelo, sugirieron que la viabilidad de los microesclerocios pueden verse influenciadas por las interacciones entre los microorganismos y la humedad del suelo. Olaya y colaboradores (1996 a, b) demostraron que las altas temperaturas y los bajos potenciales hídricos del suelo son factores importantes en la ocurrencia de esta enfermedad. En medios de cultivo no específicos, este hongo es capaz de crecer a temperaturas de 35°C y potencial osmótico bajo, especialmente si los nutrientes están disponibles. Los microesclerocios proliferan en el medio en un amplio rango de potenciales osmóticos (Odovsky y Dunkle, 1979). Además Shokes y colaboradores (1977), demostraron que el potencial hídrico tiene una gran importancia en la ecología de *M. phaseolina*. Posteriormente, Goudarzi y colaboradores (2008) estudiaron el efecto del potencial osmótico y el potencial mátrico del suelo en la germinación de microesclerocios y el crecimiento micelial de *M. phaseolina* y llegaron a la conclusión de que el potencial mátrico era un factor más importante que el potencial osmótico para el crecimiento micelial *M. phaseolina*. Los factores que influyen de manera negativa en la supervivencia de los propágulos del hongo son, además

de ciclos de congelación y descongelación del suelo, una baja relación de carbono:nitrógeno y una alta humedad del suelo (Short *et al.*, 1980).

La densidad de plantación juega un papel importante en la incidencia de podredumbre carbonosa, que fue inversamente proporcional, de manera que a mayor densidad de población menor incidencia, en algunos estudios realizados en cultivos como: girasol, cacahuete y guayule (*Parthenium argentatum*, A. Gray) (Mihail, 1989).

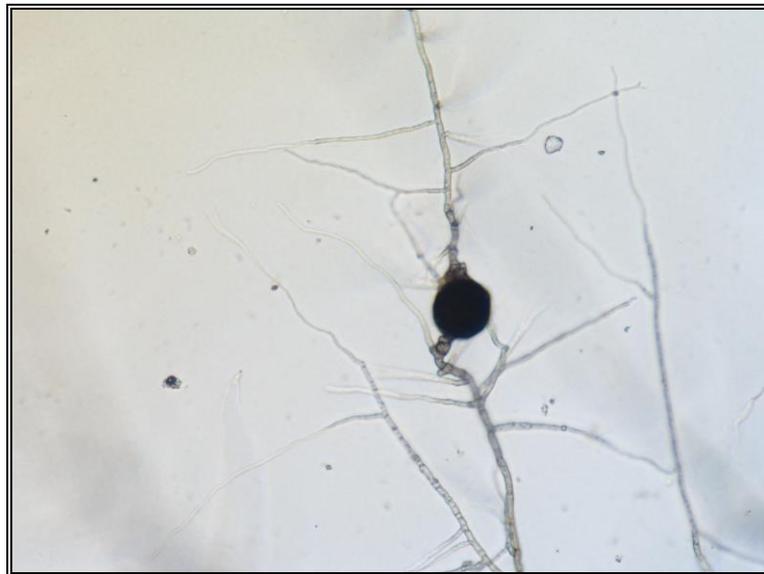
*M. phaseolina* sobrevive en el suelo y en restos de plantas de fresa infectadas mediante estructuras de resistencias denominadas microesclerocios. Al final de la campaña (mediados de Mayo), las plantas de fresas se extraen del lomo mediante la siega de la parte aérea, arado de los lomos o la aplicación de herbicidas. Finalmente, los restos de las plantas infectadas por patógenos del suelo pueden permanecer en el suelo hasta la siguiente campaña y por lo tanto, servir como una fuente potencial de inóculo primario para los posteriores cultivos (Zvebil *et al.*, 2012). Algunos estudios sugieren que la población de microesclerocios de *M. phaseolina* aumenta a medida que los desechos del huésped se van descomponiendo en el suelo (Mihail, 1989). Esta puede ser una de las principales causas del incremento observado en la incidencia de la enfermedad en suelos sin ningún tipo de fumigación, cuando la fresa es cultivada año tras año sin rotación (De los Santos *et al.*, 2012). En España, *M. phaseolina* no ha sido aislada de plantas procedentes de los viveros de altura, a diferencia del caso de *Fusarium oxysporum* (Redondo *et al.*, 2012), por lo que la planta de la fresa podría no ser considerada como una fuente de inóculo para *M. phaseolina*.

Los microesclerocios sirven como fuente primaria de inóculo y se ha demostrado que pueden persistir en suelo hasta más de tres años (Dhingra y Sinclair, 1975). Aunque, algunos autores describen una disminución significativa en el número de microesclerocios en residuos de suelo y de la planta en campo, pasados varios meses (Pratt, 2006). La supervivencia de los microesclerocios puede verse reducida considerablemente en suelos húmedos, no sobreviviendo durante más de 7 a 8 semanas, mientras que el micelio no es capaz de sobrevivir más de 7 días (Anónimo, 2014b). Aunque la longevidad de los microesclerocios no se conoce de manera fehaciente, en las condiciones del suroeste de España, la población de *M. phaseolina* aumentó año tras año, en suelos no fumigados, donde se cultiva fresa desde el año 2009 (datos no publicados). Short y colaboradores (1980), observaron en cultivos de la soja y del maíz, que las poblaciones de microesclerocios en suelo con capacidad germinativa estaban directamente relacionadas con el número de años que se mantuvo el cultivo, doblándose el número de microesclerocios tras dos años consecutivos con el mismo cultivo. Por otra parte, la severidad y la incidencia de la podredumbre carbonosa en soja y fresa están directamente relacionadas con la población de *M. phaseolina* en suelo, e inversamente relacionada con los

rendimientos del cultivo (Miranda *et al.*, 2012). Wyllie (1988) observó en el cultivo de la soja que 15 microesclerocios por gramo de suelo de *M. phaseolina* podría ser es un nivel aceptable y no afectar a la producción del cultivo.

Los microesclerocios se producen en el tejido del huésped y se liberan al suelo cuando se produce la descomposición de la planta. Estas estructuras multicelulares permiten que persistencia del hongo en condiciones adversas: bajos niveles de nutrientes en suelo, temperatura por encima de 30°C, entre otras. La germinación de los microesclerocios se da en un rango de temperaturas entre 25 y 35°C, esto se produce en la superficie de la raíz cuando los tubos germinales forman los apresorios que son capaces de penetrar en la epidermis del huésped mediante presión mecánica, digestión enzimática o por las aberturas naturales del huésped (Bowers y Russin, 1999). El crecimiento de las hifas se produce intercelularmente en la corteza y luego intracelularmente a través del xilema que coloniza el tejido vascular. Una vez en el tejido vascular *M. phaseolina* se propaga a través de la raíz y el tallo inferior produciendo microesclerocios que conectan los vasos vasculares de la planta (Wyllie, 1988). La severidad de la enfermedad se ve afectada con las altas temperaturas y baja humedad del suelo, además de la obstrucción mecánica de los microesclerocios en los vasos del xilema, la producción de toxinas, la acción enzimática y la presión mecánica ejercida durante el desarrollo de la enfermedad (Anónimo, 2014 b).

**Figura. 1.9.** - Microesclerocio de *M. phaseolina* en medio de cultivo de PDA.



*M. phaseolina* es la especie tipo del género *Macrophomina* Petr., y es también el nombre asignado al coelomicete sinamorfo *Rhizoctonia bataticola* (Taubenh.) E.J. Butler (Crous *et al.*, 2006). *M. phaseolina* produce un gran número de esclerocios, pero no da lugar a la producción de esporas (Rossman y Palm-Hernández, 2008). Por este motivo, se le relacionó con otros

hongos formadores de esclerocios como *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, de la familia de los basidiomicetos (Rossman y Palm-Hernández, 2008). Según Wheeler (1975), *M. phaseolina* pertenecía a la división *Eumicota*, subdivisión *Deuteromicotina*, clase *Coelomicetos*, orden *Sphaeropsidales* (teniendo un conidioma picnidial), familia *Sphaerioidaceae*, y género *Macrophomina*. Rossman y Palm-Hernández (2008) señalaron que en la integración de las especies asexuales, en una filogenia de ascomicetos, se hicieron evidentes algunas relaciones sorprendentes. Un ejemplo de una relación relevada usando datos de secuencia molecular (28S ADNr) es la inclusión de *M. phaseolina*, que causa la podredumbre carbonosa y la necrosis del tallo, en la familia ascomycete *Botryosphaeriaceae*, aunque, el teleomorfo es aún desconocido (Crous *et al.*, 2006). De acuerdo con el *Index Fungorum*, la nueva posición de *M. phaseolina* en la clasificación taxonómica es: familia *Botryosphaeriaceae*, orden *Botryosphaeriales*, Incertae sedis, clase *Dothideomicetos*, subdivisión *Pezizomicotina* y división *Ascomicota* (Disponible online: <http://www.indexfungorum.org>).

Según citan Crous y colaboradores (2006), von Arx (1981) introdujo el nombre *Tiarosporella phaseolina* (Tassi) van der Aa, para *M. phaseolina*, e incluyó el género *Macrophomina* como *Tiarosporella* Höhn. Este tratamiento ha sido en gran parte ignorado por la comunidad de patólogos de plantas y la comunidad micóloga, aunque von Arx (1987) lo siguió manteniendo. El género *Tiarosporella* se caracteriza por tener conidias formadas de conidióforos hialinos, de textura suave, con células que carecen de engrosamientos periclinales y proliferaciones, una forma de subcilíndrica a fusiforme y conidias con apéndices irregulares, mucoides y apicales (Nag Raj, 1993). Crous y colaboradores (2006) fueron capaces de inducir la esporulación de numerosas cepas de *M. phaseolina* sobre agujas de pino estériles, y descubrieron que las conidias formaban apéndices apicales mucoidales. Así que, *M. phaseolina* (Tassi) Goid. (= *Tiarosporella phaseolina* (Tassi) Van der Aa) pertenece a la forma anamorfa de los ascomicetos y se caracteriza por la producción tanto de picnidios como de esclerocios en tejidos huésped y en medios de cultivo (Ndiaye, 2007). El conidioma picnidial es de color marrón oscuro a negro, solitario o agregado, de hasta 200 µm de diámetro, además de poseer una apertura central u ostiolo, que tiene una pared multicelular gruesa. Las picnidiosporas tienen forma desde elipsoidal a ovoidal, y miden (16-)20-24(-32) × (6-)7-9(-11) µm; las conidias inmaduras son hialinas. Durante la formación esclerocial, 50–200 células individuales hifales se agregan creando cuerpos multicelulares llamados microesclerocios. Los microesclerocios, se producen en los tejidos huésped o en el suelo, son de color negro, rugosos, duros y su tamaño varía en función de los nutrientes disponibles en el sustrato donde se producen los propágulos. (Crous *et al.*, 2006; Ndiaye, 2007).

De acuerdo con la primera descripción de Maas (1998), *M. phaseolina*, aislada de plantas de fresa con síntomas de marchitamiento de las hojas y necrosis de la corona, produce sobre

medio de cultivo patata-dextrosa agar (PDA) un micelio esponjoso y blanquecino. Al cabo de 3 días se forman esclerocios pequeños, negros, rugosos, con forma irregular. *M. phaseolina* aislado de plantas de fresas que mostraban síntomas de podredumbre carbonosa produjo numerosos esclerocios oscuros con formas alargadas e irregulares que median 55-67 a 170-190 µm de longitud y de 44-50 a 133-135 µm de anchura (Figura 1.9). Cuando los aislados fueron cultivados en un medio agar agua 1,5%, con paja de trigo deshidratada y esterilizada, se produjeron picnidios oscuros que formaban conidias cilíndricas, ostioladas e hialinas y unicelulares (Baino *et al.*, 2011; Koike, 2008; Mertely *et al.*, 2005). Mertely y colaboradores (2005) y Baino y colaboradores (2011) observaron picnidios visiblemente ostiolados, con una forma generalmente elipsoidal, hialinos y que ocasionalmente o raramente se desarrollan en los tejidos huésped afectados después de 8 a 10 días de incubación. Las colonias en medio de cultivos tienen una coloración desde blanco a marrón o gris y oscurecen con el paso del tiempo. Las hifas se ramifican y forman generalmente ángulos rectos, aunque puede también observarse en ángulos agudos.

Crous y colaboradores (2006), señalaron las diferencias entre *Tiarosporella* y *Macrophomina*, que produce normalmente picnidios con proliferación de células conidiógenas y conidios que se vuelven de color marrón oscuro y pierde sus apéndices apicales en la madurez. Principalmente debido a estas diferencias el género *Macrophomina* y el nombre *M. phaseolina* se ha mantenido.

***Macrophomina phaseolina*** (Tassi) Goid., Annali Sper. agr. N.S. 1:457. 1947.

*Basionym: Macrophoma phaseolina* Tassi, Bull. Lab. Ort bot. Siena IV:9. 1901.

= *Tiarosporella phaseoli* (Maubl.) Aa, Verh. Kon. Ned. Akad. Wetensch., Sectie 2, 68:4. 1977.

Sinónimos adicionales fueron indicados por Holliday y Punithalingam (1988).

Aunque sólo una especie (*phaseolina*) está reconocida dentro del género *Macrophomina* (Sutton, 1980), se observa una gran variabilidad en la morfología y la patogenicidad entre aislados procedentes de diferentes huéspedes (Fernández *et al.*, 2006). Utilizando patrones restringidos con fragmentos amplificados de ADN por PCR cubriendo el espacio transcrito de la región interna, 5.8S ARNr y parte de 25S ARNr, no se observaron variaciones entre aislados de *M. phaseolina* procedentes de soja, maíz, sorgo, tejidos de raíz de algodón, ni suelo de campos infestados, sugiriendo que *M. phaseolina* constituye una sola especie (Su *et al.*, 2001).

Según Rayatpanah y colaboradores (2012), la diversidad genética del hongo *M. phaseolina* podría favorecer su supervivencia y adaptación a diferentes entornos, debido a las diferencias morfológicas, fisiológicas, patogénicas, y a su diversidad genética. Sin embargo, no hay evidencias claras que sugieran la existencia de formas especiales, subespecies o razas

fisiológicas. Muñoz-Cabañas y colaboradores (2005) concluyeron que, *M. phaseolina* mostró una cierta especialización patogénica, pero no diferentes razas genéticas.

#### **1.4. – Objetivos.**

La finalidad de este trabajo es determinar la eficacia de métodos de desinfección de suelo en el control de las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo, la incidencia de podredumbre carbonosa y la influencia de los mismos en la producción, así como analizar la respuesta de resistencia o susceptibilidad de variedades de fresa a dicho patógeno y determinar las posibles diferencias entre aislados del patógeno, concretándose en los siguientes objetivos parciales:

1. Determinar la eficacia de los tratamientos de desinfección en el control de las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo.
2. Evaluar la incidencia de podredumbre de corona (podredumbre carbonosa, “charcoal rot”) en plantas de fresa en suelos fumigados.
3. Analizar el efecto de los tratamientos de desinfección de suelo en los rendimientos del cultivo.
4. Determinar la relación entre la población de *M. phaseolina* en suelo con la incidencia de podredumbres de corona, así como con los rendimientos del cultivo.
5. Determinar la respuesta de resistencia/susceptibilidad de variedades de fresa de uso común a *M. phaseolina*.

#### **1.5. – Estructura de la tesis.**

Atendiendo a los objetivos descritos, la presente Tesis Doctoral recoge un compendio de capítulos que corresponden a diferentes artículos científicos que se encuentran en proceso de revisión en revistas internacionales de reconocido prestigio.

En este primer capítulo se pretende ofrecer una visión general de la situación actual del cultivo de la fresa, y de la desinfección de suelo y sus posibles alternativas, así como revisar los conocimientos sobre *M. phaseolina* y la podredumbre carbonosa.

En el **capítulo 2**, titulado “Evaluación de tratamientos de biosolarización para el control de podredumbre carbonosa (agente causal: *M. phaseolina*) en fresas”, se recogen los trabajos realizados, durante tres campañas agrícolas, en la finca de El Cebollar, situada en Moguer (Huelva), donde se ha estudiado la eficacia de diferentes tratamientos de biosolarización en el control de *M. phaseolina*.

## Capítulo 1

En el **capítulo 3**, “Evaluación de tratamientos químicos y de biosolarización para el control de *M. phaseolina* en el cultivo de la fresa”, se muestran los resultados de tres años de ensayos, durante los que se ha estudiado la eficacia de tratamientos de tipo químico y biológico. Estos trabajos se realizaron en dos fincas, Occifresa situada en Moguer y Fres-Gómez en Palos de la Frontera, con diferentes historiales previo de desinfección de suelo.

En el **capítulo 4**, “Evaluación de la resistencia de cultivares de fresa a *M. phaseolina*, agente causal de podredumbre carbonosa”, se ha analizado la respuesta de cultivares comerciales de fresa a *M. phaseolina*, en condiciones controladas y en campo, en suelos naturalmente infestados.

De dos estancias en *Gulf Coast Research and Education Center - University of Florida*, ha nacido el **capítulo 5**, “Eficacia de fumigantes alternativos al bromuro de metilo, en el control de *Macrophomina phaseolina*, en cultivos de fresa en florida”, que recoge los resultados de los ensayos realizados durante dos campañas. Se ha testado la eficacia de diferentes fumigantes químicos y distintas formas de aplicación en la erradicación de varios tipos de inóculo de *M. phaseolina*, enterrado en los lomos antes de la aplicación de los tratamientos.

Por último, en el **capítulo 6**, se recogen las conclusiones que se derivan de estos trabajos.

### 1.6. – Bibliografía.

**Agostini, A.** 2011. Effects of *Brassicaceae* seed meal incorporation on pre-plant weed emergence and strawberry productivity in *Macrophomina phaseolina* infested and non-infested soil. Tesis Doctoral, Sonoma State University, 41 pp.

**Aguilar, R.** 1985. Evolución histórica del cultivo del fresón en Huelva. En: Jornadas Técnicas del Fresón en la Costa de Huelva. Dirección General de Investigación y Extensión Agraria, Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Palos de la Frontera (Huelva).

**Angelini, R., y Faedi, W.** 2010. Malattie e fisiopatie. In: ART (Ed) *La Fragola*, Bologna, Italy, pp 228-246.

**Anónimo.** 2003. Diagnóstico del Sector Fresero de Huelva. Unidad de Prospectiva. Ed. DAP - Consejería de Agricultura y Pesca – Junta de Andalucía.

**Anónimo.** 2008. Consejería de Agricultura y Pesca. Reglamento Específico de Producción Integrada de fresa. Boletín Oficial Junta de Andalucía, 4:30-40.

**Anónimo.** 2014a. [www.faostat.fao.org/](http://www.faostat.fao.org/)

**Anónimo.** 2014b. [www.cals.ncsu.edu/course/pp728/macrophominiaphaseoinia.htm](http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/macrophominiaphaseoinia.htm)

**Anónimo** 2014c. [www.magrama.es](http://www.magrama.es).

**Arx, J.A. von.** 1987. Plant-pathogenic Fungi, J Cramer, Berlin, Germany.

## Capítulo 1

- Avilés, M., Castillo, S., Bascón, J., Zea-Bonilla, T., Martín-Sánchez, P.M., y Pérez-Jiménez, R.M.** 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. *Plant Pathology* 57:382.
- Babu, B.K, Saika, R., y Arora, D.K.** 2010. Molecular characterization and diagnosis of *Macrophomina phaseolina*: A charcoal rot fungus. In: Gherbawy Y, Voigt K (Eds) *Molecular Identification of Fungi*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 179-193.
- Baino, O.M., Salazar, S.M., Ramallo, A.C., y Kirschbaum, D.S.** 2011. First report of *Macrophomina phaseolina* causing strawberry crown and root rot in north-western Argentina. *Plant Disease* 95:1477.
- Barres, M.T.** 2006. La eliminación del bromuro de metilo en protección de cultivos como modelo mundial para la conservación del medio ambiente. Tesis doctoral. Departamento de Ecosistemas Agroforestales Universidad Politécnica de Valencia. 501 pp.
- Baudry, A., y Morzières, J.P.** 1993. First report of charcoal rot of strawberry in France. *Acta Horticulturae (ISHS)* 348:485-488.
- Bello, A., y Díez-Rojo, M.A.** 2004. Situación del bromuro de metilo como fumigante de suelo en el año 2005. Usos críticos y alternativas en España. *Phytoma España*, 161:20-25.
- Bello, A., González, J.A. y Tello, J.C.** 1997. La biofumigación como alternativa a la desinfección el suelo. *Horticultura Internacional* 17:41-43.
- Bello, A., López-Pérez, J.A., Sanz, R., Escuer, M., y Herrero, J.** 2000. Biofumigation and organic amendments. Regional Workshop on Methyl Bromide Alternatives for North Africa and Southern European Countries, United Nations Environment Programmed (UNEP), Francia, 113-141.
- Bello, A., López-Pérez, J.A., Arias, M., Lacasa, A., Ros, C., Herrero, M., y Fernández, P.** 2001. Biomufigation and grafting in pepper as alternative to MB. Annual International Research Conference on MB Alternatives and Emissions Reductions, 5-9 November 2001, San Diego, California, EEUU, 31.1-31.2.
- Bello, A., López-Pérez, J.A., García-Álvarez, A., Fresno, J., Escuer, M., Arcos, S.C., Lacasa, A., Sanz, R., Gómez, P., Díez-Rojo, M.A., De la Goitia, C., Horra, J.L., y Martínez, C.** 2004. Biofumigation, fallow, and nematode management in vineyard replant. *Nematropica* 34:36-39.
- Benlioğlu, S., Yıldız, A., y Döken, T.** 2004. Studies to determine the causal agents of soil-borne fungal diseases of strawberries in Aydin and to control them by soil disinfestation. *Journal of Phytopathology* 152:509-513.
- Berg, G.** 2007. Biological control of fungal soilborne pathogens in strawberry. En: Chincholkar SB, Mujerki KG (Eds) *Biological Control of Plant Diseases*, The Haworth Press, Inc., Binghamton NY, pp 1-17.
- Bianco, V., Nicholls, J., Mattner, S., Allen, D., y Porter, I.** 2000. Biofumigation in Australian horticulture: an integrated approach to MB replacement. 2000 Annual International Research

## Capítulo 1

Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. Conference Proceedings. Available on line: [www.mbao.org/altmet00/18bianco.pdf](http://www.mbao.org/altmet00/18bianco.pdf)

**Bolda, M., y Koike, S.** 2012. Third *Macrophomina* find in Watsonville-Salinas production district. Available online: <http://www.ucnr.edu.blog>.

**Bowers, G.R., y Russin, J.S.** 1999. Soybean disease management. In Soybean production in the mid-south. L. G. Heatherly and H. F. Hodges. CRC Press.

**Brazanti, E.C.** 1989. La Fresa. Ed. Mundi-Prensa, pp. 1 - 389.

**Bringhurst, R.S., y Voth, V.** 1979. California strawberry cultivar: past, present and prospect. *Fruit Var J.*, 33:45-48.

**Bruton, B.D., Jeger, M.J., y Reuveni, R.** 1987. *Macrophomina phaseolina* infection and vine decline in cantaloupe in relation to planting date, soil environment, and plant maturation. *Plant Disease* 71:259-263.

**Butler, D.M., Rosskopf, E.N., Kokalis-Burelle, N., Albano, J.P., Muramoto, J., Shennan, C.** 2012. Exploring warm-season cover crops as carbon sources for anaerobic soil disinfestation (ASD). *Plant Soil* 355:149-165.

**Calatrava, J.** 2002. South-western Spain strawberry growers awareness of the Methyl Bromide phase-out and their willingness to pay for alternatives. *Proc. International Conference on Alternatives to Methyl Bromide. The Remaining Challenges. Seville 5-8 March*: 302-306.

**Castell, V.** 1995. El cultivo de la fresa en la Comunidad Valenciana. Características. Curso Internacional Cultivo de la Fresa (Frutilla). Dirección General de Investigación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Málaga-Huelva.

**Cebolla, V., Gómez, M., Roselló-Oltra, J., Pomares, F., y Ramos, C.** 2004. Eficacia de la solarización y contaminación por nitratos tras la aportación de estiércol. *Comunicaciones del VI Congreso SEAE. Almería 27 septiembre-2 octubre, 2004*. pp. 411-418.

**Cenis, J.L.** 1991. Control de hongos del suelo mediante solarización. *Phytoma España* 30: 59-61.

**Chellemi, D.O., Olson, S.M., y Mitchell, D.J.** 1994. Effects of soil solarization and fumigation on survival of soilborne pathogens of tomato in Northern Florida. *Plant Disease* 78: 1167-1172.

**Crous, P.W., Slippers, B., y Wingfield, M.J.** 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55:235-53.

**Darrow, G.M.** 1966. *The strawberry: History, breeding and physiology*. Holt, Rinehart and Winston (eds). New York, USA.

**De Cal, A., Martínez-Trecheño, A., López-Aranda, J.M., y Melgarejo, P.** 2004. Chemical alternatives to Methyl Bromide in Spanish strawberry nurseries. *Plant Dis.* 88:210-214.

**De los Santos, B., Chamorro, M., Domínguez, P., Medina-Mínguez, J.J., Miranda, L., Soria, C., Talavera, M., Velasco, L., López-Aranda, J.M. y Romero, F.** 2012. Incidence of charcoal rot, causal

## Capítulo 1

agent *Macrophomina phaseolina*, in biosolarized soil. *Book of Abstracts VII International Strawberry Symposium ISHS*, pp 401. *Acta Horticulturae*. In Press.

**De Vicente, J.** 2008. Aspectos económicos. pp: 293-305 En: La fresa de Huelva. Ed. Junta de Andalucía – Consejería de Agricultura y Pesca.

**Dhingra, O.D., y Sinclair, J.B.** 1975. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil: Effects of soil moisture, carbon:nitrogen ratios, carbon sources, and nitrogen concentrations. *Phytopathology* 65:236-240.

**Diáñez, F.** 2005. Evaluación de la capacidad supresora de la microbiota bacteriana y fúngica del compost de orujo de vid frente a hongos fitopatógenos. Tesis doctoral. Departamento de Producción Vegetal. Universidad de Almería. 276 pp.

**Díaz, S., Rodríguez, A., y Gallo, L.** 2005: Solarización y biosolarización: alternativas a la desinfección química de suelos agrícolas. Cuadernos de divulgación. Departamento de Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. Consejería de Agricultura, ganadería, pesca y alimentación. Gobierno de Canarias. 38 pp.

**Diez-Rojo, M.A., López-Pérez, J.A., Arcos, S.C., González, L.M. R., Robertson, L., Guerrero, M.M., Ros, C., Lacasa, A., Torres, J.M. de Cara, M., Tello, J.C., y Bello, A.** 2008a. Soil biodisinfection as an alternative to soil fumigants. Proceedings of fifth International Congress of Nematology, 13-18 Julio 2008, Brisbane, Australia, 133 pp.

**Diez-Rojo, M.A., López-Pérez, J.A., González, L.M., Arcos, S.C., García, D.V., Iglesias, G. C., y Bello, A.** 2008b. The use of by products from the wine industry in the control of plant parasitic nematodes. Third International Biofumigation Symposium, 21-25 July 2008, Canberra, Australia, 40 pp.

**Diez-Rojo, M.A., Torres, J.M., López-Pérez, J.A., Robertson, L., Arcos, S.C., González, L. M., García, D.V., de Cara, M., Tello, J.C., y Bello, A.** 2008c. Biofumigation and management of soil-borne organism of crops on sandy soils in Almeria (Spain). Third International Biofumigation Symposium, 21-25 July 2008, Canberra, Australia, 38 pp.

**Domínguez, P., Miranda, L., Soria, C., de los Santos, B., Chamorro, M., Romero, F., Daugovish, O., López-Aranda, J.M. y Medina, J.J.** 2014. Soil biosolarization for sustainable strawberry production. *Agron. Sustain. Dev.* DOI 10.1007/s13593-014-0211-z.

**Duniway, J.M.** 2002. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology* 92:1337-1343.

**Fang, X.L., Phillips, D., Li, H., Sivasithamparam, K., y Barbetti, M.J.** 2011. Comparisons of virulence of pathogens associated with crown and root diseases of strawberry in Western Australia with special reference to the effect of temperature. *Sci. Hort.* 131:39-48.

**Fernández, R.B., De Santiago, A., Delgado, S.H., y Pérez, N.M.** 2006. Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase gene. *Journal of Plant Pathology* 88:1-8.

## Capítulo 1

- Flores, P., Hellín, P., Lacasa, A., Fernández, P., Ruiz M., Marin, C., y Fenoll, J.** 2006. Estudio de la acumulación de metales pesados en suelo después de sucesivas desinfecciones con biofumigación + solarización. Libro de resúmenes del VII Congreso de la SEAE . Zaragoza, 18-23 Septiembre 2006, p. 109.
- Folquer, F.** 1986. La frutilla o fresa. Estudio de la planta y su producción comercial. Hemisferio Sur, S.A. Buenos Aires (Rep. Argentina). 150 pp.
- Gamliel, A., y Stapleton, J.J.** 1993a. Effect of soil amendment with chicken compost, ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms, and lettuce growth. *Plant Disease* 77:886-891.
- Gamliel, A., y Stapleton, J.J.** 1993b. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. *Phytopathology* 83:899-905.
- Golzar, H., Phillips, D., y Mack, S.** 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in western Australia. *Australasian Plant Disease Notes* 2:145-147.
- Goudarzi A., Banihashemi, Z., y Maftoun, M.** 2008. Effect of water potential on sclerotial germination and mycelial growth of *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathol. Mediterr.* 47:107-114
- Guerrero, M.M., Ros, C., Lacasa, C.M., Martínez, V., Fernández, P., Bello, A., y Lacasa, A.** 2008. Control de nematodos en invernaderos de pimiento mediante biosolarización con enmiendas orgánicas. *Actas del VIII Congreso SEAE*, 16-20 Septiembre 2008, Bullas, Murcia, pp 87.
- Gullino, M.L., Savigliano, R., Gasparrini, G., y Clini, C.** 2007. Critical use exemption for methyl bromide for soil disinfestation: Italy's experience with the European Union process. *Phytoparasitica* 35:321-329
- Hancock, J. F.** 1999. Strawberries. Ed. CABI Publishing. Cambridge (UK).
- Holliday, P., y Punithaligam, E.** 1970. *Macrophomina phaseolina*. Commonwealth Mycological Institute Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, N° 275. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Juscafresca, B., e Ibar, L.** 1987. Fresas y Fresones. Ed. A. Aedos, pp. 1 - 174.
- Katan, J.** 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Annual Review of Phytopathology* 19:211-236.
- Katan, J.** 1996. Soil solarization: Integrated control aspects. In: *Strategies for Managing Soilborne Pathogens*. R. Hall, ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN (USA)
- Katan, J.** 1999. The methyl bromide issue: Problems and potential solutions. *Journal of Plant Pathology*, 81:153-159.
- Katan, J., Fishler, G., y Grinstein, A.** 1983. Short- and Long-term effects of soil solarization and crop sequence on fusarium wilt and yield of cotton in Israel. *Phytopathology* 73:1215-1219.

- Katan, J., Greenberger, A., Alon, H., y Grinstein, A.** 1976. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soilborne pathogens. *Phytopathology* 66:683-688.
- Keinath, A.P.** 1996. Soil amendment with cabbage residue and crop rotation to reduce gummy stem blight and increase growth and yield of watermelon. *Plant Disease* 80:564-570.
- Koike, S.T.** 2008. Crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in California. *Plant Disease* 92:1253-1253.
- Koike, S.T., Gordon, R., Daugovish, O., Ajwa, H., Bolda, M., y Subarao, K.** 2012. Recent Developments on Strawberry Plant Collapse Problems in California Caused by *Fusarium* and *Macrophomina*. *Intl. Journal of Fruit Science* 13:76-83.
- Koike, S.T., Subbarao, K.V., Davis, R.M., y Turini, T.A.** 2003. Vegetable diseases caused by soilborne pathogens. ANR Publication 8099: 1-13.
- Lele, V.C., y Phatak, H.C.** 1965. Leaf blight and dry stalk rot of strawberry caused by *Rhizotonia bataticola*. *Indian Phytopathol.* 71:953.
- Locascio, S.J., Olson, S.M., Chase, C.A., Sinclair, T.R., Dickson, D.W., Mitchell, D.J., y Chellemi, D.O.** 1999. Strawberry production with alternatives to methyl bromide fumigation. *Proc. National Agric. Plastics Congress* 28:148-154.
- López-Aranda, J.M.** 1998. La fragola in Spagna e le nuove varietà. En: *La fragola verso il 2.000*. Camera di Commercio Industria, Artigianato e Agricoltura di Verona (Italia), ed.: 53-63.
- López-Aranda, J.M.** 2008. El cultivo de la fresa en Huelva. En: *La fresa de Huelva*. Pp 103-176: Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla.
- López-Aranda, J.M.** 2012. Methyl bromide alternatives (chemical & non-chemical) for strawberry cultivation in conventional areas of production. *Book of Abstracts VII International Strawberry Symposium ISHS*, pp 13. *Acta Horticulturae* In Press.
- López-Aranda, J.M.** 2013. Agricultural production in the EU, five years after the end of methyl bromide: problems and solutions. 2013 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. San Diego, California, USA, November 4, 2013.
- López-Aranda, J.M., y Medina, J.J.** 1996. Breve repaso al cultivo de la fresa en Europa. *Agrocosta*. Revista de la IX Edición de la Feria Comercial Agrícola. Lepe (Huelva).
- López-Aranda, J.M., Soria, C., Miranda, L., Domínguez, P., y Medina-Mínguez, J.J.** 2009. The strawberry industry in Spain: an update. 3º Simposio Nacional sobre Pequeños Frutos (III. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu). Universidad de Kahramanmaraş (Turquía). *Abstracts Book* 8-9.
- Maas, J.L.** 1998. *Compendium of Strawberry Diseases*. St Paul, Minnesota: American Phytopathological Society (APS), St. Paul, MN, USA, 98 p.
- Madkour, M.A., y Aly, M.H.** 1981. Cell wall degrading enzymes produced during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* on strawberry plants. *Journal of phytopathology* 100:36-43.

- Maroto, J.V., y López, S.** 1988. Producción de fresas y fresones. Ed. Mundi-Prensa.
- Márquez-Domínguez, J.A.** 2008. El marco geográfico de los campos de fresa, pp: 49-102 En: La fresa de Huelva. Ed. Junta de Andalucía – Consejería de Agricultura y Pesca.
- Matthiessen, J.N., y Kirkegaard, J.A.** 2006. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25:235-265.
- Mazzola, M.** 2011. Potential of biofumigation for soilborne pest control in strawberry. *Proceedings Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions*, 47:1-2.
- Medina-Mínguez, J.J.** 2008. Origen del cultivo: un pionero. En: La fresa de Huelva. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla.
- Medina, J.J., Miranda, L., Soria, C., Palencia, P., y López-Aranda, J.M.** 2009. Non-chemical alternatives to Methyl Bromide for strawberry: Biosolarization as Case-Study in Huelva (Spain). *Acta Horticulturae (ISHS)* 842:961-964.
- Mertely, J., Seijo, T., y Peres, N.** 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. *Plant Disease* 89:434-434.
- Mian, I.H., Godoy, G., Rodríguez-Kabana, R., y Morgah-Jones, G.** 1982 Chitin amendments from control of *Meloidogyne arenaria* in infested soils. *Nematologica* 12:71-84.
- Mihail, J. D.** 1989. *Macrophomina phaseolina*: Spatio-temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. *Phytopathology* 79:848-855.
- Miranda, L., Domínguez, P., Soria, C., Talavera, M., Chamorro, M., Romero, F., De los Santos, B., Medina-Mínguez, J. J., y López-Aranda, J.M.** 2012. Nuevos resultados en la evaluación de desinfectantes de suelos para el cultivo de la fresa. *Agrícola Vergel* enero-febrero, 1-6.
- Muñoz-Cabañas, R.M., Hernández-Delgado, S., y Mayek-Pérez, N.** 2005. Análisis patogénico de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes hospedadores. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:11-18
- Nag Raj, T.R.** 1993. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia. *Mycologue Publications*, Waterloo, Ontario.
- Ndiaye, M.** 2007. Ecology and Management of Charcoal Rot (*Macrophomina phaseolina*) on Cowpea in the Sahel, Thesis, Wageningen Universiteit, 122 pp
- Nelson, S.D., Riegel, C., Allen, L.H., Dickson, D.W., Gan, J., Locascio, S.J., y Mitchell, D.J.** 2001. Volatilization of 1,3-Dichloropropene in Florida plasticulture and effects on fall Squash production. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:496-502.
- Noling, J.W.** 2002. The practical realities of alternatives to methyl bromide: concluding remarks. *Phytopathology* 92:1373-1375.

## Capítulo 1

- Odvody, G.N., y Dunkle, L.D.** 1979. Charcoal stalk rot of sorghum: Effect of environment in host-parasite relations. *Phytopathology* 69:250-254.
- Olaya, G., y Abawi, G. S.** 1996a. Effect of water potential on mycelial growth and on production and germination of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease* 80:1347-1350.
- Olaya, G, Abawi, G. S., y Barnard, J.** 1996b. Influence of water potential on survival of sclerotia in soil and on colonization of bean stem segments by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease* 80:1351-1354.
- Ozores-Hampton, M., Stansly, P.A., McSorley, R., y Obreza, T.A.** 2005. Effects of long-term organic amendments and soil solarization on pepper and watermelon growth, yield, and soil fertility. *HortScience* 40:80-84.
- Papavizas, G., y Klag, N.G.** 1975. Isolation and quantitative determination of *Macrophomina phaseolina* from soil. *Phytopathology* 65:182-187
- Pascual, J. A., Navarro, N., Mercader, D., Fernández, P., y Lacasa, A.** 2006. Efectos de la biosolarización sobre la lixiviación de nitratos en cultivos de pimiento en invernadero. Libro de resúmenes del VII Congreso de la SEAE. 18-23 Septiembre 2006, Zaragoza, España. p. 95.
- Pinkerton, J.N., Ivors, K.L., Reeser, P.W., Bristow, P.R., y Windom, G.E.** 2002 The use of soil solarization for the management of soilborne plant pathogens in strawberry and red raspberry production. *Plant Disease* 86: 645-651.
- Pinzon, M.** 2011. Overview of MeBr Projects funded by the multilateral fund of the Montreal Protocol. Proceedings 2011 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. Available online: [www.mbao.org/2011/Pinzon.pdf](http://www.mbao.org/2011/Pinzon.pdf).
- Pratt, R.G.** 2006. A direct observation technique for evaluating sclerotium germination by *Macrophomina phaseolina* and effects of biocontrol materials on survival of sclerotia in soil. *Mycopathologia* 162:121-131
- Qin, R., Gao, S., y Ajwa, H.** 2011. Fumigant degradation as affected by different application rate in five soils. *Proceedings 2011 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions*. 79:1-3
- Ramos, C., Pomares, F., Cebolla, V., Gómez, M., y Roselló Olira, J.** 2004. Eficiencia de la solarización y contaminación por nitratos tras la aportación de estiércol. Comunicaciones del VI Congreso de la SEAE. Almería, 27 septiembre-2 octubre, 2004. pp. 411-418.
- Rayatpanah, S., Nanagulyan, S.G., Alav, S.V., Razavi, M., y Ghanbari-Malidarreh, A.** 2012. Pathogenic and genetic diversity among Iranian isolates of *Macrophomina phaseolina*. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72:40-44
- Redondo, C., Villarino, M., Larenas, J., Melgarejo, P., y De Cal, A.** 2012. Enfermedades emergentes en los viveros de altura. Libro de Resúmenes XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología, p 321

## Capítulo 1

- Rodríguez-Kábana, R.** 1998. Alternatives to MB soil fumigation. Pp: 17-34 En: Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries. DG XI EU, CSIC, Valencia. A. Bello, J.A. González, M. Arias, R. Rodríguez-Kábana (Eds).
- Ros, M., García, C., Hernández, M.T., Lacasa, A., Fernández, P., y Pascual, J.A.** 2008. Effects of biosolarization as methyl bromide alternative for *Meloidogyne incognita* control on quality of soil under pepper. Biol. Fertil. Soils 45:37-44.
- Rossmann, A.Y., y Palm-Hernández, M.E.** 2008. Systematics of plant pathogenic fungi: Why it 590 matters. Plant Disease, 92:1376-1386.
- Santos, B.M.** 2007. Soil fumigation after methyl bromide: research on 1,3-Dichloropropene plus chloropicrin in Florida. HS1119, one of a series of the Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, pp1-6
- Santos, B.M., Gilreath, J.P., López-Aranda, J.M., Miranda, L., Soria, C., y Medina, J.J.** 2007. Comparing methyl bromide alternatives for strawberry in Florida and Spain. Journal of Agronomy 6:225-227.
- Santos, M., Martín, F., Diáñez, F., Carretero, F., García-Alcazar, M., de Cara, M., y Tello J. C.** 2008. Efecto de la aplicación de vinaza de vino como biofertilizante y en el control de enfermedades en el cultivo de pepino. VIII Congreso SEAE, 16-20 Septiembre 2008, Bullas, Murcia, pp 90.
- Sharifi, K., y Mahdavi, M.** 2011. First report of strawberry crown and root rot caused by *Macrophomina phaseolina* in Iran. Iran. J. Plant Pathol. 47:161
- Shennan, C., Muramoto, J., Bolda, M., Koike, S.T., Daugovish, O., Roskopf, E., Burelle, N.K., Klonsky, K.** 2007. Optimizing anaerobic soil disinfestation: an alternative to soil fumigations?. Proceedings Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, 40:1-4.
- Shokes, F.M., Lyda, S.D., y Jordan, W.R.** 1977. Effect of water potential on the growth and survival of *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology 67:239-241
- Short, G.E., Wyllie, T.D., y Bristow, P.R.** 1980. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residues of soybean. *Phytopathology* 70:13-17
- Stapleton, J.J.** 2000. Soil solarization in various agricultural production systems. Crop Protection 19:837-841.
- Stapleton, J.J., y DeVay, J.E.** 1995. Soil solarization: A natural mechanism of integrated pest management. En: Novel Approaches to Integrated Pest Management, Ed. Reuveni, R. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl. pp. 309-322
- Su, G., Suh, S.O., Schneider, R.W., y Russin, J.S.** 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology 91:120-126.
- Tello, J.C., y Bello, A.** 2002. Plastics in the disinfection of agriculture land. Plasticulture 121:50-71.

- Tjamos, E.C., Antoniou, P.P., Skourtaniotis, A., Kikrilis, E., y Tjamos, S.E.** 2006. Impermeable plastics and methyl bromide alternatives in controlling soilborne fungal pathogens of strawberries in Greece. Proceedings 12<sup>th</sup> Cong. Med. Phytopath. Union, pp 255-257.
- Tweedy, B., y Powell, D.** 1958. Charcoal rot on strawberry in Illinois. Plant Disease Reporter 42: 107.
- Wheeler, H.** 1975. Plant pathogenesis, Academic Press, New York and London, pp 2-3.
- Wilhelm, S., y Sagen, J. E.** 1974. A history of the strawberry from ancient garden to modern markets. Universidad California, Berkley. USA.
- Yates, S.R., y Gan, J.** 1997. Accelerated Degradation of Methyl Bromide in Methane-,2,4-D, and Phenol-Treated Soils. Bulletin of Enviromental Contamination and Toxicology Volume 59, Number 5:736-743.
- Yates, S.R., Gan, J., Papiernik, S.K., Dungan, R., y Wang, D.** 2002. Reducing fumigant emissions after soil application. *Phytopathology* 92:1344-1348.
- Yélamos, J.A., Castillo, P., Diánez, F., Villaescusa, J., Santos, M., Chebâani, M., Blanco, R., Lacasa, A., y Tello, J.C.** 2002. Efectos del bromuro de metilo y la biofumigación con solarización sobre la microbiota fúngica, actinomicética y bacteriana de suelos cultivados con pimiento en Murcia. Comunicaciones del V congreso de la SEAE. Gijón, 16-21 Septiembre, 2002. pp. 1023-1025.
- Zveibil, A., y Freeman, S.** 2005. First report of crown and root rot in strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Israel. Plant Disease 89:1014-1014.
- Zveibil, A., Mor, N., Gnayem, N., y Freeman, S.** 2012. Survival, host–pathogen interaction, and management of *Macrophomina phaseolina* on strawberry in Israel. Plant Dis. 96:265-272.

**EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS DE BIOSOLARIZACIÓN PARA EL CONTROL DE PODREDUMBRE CARBONOSA (AGENTE CAUSAL: *MACROPHOMINA PHASEOLINA*) EN FRESAS.**

**2.1. - Resumen**

*Macrophomina phaseolina*, agente causal de la podredumbre carbonosa, es un patógeno que se transmite principalmente a través del suelo. La podredumbre carbonosa se está convirtiendo en un problema creciente en el cultivo de la fresa. En la provincia de Huelva, esta enfermedad se detectó por primera vez en 2006. Después del abandono del BM, como principal fumigante de suelo, algunos autores han asociado los cambios en las formas y en la dosis de aplicación de los productos utilizados para la fumigación en la desinfección de suelos con la aparición y el establecimiento de *M. phaseolina*. Además, en los países desarrollados, la mayoría de los fumigantes químicos considerados como alternativas viables, no podrán ser utilizados en un futuro, debido principalmente a las restricciones impuestas por la UE. Entre las alternativas no químicas, para la producción de fresa, se encuentra la biosolarización del suelo, una nueva técnica que combina otras dos: la biofumigación y la solarización. En este estudio, se compara la eficacia de diversos tratamientos de biosolarización en el control de *M. phaseolina* durante tres campañas sucesivas en una finca experimental, cuyos suelos no han sido tratados con productos de síntesis, ubicada en Moguer, en la provincia de Huelva. La influencia de estos tratamientos en la población de *M. phaseolina* en suelo, el desarrollo de la podredumbre carbonosa en corona y la producción de fruta en fresa, se determinó en las campañas agrícolas 2009, 2010 y 2011. El suelo fue biofumigado mediante enmiendas con estiércol fresco de pollo (gallinaza) a 12.500kg/ha, con o sin *Trichoderma* spp (TUSAL<sup>®</sup>) a 3,5kg/ha; gallinaza a 25.000kg/ha; “pellets” de *Brassica* spp. (BIOFENCE<sup>®</sup>) a 2.000kg/ha ó 15.000kg/ha; orujillo de olivo a 12.500kg/ha o vinaza de azúcar de remolacha a 15.000kg/ha. El suelo fue posteriormente solarizado durante 30 días, mediante una cubierta con plástico transparente. El control no tratado, recibió estiércol fermentado pero no fue solarizado. Los tratamientos redujeron o estabilizaron la población de *M. phaseolina* en suelo comparándolas con el control. Los tratamientos de biosolarización con gallinaza a 25.000kg/ha o vinaza de azúcar de remolacha a 15.000kg/ha redujeron significativamente la incidencia de podredumbre carbonosa con respecto al control no tratado. Los rendimientos obtenidos en la enmienda de gallinaza (entre 59.319 to 89.421kg/ha) fueron similares a los previamente citados para la fumigación química estándar con 1,3-dicloropropeno:cloropicrina. Por lo tanto, la

biosolarización con gallinaza podría ser una opción prometedora y apropiada para el cultivo de la fresa en zonas de clima templado-cálido.

**Abstract**

*Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot, is a primarily soil-borne pathogen. Charcoal rot has become increasingly troublesome in strawberry in Spain, where it was reported for the first time in 2006, and worldwide. After the phase out of methyl bromide, some authors have associated the changes in the fumigation products used and methods of applying them prior to planting strawberries with the establishment of *M. phaseolina*. Moreover, in developed countries, the majority of useful chemical alternatives are futureless, because of the regulatory restrictions. Among the non-chemical alternatives for strawberry fruit production is soil biosolarization, a new technique combined soil biofumigation and soil solarization. In this study, we compared the efficacy of several biosolarization treatments to control *M. phaseolina* for three successive seasons in a non-chemical treated field near Moguer, Huelva (southwestern Spain). The influence of these treatments on *M. phaseolina* soil population, charcoal rot development, and strawberry yield was assessed each year. Soil was biofumigated by amendment of fresh chicken manure at 12,500kg/ha with or without *Trichoderma* spp (TUSAL<sup>®</sup>) at 3,5kg/ha; fresh chicken manure at 25,000kg/ha; *Brassica* spp. pellets (BIOFENCE<sup>®</sup>) at 2,000kg/ha and 15,000kg/ha; dried olive pomace at 12,500kg/ha or sugar beet vinasse at 15,000kg/ha. Soil was then solarized for 30 days by covering with a clear plastic mulch. A control that received fermented manure remained uncovered. The treatments reduced or stabilized *M. phaseolina* sclerotia populations in soil compared to untreated control. Treatments which combined biosolarization with chicken manure at 25,000kg/ha or sugar beet vinasse at 15,000kg/ha reduced significantly the incidence of charcoal rot compared to untreated control. Furthermore, yields obtained by amendment with fresh chicken manure (59,319 to 89,421kg/ha) were also similar to the yields previously reported for the standard chemical fumigation with 1,3-dichloropropene:chloropicrin. Therefore, biosolarization with fresh chicken manure could be a promising and sustainable option for strawberry crops grown in warm temperate climate areas.

## 2.2. - Introducción

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es uno de los cultivos más importantes en la provincia de Huelva (suroeste de España), con 7.000 ha cultivadas en 2011 y una producción de 231.732 TM (Anónimo, 2011). La producción de fresa, en ese año se valoró en 300 millones de euros (Uclés *et al.*, 2011)

La podredumbre carbonosa ocasionada por *M. phaseolina* comienza a ser considerada un problema para el cultivo de la fresa, en todas las zonas donde se cultiva. *M. phaseolina* es un patógeno de suelo, ubicuo y con un amplio rango de huéspedes, que afecta a más de 500 especies cultivadas y silvestres, es de gran longevidad en suelo y con capacidad saprofítica altamente competitiva (Su *et al.*, 2001). Los síntomas en fresa consisten en marchitamiento foliar, secado y muerte de las hojas más viejas, seguido de un eventual colapso y muerte de la planta (Koike, 2008). En corte longitudinal de la corona, se observa una coloración negra o marrón que indica necrosis en los tejidos corticales y vasculares (Mertely *et al.*, 2005) (Figura 2.1). Esta enfermedad también puede ocasionar necrosis en las raíces de la planta (Avilés *et al.*, 2008).

**Figura 2.1.** - En corte longitudinal, necrosis en corona de fresa ocasionada por *M. phaseolina*.



*M. phaseolina* está considerado como un patógeno de climas cálidos y algunas de las primeras informaciones sobre este hongo en fresa provenían de India y Egipto, donde las altas

temperaturas del suelo y las condiciones de baja humedad son características. Posteriormente, se ha citado en países con climas más fríos, como Francia y España (Zveibil *et al.*, 2012). Las condiciones medioambientales como temperatura, humedad atmosférica y la humedad disponible en el suelo, juegan un papel importante en la dispersión y multiplicación de *M. phaseolina* (Khan, 2007). El desarrollo de la enfermedad se puede ver favorecido por algunas combinaciones de estrés térmico, déficit de agua en el suelo, suelos de textura ligera o estrés asociado con la reproducción del huésped (Mihail, 1989). Así, se relaciona la dominancia de este patógeno con los meses más cálidos del año, a finales de primavera o a principios de verano cuando la temperatura, a menudo, excede de los 30°C, coincidiendo con la mayor mortalidad de plantas en el cultivo de la fresa (Fang *et al.*, 2011). Concretamente, en el suroeste de España, los síntomas de podredumbre carbonosa aparecen en los campos de producción de fruto de fresa en los meses de Abril y Mayo, cuando las temperaturas exceden de 25°C (Miranda *et al.*, 2012).

*M. phaseolina* sobrevive en el suelo y en restos de plantas infectadas como microesclerocios. Estos microesclerocios son estructuras de resistencias que permiten al hongo vivir durante largos periodos de tiempo en el suelo (Dhingra y Sinclair, 1975; Zveibil *et al.*, 2012). Una baja densidad de inóculo en el suelo, puede ser suficiente para ocasionar síntomas de podredumbre carbonosa en la planta, especialmente cuando el huésped es altamente susceptible, como es el caso de *Euphorbia lathyris*. En este cultivo, se ha demostrado que densidades de esclerocios inferiores a 1 microesclerocio por gramo de suelo pueden ocasionar más de un 90% de muerte de plantas (Young y Alcorn, 1984). Sin embargo, Wyllie (1988), determinó que 15 microesclerocios por gramo de suelo pueden ser un nivel aceptable y no afectar a la producción en el cultivo de soja. Los microesclerocios son producidos en el tejido huésped y liberados al suelo cuando la planta infectada muere. Cuando el material vegetal se descompone, estas estructuras de resistencia se mantienen en el suelo durante largos periodos de tiempo, siendo el inóculo primario en las siguientes campañas agrícolas (Zveibil *et al.*, 2012). Se ha demostrado que los cultivos susceptibles a este patógeno influyen en la densidad y la dinámica del inóculo de *M. phaseolina* en el suelo, así en el caso de la soja, se detectan incrementos de la población del patógeno en el suelo en monocultivo (Mihail, 1989). Según Mihail y Alcorn (1987), los microesclerocios muestran un patrón espacial en el suelo en forma de agregados, exhibiendo un gradiente muy variable en las parcelas experimentales. En los campos de fresas infestados, generalmente se observan pequeños parches, en áreas concretas, con plantas sintomáticas. Sin embargo, en zonas donde la enfermedad se ha desarrollado durante más de una campaña, la distribución puede ser más amplia, extendiéndose el inóculo desde el área inicialmente infestada (Koike, 2008). Probablemente, las labores de labranza realizadas al inicio de cada nueva campaña contribuyen a la redistribución vertical y horizontal

de los patógenos en el suelo (Koike, 2008). En la mayoría de las zonas donde se cultiva la fresa, el sistema de cultivo es anual, sin rotación. Este cultivo intensivo combinado con las altas temperaturas alcanzadas durante la campaña, crea unas condiciones óptimas para el desarrollo y la multiplicación de patógenos de suelo como *M. phaseolina* (Zveibil *et al.*, 2012). El resultado es un daño extensivo y la reducción de la producción en las mayores áreas de producción de fruto de fresa en Europa y la zona mediterránea (Santos *et al.*, 2006)

La podredumbre carbonosa en la fresa ha sido detectada en los últimos años en: Argentina (Baino *et al.*, 2011), Australia (Golzar *et al.*, 2007), California (Koike, 2008), Florida (Mertely *et al.*, 2005), Grecia (Tjamos *et al.*, 2006), Italia (Angelini y Faedi, 2010), Irán (Sharifi y Mahdavi, 2011), Israel (Zveibil y Freeman, 2005), España (Avilés *et al.*, 2008), Turquía (Benlioğlu *et al.*, 2004). En EEUU, *M. phaseolina* fue aislado, por primera vez en 2001, de plantas marchitas y muertas procedentes de un campo de producción de fruto de fresa, en Florida (Mertely *et al.*, 2005). Posteriormente, Koike (2008) observó plantas de fresa decaídas y enfermas en campos comerciales del suroeste de California. Aún no está suficientemente claro si esta reciente aparición de información sobre la podredumbre carbonosa es debida al incremento de la dispersión del patógeno, la prohibición del BM o el creciente conocimiento de la misma como nueva enfermedad en la fresa.

Tras la prohibición y retirada del bromuro de metilo (BM) en 2005 en los países desarrollados, el manejo de algunas enfermedades relacionadas con patógenos de suelo, incluida la podredumbre carbonosa ha empezado a convertirse en un serio problema. Algunos autores han asociado los cambios en los productos usados para la fumigación de suelo y en los métodos de aplicación, con la emergencia de la podredumbre carbonosa ocasionada por *M. phaseolina* en fresa (Avilés *et al.*, 2008; Koike, 2008; Mertely *et al.*, 2005; Zveibil y Freeman, 2005). El cultivo de la fresa ha sido altamente dependiente de la utilización de BM en la desinfección de suelo. Como resultado del Protocolo de Montreal y la Regulación de la Comunidad Europea (CE) nº 2037/2000 del 29 de Junio sobre sustancias que deterioran la capa de ozono, la prohibición del uso de BM para la producción de fresas fue irreversible en países de la Unión Europea (UE) desde 2007 (Decisión de la Comisión (Comunidad Europea), 2006). Desde entonces, se han utilizado con éxito otros tratamientos químicos en España, principalmente la mezcla de 1,3-dicloropropeno (1,3 D) más cloropicrina, cloropicrina, Dazomet más 1,3 D, y metan sodio (datos no publicados). La re-evaluación de los pesticidas en la UE ha reducido drásticamente la disponibilidad de fumigantes en Europa. Actualmente, los únicos fumigantes autorizados y con restricciones son los generadores de metil isocianato: dazomet, metam sodio y metam potasio. Dazomet fue el primero autorizado como fumigante de suelo en 2011, seguido de las sales de metam potasio y sodio en 2012. Los dos últimos están autorizados para aplicaciones previas a plantación, pero solo podrán ser utilizados una vez cada tres años en el

mismo terreno y bajo plástico. Aunque, 1,3 D y cloropicrina han sido utilizados como las principales alternativas al BM, están excluidas del Anexo I desde 2010 y 2013, respectivamente, manteniéndose los “usos de emergencia nacional”, mediante permisos temporales renovables de 120 días por año para la industria agrícola, en algunos países (Italia, España y Grecia) (Colla *et al.*, 2012).

En ensayos llevados a cabo en el suroeste de España, los tratamientos de suelo preplantación con cloropicrina, 1,3 D:cloropicrina, dimetil disulfuro:cloropicrina, ioduro de metilo + cloropicrina o Dazomet (incorporado al suelo con Mix-Tiller<sup>®</sup>), no solo redujeron la población de *M. phaseolina* en el suelo, sino que mantuvieron estos bajos niveles del patógeno hasta finales de campaña (final de Mayo). Así, mientras que la mortalidad de plantas del cultivar ‘Camarosa’ fue el 20% en suelos no tratados, en los suelos fumigados no alcanzó al 10%, y en los suelos fumigados con dazomet no se detectaron plantas muertas (Miranda *et al.*, 2012). Zveibil *et al.* (2012), estudiaron el efecto de varios fumigantes químicos en el control de *M. phaseolina*. Metam sodio y BM fueron los más efectivos, consistentemente, en la erradicación de varios tipos del inóculo de *M. phaseolina* (microesclerocios, coronas y estolones naturalmente infectados). Sin embargo, la fumigación con cloropicrina o la combinación de 1,3 D:cloropicrina no fueron tan efectivos como los tratamientos con metam sodio o BM, a las distintas profundidades en este estudio.

Se han estudiado diversas aproximaciones a la producción de fresa sin BM u otros químicos, como por ejemplo: cultivo sin suelo, desinfección anaeróbica, desinfección por vapor, solarización, biofumigación y uso de herbicidas. Las investigaciones en la búsqueda de alternativas en la desinfección de suelos han sido muy intensas en países como EEUU (Ajwa *et al.*, 2003; Duniway, 2002) y España (López-Aranda *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2012a; Medina *et al.*, 2012b). A pesar de todos los esfuerzos realizados, la mayoría de las alternativas no han alcanzado, de forma consistente, la misma capacidad como fumigante de amplio espectro (patógenos de suelo, plagas y malas hierbas) que presentaba el BM.

La solarización del suelo es una aproximación no química para la desinfección del suelo. Esta técnica es una práctica de manejo del suelo que se lleva a cabo en los meses de verano para facilitar el crecimiento de los cultivos en el otoño. Se lleva a cabo cubriendo el suelo con un plástico transparente, con la finalidad de captar la radiación solar y acumular calor, así la temperatura del suelo se ve incrementada hasta niveles letales para muchas de las plagas y patógenos que afectan a las plantas (Katan, 1981). Se recomienda mantener esta cubierta plástica durante 30-45 días, en los meses donde la temperatura del suelo excede los 50°C (Medina, 2002). Los suelos solarizados son, a menudo, más supresivos frente a numerosos patógenos de plantas que los no solarizados. Los cambios en la microflora del suelo, que se

producen tras la solarización podrían incrementar el crecimiento de las plantas e inducir la supresividad frente a patógenos. Según estudios previos, realizados en campos de fresa, cuando la solarización se repite durante dos o más años consecutivos en una misma parcela, ejerce un control efectivo sobre hongos patógenos como *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Cylindrocarpon* spp. (Ben-Yephet *et al.*, 1987; Gamliel y Stapleton, 1993 b; Pinkerton *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2001). La solarización puede no ser totalmente efectiva en el control de *M. phaseolina*, especialmente en las capas más profundas del suelo (Lodha *et al.*, 1997; Yildiz *et al.*, 2010). En campos de fresa, la solarización no redujo la viabilidad de *M. phaseolina* en suelo a profundidades de 10 a 20cm, sin embargo, se determinó una reducción significativa (66%) en la supervivencia a 5cm de profundidad (Young y Alcorn, 1984). De otra parte, el efecto combinado de la solarización y la irrigación del suelo resulta, en la mayoría de los casos, en una completa erradicación de la población de *M. phaseolina* a profundidades de suelo entre 0-30cm (Lodha *et al.*, 1997).

La biofumigación es una técnica que utiliza como fumigantes para el control de patógenos de suelo, las sustancias volátiles y otros productos que se originan en el suelo como consecuencia de la biodegradación de enmiendas orgánicas y otros residuos (Bello *et al.*, 2004). Los compuestos de nitrógeno (como amonios y nitratos), los ácidos orgánicos y un gran número de sustancias son responsables de esta actividad biocida (Mian *et al.*, 1982). La biofumigación es una aproximación del uso de plantas que contienen sustancias biológicamente activas y específicas para el control contra hongos, nematodos y plagas de los cultivos agrícolas. El principio de la biofumigación se basa en el uso de plantas con altos niveles de glucosinolatos, compuestos de azufre que se producen de forma natural en las plantas naturalmente y que mejoran la protección de la planta. Cuando las plantas se incorporan al suelo, estos glucosinolatos son hidrolizados por la enzima de la planta “mirosinasa”, a pH neutro, que produce sustancias químicas activas y volátiles, como los isocianatos. Las especies de plantas más efectivas son las del genero *Brassica*, entre ellas *B. napus* y *B. oleracea* (Bianco *et al.*, 2000; Mazzola, 2011 a). Las enmiendas con harina de semillas del genero *Brassicaceae* suprimieron la proliferación de *M. phaseolina* en el suelo (Mazzola, 2011 b). Además de los residuos de *Brassicaceae*, se han ensayo otros materiales orgánico como productores de compuestos biofumigantes para la desinfección del suelo, entre estos compuestos orgánicos se incluyen los compost o enmiendas verdes, enmiendas animales (como la gallinaza) y residuos agroindustriales como cáscara de arroz, piel de cítricos, etc. Pratt (2006), demostró que el uso de los residuos de las aves domésticas de corral, produjo un control eficaz de los microesclerocios de *M. phaseolina* en suelo. Estas enmiendas orgánicas animales, redujeron la supervivencia de los microesclerocios en el suelo, trece días después de su aplicación.

Para el control de patógenos de suelo se estudia la aplicación del tratamiento de solarización integrado con el uso previo de distintas enmiendas orgánicas como las citadas anteriormente (Medina *et al.*, 2009; Ndiaye *et al.*, 2007). La combinación de solarización con aplicaciones de materia orgánica es lo que se conoce como solarización biológica o biosolarización (Ros *et al.*, 2008). Lodha *et al.* (1997), demostraron la eficacia de la aplicación de riego en verano y la posterior solarización del suelo, combinada con el aporte de residuos de especies de crucíferas en el control de *M. phaseolina*. En suelos biosolarizados con esta técnica, las poblaciones de *M. phaseolina* fueron casi totalmente erradicadas (93-99%) a profundidades de entre 0-15 y 16-30cm. En campos experimentales de fresas, la desinfección anaeróbica del suelo con desechos de aves de corral aplicados en los lomos obtuvieron rendimientos muy similares comparados al tratamiento estándar con 1,3 D:cloropicrina. La supervivencia del inóculo de *F. oxysporum* y *M. phaseolina* se redujo significativamente con ambos tratamientos al compararlos con el control no tratado. La desinfección anaeróbica fue uno de los tratamientos más eficaces en la eliminación de *M. phaseolina* (Roskopf *et al.*, 2011). Recientemente, Zveibil *et al.* (2012) han sugieren que períodos prolongados de biosolarización pueden ser un método alternativo en el control de *M. phaseolina*. Sin embargo, esta técnica no debería afectar a la producción del cultivo para que sea considerada como una alternativa viable a los productos químicos en el cultivo de la fresa.

Algunas cepas del agente de biocontrol *Trichoderma* spp. han sido probadas contra *M. phaseolina* aislada de diferentes cultivos (Elad *et al.*, 1986; Sandoval y López, 2000). La aplicación al suelo de la formulación en forma de granulado o compost seco de *T. harzianum*, *T. polysporum* y *T. viride* controlaba la necrosis de raíz, ocasionada por *M. phaseolina*, en el cultivo de berenjena (*Solanum melongena* L.) en condiciones de campo (Ramezani, 2008).

Desde la campaña 2006-07, y en un campo experimental ubicado en Moguer (Huelva), se ha analizado la eficacia de diferentes tratamientos de biosolarización en el control de hongos patógenos de suelo. La podredumbre carbonosa se detectó por primera vez en este campo durante la campaña 2009-10. El objetivo del presente estudio, fue evaluar los efectos de la aplicación repetida de distintos tratamientos de biosolarización sobre: las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo, la incidencia de podredumbre carbonosa y la producción de fruto en el cultivo de la fresa en un clima templado.

### **2.3. - Materiales y métodos**

#### **2.3.1. - Parcela experimental.**

Los ensayos de campo se llevaron a cabo en la finca experimental “El Cebollar”, perteneciente al Instituto Andaluz de Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), que se ubica en Moguer,

Huelva (longitud 6° 48'1" O, latitud 37° 14'25" N) (Figura 2.2). Los trabajos se realizaron durante tres campañas agrícolas desde 2009 hasta 2011. En los tres años, los tratamientos se aplicaron en las mismas parcelas. El suelo estaba compuesto por: 90,1% de arena, 7,2% de arcilla, y 2,8% de limo; pH de 6,5; con un contenido de materia orgánica de 0,26%; nitrógeno total 0,02%; fósforo 68mg/kg y una conductividad eléctrica de 0,19mmhos/cm.

**Figura 2.2.** - Vista aérea de la Finca Experimental “El Cebollar” (Moguer, Huelva).



Los suelos de esta finca experimental nunca han sido fumigados con productos de síntesis. En Julio de 2005, el suelo fue biosolarizado con una enmienda de gallinaza a 30.000kg/ha. Desde 2006-07, se han llevado a cabo en esta parcela ensayos con diferentes tipos de biosolarización. El control no tratado y el tratamiento de biosolarización con enmienda de gallinaza a dosis alta, se han superpuesto en las mismas parcelas y repeticiones desde 2006-07, mientras que la biosolarización con pellets de *Brassica* spp. (BIOFENCE<sup>®</sup>) a 2.000kg/ha, se aplicó por primera vez en 2008-09 (López-Aranda, 2012). *M. phaseolina* se detectó por primera vez en este campo experimental en la campaña 2009-10.

### 2.3.2. - Diseño experimental y descripción de los tratamientos.

Se aplicó un diseño experimental en bloques al azar, con cuatro repeticiones, incluyendo un testigo (control) al que se aplicó estiércol fermentado y que no fue solarizado. Las dimensiones de parcelas elementales eran 6m de largo y 3,3m de ancho, con tres lomos y, en cada uno, dos filas de plantas (marco de plantación de 25 × 25 cm) y 140 plantas cada parcela.

En cada campaña se ensayaron un total de seis tratamientos. Durante las tres campañas se repitieron cuatro tratamientos: biosolarización con estiércol fresco de pollo (gallinaza) a 25.000kg/ha (GALL-DA); biosolarización con gallinaza a 12.500kg/ha (GA-DB); biosolarización con vinaza de remolacha a 15.000kg/ha (VIN); y biosolarización con pellets de *Brassica* spp. (BIOFENCE<sup>®</sup>) a 2.000kg/ha (BP-DB). Durante la campaña 2009-10, se

aplicaron otros dos tratamientos: uno mediante biosolarización con pellets de *Brassica* spp. (BIOFENCE®) a 15.000kg/ha (BP-DB), y otro mediante biofumigación en lomo, bajo plástico negro, con BIOFENCE® a 2.000kg/ha, sin solarización del suelo (BP-DBLM). Estos dos tratamientos fueron reemplazados en las campañas 2010-11 y 2011-12 por tratamientos de biosolarización con gallinaza a 12.500kg/ha más *Trichoderma* spp. (TUSAL®, Certis, España:  $1 \cdot 10^{11}$  ufc de la cepa T11 +  $1 \cdot 10^{11}$  ufc de la cepa T25/ha) a 3,5kg/ha (GALL-DB+TR), y biosolarización con alperujo de olivo a 12.500kg/ha (AL-O), respectivamente. Todos los tratamientos se superponen en las mismas parcelas y repeticiones cada año (Tabla 2.1) (Figura 2.3).

**Tabla 2.1.** - Tratamientos aplicados al suelo en campo de producción de fruto de fresa (Moguer, Huelva).

Tratamientos	Descripción	Dosis (kg/ha de superficie tratada)			Método de aplicación
		2009	2010	2011	
C	Control no tratado				---
GALL-DA	Biosolarización con gallinaza	25.000	25.000	25.000	Pre-plantación Toda superficie
GALL-DB	Biosolarización con gallinaza	12.500	12.500	12.500	Pre-plantación Toda superficie
GALL-DB+TR	Biosolarización con gallinaza + <i>Trichoderma</i> (TUSAL®)	---	12.500 + 3,5	12,500 + 3,5	Pre-plantación Toda superficie + Riego por goteo
VIN	Biosolarización con vinaza de remolacha	15.000	15.000	15.000	Pre-plantación Toda superficie
AL-O	Biosolarización con alperujo de olivo	---	12.500	12.500	Pre-plantación Toda superficie
BP-DA	Biosolarización con pellets de <i>Brassica</i> spp. (BIOFENCE®)	15.000	---	---	Pre-plantación Toda superficie
BP-DB	Biosolarización con pellets de <i>Brassica</i> spp. (BIOFENCE®)	2.000	2.000	2.000	Pre-plantación Toda superficie
BP-DBLM	Biofumigación con pellets de <i>Brassica</i> spp. (BIOFENCE®)	2.000	---	---	Bajo lomo, con plástico negro, sin solarización

Figura 2.3. - A.) Aplicación del tratamiento de vinaza de remolacha. B.) BIOFENCE®. C.) TUSAL®.



Todos los tratamientos, excepto BP-DBLM, fueron aplicados a toda superficie. Los tratamientos de biosolarización se realizaron mediante la incorporación de materia orgánica y la simultánea solarización del suelo. Cada año, a mediados de Julio, se realizó la aplicación e incorporación al suelo (previamente regado a capacidad de campo) de las diferentes enmiendas orgánicas, a una profundidad de 20cm con un rotovator (Figura 2.4 A). A continuación, las parcelas fueron regadas mediante aspersion hasta capacidad de campo (Figura 2.4 B) y cubiertas con una lámina de plástico de polietileno transparente (0,05 mm) (12 Julio de 2009, 14 de Julio de 2010 y 12 Julio 2011) (Figura 2.4 C). La película de plástico de polietileno transparente permaneció en el suelo durante cuatro semanas, cada año, para inducir el efecto de la biosolarización. A mediados de septiembre, una vez retirado el plástico de solarización, se procedió a la preparación del suelo y abonado de fondo. El alomado se efectuó mecánicamente, colocándose simultáneamente las cintas de riego por goteo y el plástico de cobertura del lomo film de polietileno negro de 40µm de espesor (Figura 2. D). Plantas de fresa del cultivar 'Camarosa', procedentes de viveros de altura españoles, se plantaron a mano, a mediados de octubre (21 de Octubre de 2009, 26 de Octubre 2010 y 14 de Octubre de 2011) (Figura 2.5). En este trabajo se ha utilizado el cultivar 'Camarosa' por estar considerado uno de los cultivares más susceptibles a *M. phaseolina* y por tratarse del cultivar más importante en la zona de Huelva, entre 1997 y 2010. Las plantas se cultivaron en un sistema intensivo anual en macro-túneles (Medina *et al.*, 2009).

**Figura 2.4.** – A.) Aplicación de materia orgánica al suelo. B.) Riego por aspersión. C.) Colocación de láminas de polietileno (solarización). D.) Elaboración de los lomos de cultivo e instalación de cinta de riego.



**Figura 2.5.** - Plantación del cultivar 'Camarosa' en lomos de fresa de la provincia de Huelva.



2.3.3. - *Determinación de las poblaciones de M. phaseolina en el suelo.*

Con el objetivo de evaluar la eficacia de los tratamientos de desinfección, se determinó la población en suelo de *M. phaseolina* en cada parcela, como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo seco. Los muestreos se realizaron antes de la aplicación de los tratamientos (9 Julio 2009, 8 de Julio de 2010, y 4 de Julio de 2011), y días después de la aplicación de los mismos (14 Octubre 2009, 23 de Septiembre de 2010, y 6 de Octubre de 2011). Al final de cada campaña, se tomaron nuevas muestras para determinar la efectividad a lo largo plazo de los tratamientos (27 Mayo 2010, 19 de Mayo de 2011, y 15 de Mayo de 2012). Antes de la aplicación de los tratamientos, se tomaron cinco muestras en un patrón en zig-zag a toda superficie en cada parcela elemental, y se mezclaron para componer una muestra homogénea. Después de la aplicación de los tratamientos (antes de la plantación) y al final de la campaña, se tomaron tres muestras del lomo central de cada parcela (Figura 2.6), mezclándose para homogenizarla. La toma de suelo se realizó de los primeros 20 cm de profundidad, con una sonda vertical calibrada (Figura 2.7).

**Figura 2.6.** - Toma de muestra de suelo a 20cm de profundidad, en el lomo central de la parcela, con una sonda vertical graduada.

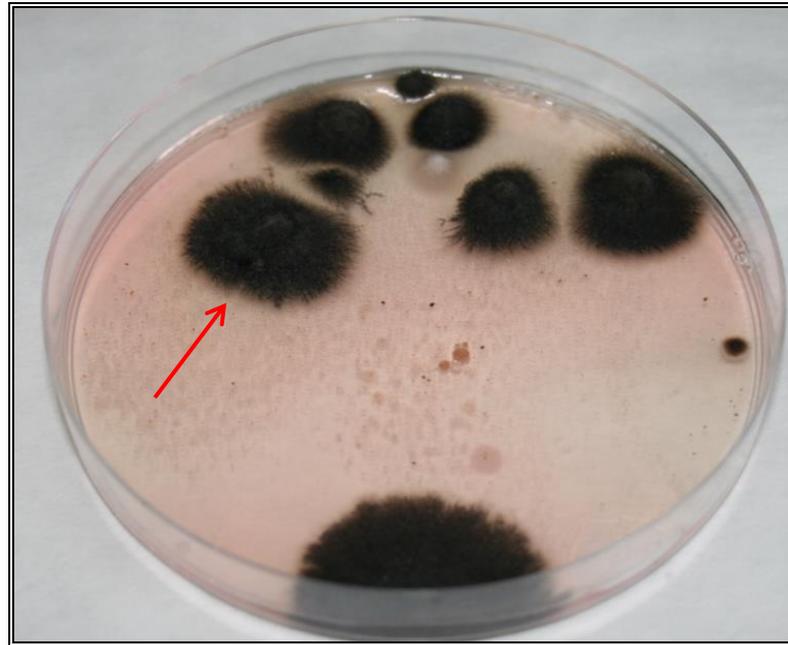


Figura 2.7. - Sonda vertical graduada.



La metodología seguida para aislamiento de suelo de *M. phaseolina* es una modificación de la utilizada por Papavizas y Klag (1975). Las muestras de suelo se dejaron secar a temperatura ambiente, de cada una de ellas se pesaron 10 gramos, a los que se añadieron 250 ml de una solución de hipoclorito sódico ( $\text{NaClO}$ ) 0,5%, mezclándose en un agitador a 2.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 segundos, dejándose reposar durante 3 minutos, en tres ciclos. El contenido se tamizó con una criba de malla de  $0,49\mu\text{m}$  (malla 325), se lavó con agua corriente para eliminar posibles restos de  $\text{NaOCl}$ . El suelo retenido en la malla se vertió en 100 mL de agua destilada estéril. A continuación, se tomaron 5 alícuotas de 1ml que se extendieron en la superficie de placas Petri, conteniendo el medio de cultivo PDA-DOPCNB (medio basal que contiene p-(dimetilamino) benzonediazo sulfonato de sodio [DASS, Dexon], bilis de buey [OXGALL] y pentacloronitrobenzeno [PCNB] a 50, 2.000, y 100mg/l, respectivamente), realizándose 5 repeticiones por muestra. Las placas se mantuvieron en oscuridad a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 7 días, momento en el cuál se evaluó el número de colonias de *M. phaseolina*. Las colonias fueron inspeccionadas microscópicamente para determinar las características morfológicas propias de este hongo (Avilés *et al.*, 2008) (Figura 2.8).

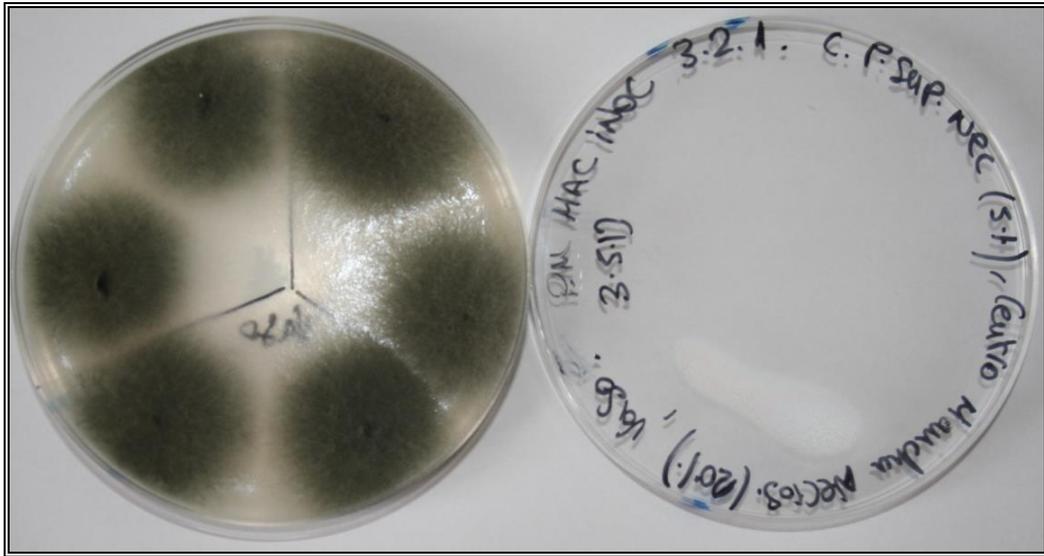
**Figura 2.8.** - En medio PDA-DOPCNB, colonias de *M. phaseolina* procedente de suelo en los que se cultiva fresa.



#### 2.3.4. - Determinación de la incidencia de podredumbre carbonosa en campo.

En cada parcela elemental, se registró, semanalmente, la incidencia de la podredumbre carbonosa a lo largo de cada campaña agrícola. Desde la aparición de los primeros síntomas y hasta mediados de mayo, se recogieron las plantas muertas de los lomos centrales de cada parcela experimental para su diagnóstico. Las plantas fueron lavadas bajo agua corriente y sumergidas durante 1 minuto en una solución acuosa de NaClO al 6,75%, siendo posteriormente lavadas dos veces con agua destilada estéril y dejándolas secar en una campana de flujo laminar. Cortes de tejido de 3 a 5mm se introdujeron en NaClO al 1% durante 2 minutos, lavándose en agua destilada estéril y dejándose secar. A continuación, los cortes se dispusieron en placas Petri con medio agar-patata-dextrosa (PDA, DIFCO) al que se le añadieron 2gr/l de extracto de levadura y 0,05gr/l de estreptomina (Tuite, 1969). Las placas se mantuvieron en oscuridad a 27°C durante 7 días, en cámara de cultivo microbiológica. Las colonias desarrolladas se observaron mediante microscopía, para determinar su coincidencia con las características de *M. phaseolina* (Zveibil y Freeman, 2009) (Figura 2.9). En cada campaña mediante muestreos estratificados, llevados a cabo antes de la plantación, se confirmó la ausencia de *M. phaseolina* en las plantas. Para ello, se realizaron aislamientos de raíces y coronas a las plantas provenientes de viveros de altura, siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

**Figura 2.9.** - En medio de cultivo PDA, colonias de *M. phaseolina* procedente de aislamientos de tejidos de raíz y corona de fresa.



### 2.3.5. - Influencia de los tratamientos en los rendimientos de cultivo.

Los frutos fueron recolectados al menos dos veces por semana, a partir del inicio de la producción (mediados de enero) y hasta final de cada campaña (mediados de mayo). Los datos de cada cosecha se registraron para cada parcela elemental. Todos los frutos fueron recolectados y se clasificaron en base a los criterios comerciales. Los frutos se clasificaron como comercializables utilizando los criterios de la normativa europea de regulación para la fruta fresca. Sólo se llevó a cabo el pesado de la fruta clasificada como comercial. Los datos se expresaron en kg/ha y g/planta (calculado sobre el número total de plantas que sobreviven para cada fecha de recolección), para detectar diferencias en rendimiento cuando la incidencia de la enfermedad fue alta. La fruta no apta comercialmente, fue rechazada sin registrar los datos (supusieron menos del 2-3% de los frutos cosechados). Se realizaron, al menos, 25 cosechas en cada una de las campañas agrícolas.

### 2.3.6. - Registro de datos meteorológicos.

Los datos meteorológicos se obtuvieron de una estación meteorológica automatizada, que consistía en un data logger (CR10X, Campbell Scientific Ltd. Leicestershire, Reino Unido); sensores de humedad (HR) y de temperatura (HMP 45C Vaisala Oyj, Helsinki, Finlandia). Esta estación meteorológica forma parte de la Red de Servicios de Datos Meteorológicos de la Junta de Andalucía, y se encuentra a unos 100 m de la parcela experimental, en la misma finca y situada bajo macrotúnel.

### 2.3.7. - Análisis estadístico.

La incidencia de la podredumbre carbonosa, se expresó como porcentaje acumulado de las plantas muertas. Los datos de porcentaje, se transformaron mediante la transformación arcoseno antes del análisis de la varianza (ANOVA). El ANOVA se realizó para las UFC/g de *M. phaseolina* y el rendimiento total de fruta comercializable. Los datos de población del suelo fueron transformados mediante la transformación raíz cuadrada. Cuando el estadístico *F* de un ANOVA fue significativo a  $P < 0,05$ , las medias se compararon mediante la prueba de la mínima diferencia significativa (MDS) de Fischer, a un nivel de significación del 5%. Las correlaciones entre la población de *M. phaseolina* en suelo y el porcentaje de plantas muertas o la producción de fruta se determinaron utilizando el coeficiente de correlación de Kendall y Spearman (De los Santos *et al.*, 2003). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa “Statistix” vs 8.0 (Analytical Software, Ltd., La Jolla, CA, EE.UU.).

## 2.4. - Resultados

### 2.4.1. - Determinación de las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo.

En las muestras de suelo tomadas antes de la aplicación de los tratamientos, el rango del número medio de propágulos de *M. phaseolina* por gramo de suelo se encontró entre 0-12, 0-58 y 0-26 UFC/g, en 2009-10, 2010-11 y 2011-12, respectivamente. Sólo en la primera campaña se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, en las poblaciones de *M. phaseolina* en el suelo (Tabla 2.2).

En 2009-10, antes de la aplicación de los tratamientos de biosolarización, las poblaciones de *M. phaseolina* fueron más altas en los suelos correspondientes al tratamiento con BP-DBLM y al control, con 7,5 y 3,0 UFC/g, respectivamente. Después de la aplicación de los tratamientos, estos valores se incrementaron hasta 10,0 y 18,7 UFC/g, respectivamente. El resto de los tratamientos disminuyeron la población de suelo de *M. phaseolina* hasta valores iguales o inferiores a 1,0 UFC/g. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre control y el resto de los tratamientos. En las muestras tomadas en Mayo 2010, se obtuvieron resultados similares, aunque se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, con la excepción de BP-DBLM (Tabla 2.2).

En 2010-11, antes de que los tratamientos de biosolarización fueran aplicados, las poblaciones de *M. phaseolina* fueron más altas en el control (19,5 UFC/g) y en las parcelas correspondientes al tratamiento AL-O (12,5 UFC/g). Después de la biosolarización con AL-O, el número de propágulos se redujo a 1,0 CFU/g, manteniendo esta eficacia hasta el final de la campaña.

En 2011-12, la densidad de *M. phaseolina* en suelo antes de la aplicación de los tratamientos, fue de 11,0 y 6,5 UFC/g, en el control no tratado y AL-O, respectivamente (Tabla 2.2).

Durante las dos últimas campañas agrícolas, la mayoría de los tratamientos de biosolarización redujeron significativamente los niveles de *M. phaseolina* en suelo respecto al control no tratado, con la excepción de GALL-DB. Al final de ambas campañas (muestreos de mayo), los valores en todos los tratamientos fueron significativamente distintos a los del control. Las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo fueron inferiores a 2,0 UFC/g en todos los tratamientos, manteniéndose altas en las parcelas control (18,5 y 20,5 UFC/g en 2010-11 y 2011-12, respectivamente) (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.-** Población de *Macrophomina phaseolina* (UFC/g de suelo seco) antes y después de los tratamientos de biosolarización, y al final de cada campaña en suelos donde se cultiva fresa, en tres campañas consecutivas <sup>y</sup>.

Tratamientos <sup>z</sup>	2009/10			2010/11			2011/12		
	Antes	Después	Final	Antes	Después	Final	Antes	Después	Final
Control	3,0ab	18,1	11,5a	19,5	21,5a	18,5a	11,0	22,4a	20,5a
GALL-DA	0,0b	0,5	1,0b	0,0	0,0b	0,0b	0,5	0,0b	0,5b
GALL-DB	2,5ab	0,0	0,0b	0,5	7,0ab	0,0b	1,0	2,5b	0,5b
GALL-DB+TR	---	---	---	0,0	1,0b	0,0b	0,0	0,5b	0,0b
VIN	0,0b	0,0	0,0b	0,0	0,0b	0,0b	1,5	0,0b	0,5b
AL-O	---	---	---	12,5	1,0b	1,0b	6,5	3,0b	0,0b
BP-DA	0,5b	1,0	0,0b	---	---	---	---	---	---
BP-DB	0,5b	0,0	0,5b	0,5	0,5b	2,0b	0,5	0,0b	0,0b
BP-DBLM	7,5a	10,0	15,0a	---	---	---	---	---	---

<sup>y</sup> Unidades formadoras de colonias de *M. phaseolina* por gramo de suelo seco. Cada valor es la media de cuatro parcelas y cinco repeticiones. Los valores seguidos por la misma letra en una columna no difieren significativamente según la prueba MDS ( $P < 0,05$ ) (datos transformados mediante raíz cuadrada). Se presentan los datos no transformados. “---” = no determinado

<sup>z</sup> Los detalles de los tratamientos se describen en la Tabla 2.1.

#### 2.4.2.- Incidencia de podredumbre carbonosa.

No se detectó *M. phaseolina* en los aislamientos realizados a plantas procedentes de vivero y muestreadas antes de la plantación, en cada campaña. En 2009-10, las primeras plantas con síntomas de marchitamientos o decaimiento, se detectaron el 24 de Marzo, con un máximo de 2,9% de plantas muerta en las parcelas control (Figura 2.10). En los días anteriores, la

temperatura máxima media ( $T^a_{max}$ ) fue de 25°C y la humedad relativa media ( $HR_{mn}$ ) del 78,0%. Desde mediados de marzo hasta final de campaña, las temperaturas máximas variaron entre 25 y 34°C y el promedio  $HR_{mn}$  fue de 58,0%. Durante este período, la mortalidad tuvo un gran incremento y alcanzó el 28,2% en las parcelas control. La mortalidad en las parcelas biofumigadas con BP-DBLM alcanzó el 29,5%. La incidencia de la enfermedad en los tratamientos aplicados a toda superficie fue significativamente inferior (Figura 2.11, Tabla 2.3). Se encontró una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de plantas muertas acumulado (al final de la campaña) y el número de microesclerocios de *M. phaseolina* en suelo (muestreos de octubre y mayo) (coeficiente de correlación de Spearman de 0,5885 ( $P < 0,0023$ ) y 0,7133 ( $P < 0,0001$ ), respectivamente).

Figura 2.10.- Plantas del cultivar ‘Camarosa’ con síntomas de podredumbre carbonosa.



En 2010-11, las primeras plantas sintomáticas se detectaron el 29 de marzo, con un porcentaje de mortalidad del 10% en las parcelas control (Figura 2.11). Durante los días previos, el promedio de  $T^a_{max}$  fue de 24°C y la  $HR_{mn}$  del 75,0%. Durante los primeros días del mes de abril, se produjo un pico de  $T^a_{max}$  de 32,8°C, (media 30°C) y una  $HR_{mn}$  de 66,0%. El 12 de Abril, la mortalidad en las parcelas control alcanzó el 28%. Desde el 21 de mayo hasta el final de la campaña, los valores de  $T^a_{max}$  fueron superiores a 40°C y el promedio de  $HR_{mn}$  inferior a 55,0%, con porcentajes de mortalidad de plantas de hasta el 43% en las parcelas control (Figura 2.11). Los tratamientos de biosolarización con gallinaza y VIN redujeron de manera significativa el porcentaje de mortalidad de plantas acumulado respecto al control no tratado (Tabla 2.3). Se detectó una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de mortalidad acumulado y la población de *M. phaseolina* en suelo, en los muestreos llevados a

cabo en los meses de Octubre y Mayo (coeficiente de correlación de Spearman 0,7103, ( $P < 0,0000$ ) y 0,6942, ( $P < 0,0001$ ), respectivamente).

**Tabla 2.3.** - Efecto de los tratamientos de desinfección de suelo en el porcentaje de mortalidad, ocasionada por *Macrophomina phaseolina*, durante las campañas agrícolas 2009-10, 2010-11 y 2011-12. Mortalidad acumulada hasta el final de cada campaña (Mayo).

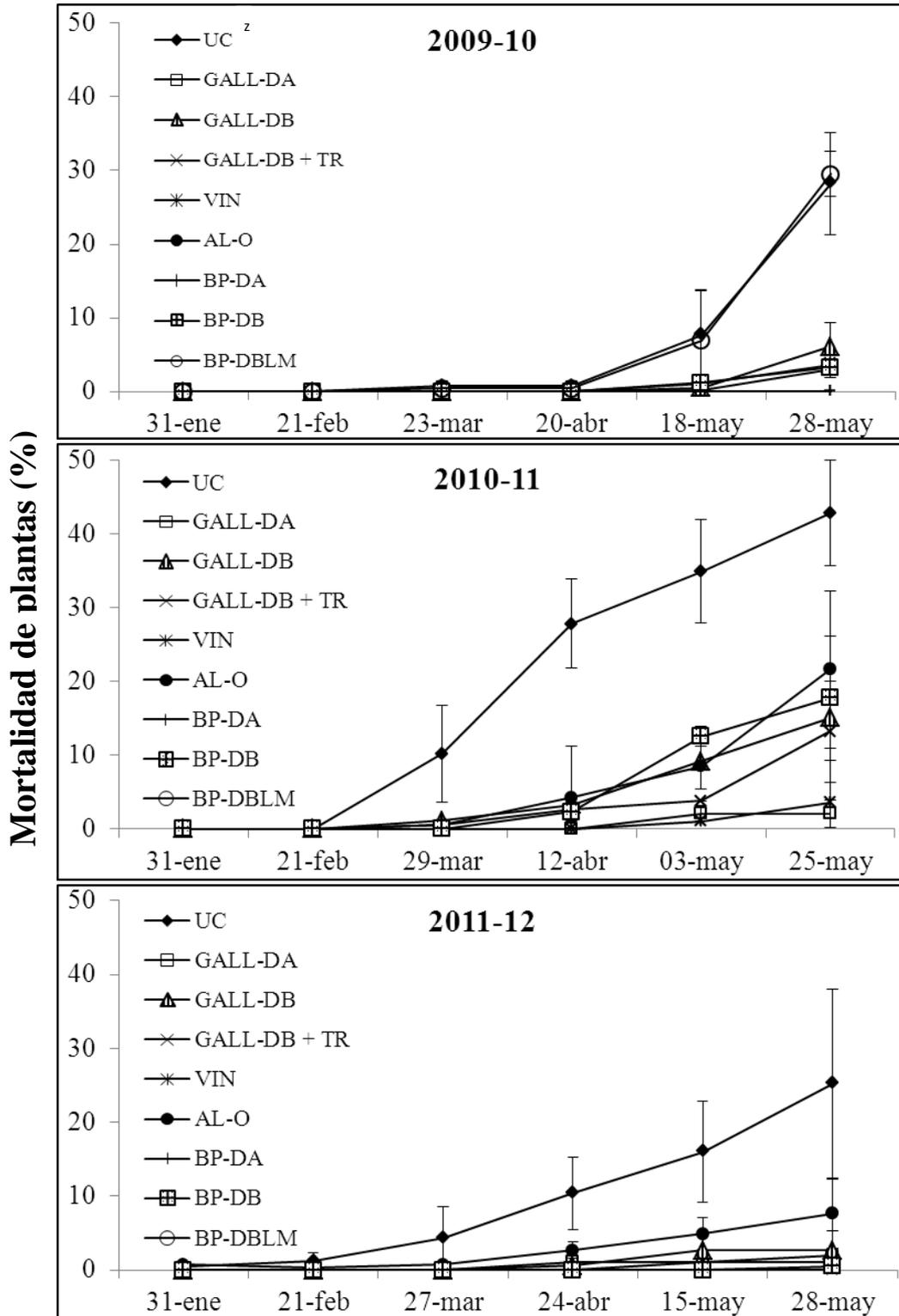
Tratamientos <sup>z</sup>	Mortalidad (%)		
	2009-10	2010-11	2011-12
Control	28,2a <sup>y</sup>	42,8a	25,2a
GALL-DA	3,0bc	2,0c	1,1b
GALL-DB	6,1b	15,1bc	2,7b
GALL-DB+TR	----	13,2bc	1,1b
VIN	3,7bc	3,6bc	0,0b
AL-O	----	21,6ab	7,6ab
BP-DA	0,0c	----	----
BP-DB	3,3b	17,8ab	0,5b
BP-DBLM	29,5a	----	----

<sup>y</sup> Valores seguidos por la misma letra en una columna no fueron significativamente diferentes según test MDS ( $P < 0,05$ ). Los datos fueron transformados mediante la transformación del arco seno. Se presentan los datos no transformados. “----” = no determinado

<sup>z</sup> Los detalles de los tratamientos se describen en la Tabla 2.1.

En 2011-12, las primeras plantas muertas se detectaron en la tercera semana de enero, con la frecuencia más alta en las parcelas control (1,4%) (Figura 2.11). Al inicio de la campaña (finales de octubre 2011), la  $T^a_{max}$  alcanzó los 20°C y la  $HR_{mn}$  fue inferior al 50%. Desde mediados del mes de marzo, la  $T^a_{max}$  aumentó (22 - 30°C) y la  $HR_{mn}$  fue del 80%, alcanzándose el 27 de marzo un porcentaje de mortalidad del 4,2% en las parcelas control. Posteriormente, desde mediados del mes de abril hasta finales de la campaña, la  $T^a_{max}$  alcanzó valores superiores a 25°C durante el 93% de esos días, con un máximo de 45°C durante la tercera semana del mes de mayo. En mayo, el porcentaje de mortalidad en las parcelas control alcanzó el 25,2%, siendo la incidencia significativamente inferior en suelos tratados, excepto en el caso de AL-O, donde el porcentaje de mortalidad fue del (Tabla 2.3). Se observó una correlación positiva y significativa entre el porcentaje de mortalidad acumulado y las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo, correspondientes a los muestreos realizados en los meses de octubre y mayo (coeficientes de correlación de Spearman: 0,6812, ( $P < 0,0001$ ) y 0,6073, ( $P < 0,0009$ ), respectivamente).

Figura 2.11.- Porcentaje de mortalidad ocasionada por *Macrophomina phaseolina* en distintos tratamientos de desinfección de suelo, en tres campañas agrícolas.



<sup>2</sup>Los detalles de los tratamientos se describen en la tabla 2.1. Las barras verticales indican el error estándar de cada media.

2.4.3.- Influencia de los tratamientos en los rendimientos del cultivo.

Los tratamientos de biosolarización a todo terreno, aumentaron los rendimientos del cultivo (kg/ha o g/planta) de forma significativa con respecto al control. En general, las producciones más altas se obtuvieron después la aplicación de los tratamientos de biosolarización con GALL-DA o GALL-DB+TR, con diferencias significativas respecto al control. Los rendimientos del cultivo tuvieron su máximo valor con tres o dos aplicaciones de GALL-DA y GALL-DB+TR, respectivamente. En los tratamientos con GALL, no se encontraron diferencias significativas al comprar la dosis alta y baja. Sin embargo, la adicción de TUSAL® al tratamiento de dosis baja de gallinaza, da lugar a un aumento significativo de la producción, respecto al mismo tratamiento sin aporte de *Trichoderma* spp., en el último año. Por el contrario, los rendimientos fueron significativamente inferiores en las parcelas tratadas con AL-O y BP-DB (Tabla 2.4).

**Tabla 2.4.-** Producción total (en kg/ha y g/plant) en suelos tratados mediante biosolarización en pre-plantación (cv. ‘Camarosa’) (Moguer, Huelva).

Tratamientos <sup>x</sup>	Rendimientos comerciales acumulados					
	2009-10		2010-11		2011-12	
	kg/ha	g/pl	kg/ha	g/pl	kg/ha	g/pl
Control	42.156c <sup>y</sup>	660,1c	36.492b	489,3c	55.915d	759,2d
GALL-DA	66.919a	954,6a	62.884a	765,8a	85.472ab	1.119,2ab
GALL-DB	62.654ab	905,7ab	59.319a	714,0ab	79.430bc	1.037,2bc
GALL-DB+TR	----	----	64.256a	761,8a	89.421a	1.152,2a
VIN	56.853b	828,7b	56.765a	655,5b	78.796bc	1.039,8bc
AL-O	----	----	61.591a	744,0ab	77.767c	1.027,4c
BP-DA	66.804a	971,1a	----	----	----	----
BP-DB	60.955ab	903,2ab	56.726a	670,8ab	76.591c	1.010,7c
BP-DBLM	45.197c	719,5c	----	----	----	----

<sup>x</sup> Los detalles de los tratamientos se describen en la Tabla 2.1.

<sup>y</sup> Valores seguidos por la misma letra en una columna no fueron significativamente diferentes según test MDS ( $P < 0,05$ ). “----”= no determinado

Los coeficientes de correlación de Spearman entre las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo, el porcentaje de plantas muertas y la producción de fruta (kg/ha y g/pl) se muestran en la Tabla 2.5. Se encontraron correlaciones negativas y significativas entre el porcentaje de plantas muertas y la producción total. Por otra parte, existen correlaciones negativas y significativas entre la producción total y las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo, en los muestreos

correspondientes a los meses de octubre y mayo. Sin embargo, en 2011-12, las correlaciones entre la producción y las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo, en el mes de mayo, no fueron significativas.

**Tabla 2.5.-** Coeficientes de correlación entre el número de unidades formadoras de colonias de *M. phaseolina* en suelo, el porcentaje acumulado de plantas muertas y los rendimientos de cultivo (cv. ‘Camarosa’) (Moguer, Huelva).

	2009-10			2010-11			2011-12		
	<i>M.phaseolina</i> <sup>x</sup> (UFC/g suelo)		% PM	<i>M.phaseolina</i> (UFC/g suelo)		% PM	<i>M.phaseolina</i> (UFC/g suelo)		% PM
	Oct.	Mayo		Oct.	Mayo		Oct.	Mayo	
gr/plant	-0,4051	-0,4808	-0,7390	-0,5344	-0,4462	-0,4203	-0,4177	-0,2913	-0,4026
<i>P</i> -value	0,0454*	0,0160*	0,0000***	0,0038*	0,0182*	0,0268*	0,0312*	0,1404 <sup>NS</sup>	0,0381*
kg/ha	-0,4737	-0,5519	-0,7413	-0,5961	-0,5179	-0,5571	-0,4630	-0,3334	-0,4432
<i>P</i> -value	0,0177*	0,0048*	0,0000***	0,0010***	0,0053*	0,0024*	0,0158*	0,0897 <sup>NS</sup>	0,0215*

NS, \*, \*\*\*: No significativo a  $P = 0,05$  significativo a  $P = 0,05$  y  $0,001$ , respectivamente

<sup>x</sup> Población de *M. phaseolina* en suelo (UFC/g de suelo seco) en los muestreos realizados después de los tratamientos (Oct.) y al final de cada campaña (Mayo)

## 2.5.- Discusión

En la mayoría de las zonas donde se cultiva fresa como sistema anual, el cultivo se repite año tras año sin ningún tipo de rotación. Este sistema de cultivo intensivo, combinado con las altas temperaturas alcanzadas durante la campaña agrícola, crea unas condiciones óptimas para el desarrollo y la multiplicación de patógenos de suelo, como es el caso de *M. phaseolina* (Zveibil *et al.*, 2012). *M. phaseolina* sobrevive en el suelo y en restos de plantas de fresa infectadas formando estructuras de resistencia denominados microesclerocios (Zveibil *et al.*, 2012). La distribución espacial de los microesclerocios en el suelo, observada en la parcela experimental, corresponde a un patrón en forma de agregados, presentando un gradiente desde niveles bajos (0 UFC/g) hasta altos (58 UFC/g). Estos resultados son similares a los obtenidos por Mihail y Alcorn (1987). Los microesclerocios de *M. phaseolina* fueron aislados por primera vez en tres zonas limitadas. Estas áreas correspondían, principalmente, con las parcelas del control no tratado, y las de los tratamientos: GALL-DB, BP-DA, BP-DB y BP-DBLM. En campañas sucesivas, estas zonas infestadas presentaron una mayor extensión, indicando la dispersión del patógeno desde los puntos iniciales (Koike, 2008). Observamos una correlación positiva y significativa entre las poblaciones *M. phaseolina* en suelo y la incidencia en plantas muertas con podredumbre carbonosa. Aunque, Wyllie (1988) observó, que densidades de población de 15 microesclerocios por gramo de suelo, pueden considerarse

aceptables o tolerables para la producción de soja, nuestros resultados muestran que densidades de población en suelo inferiores (10 UFC/g de suelo) pueden ocasionar más del 20% de muerte en plantas de fresa. Young y Alcorn (1984), determinaron que en el caso de huéspedes altamente susceptibles, densidades de microesclerocios inferiores a un microesclerocio por gramo de suelo, pueden llegar a causar más del 90% de muerte de plantas. En nuestro estudio, esta densidad de microesclerocios ocasionó el 10% de mortalidad de plantas de fresa. Los tratamientos repetidos de biosolarización a toda superficie, consiguieron reducir la población de *M. phaseolina* en suelo. Además, los tratamientos fueron efectivos contra este patógeno hasta el final de cada campaña agrícola (Mayo). Por lo tanto, podríamos considerar la técnica de biosolarización tan eficaz como algunos tratamientos químicos (dazomet o cloropicrina, entre otros) para el control de *M. phaseolina* en suelo (Miranda *et al.*, 2012; Zveibil *et al.*, 2012). La descomposición de las enmiendas orgánicas producen sustancias volátiles que pueden resultar tóxicas para los patógenos de suelo (Bonamoni *et al.*, 2007). La solarización combinada con la biofumigación proporciona un mejor control de *M. phaseolina*, que la técnica de solarización sola. En campos de fresa, la solarización no consiguió reducir la viabilidad de *M. phaseolina*, en profundidades de suelo entre 10–20cm (Yildiz *et al.*, 2010). Sin embargo, la aplicación repetida de tratamientos de biosolarización con gallinaza y vinaza de remolacha redujo la población de *M. phaseolina*, a 20cm de profundidad, y la incidencia de la podredumbre carbonosa. Algunos autores han demostrado la eficacia de los tratamientos de biofumigación con estiércol de pollo fresco o residuos de especies de *Brassicaceae*, como medida de control de hongos patógenos de suelo, en el cultivo de la fresa (Lodha *et al.*, 1997; Mazzola, 2011 b; Pratt, 2006). Bello y colaboradores (2004) aplicaron la biofumigación con vinaza de remolacha, demostrando un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de algunos hongos patógenos de suelo, como *Fusarium spp* y *Phytophthora parasitica*, entre otros.

La diferencia entre los tratamientos con BP-DB y BP-DBLM, durante 2009-10, pudo deberse al efecto de la temperatura, ya que BP-DBLM se aplicó justo después del alomado en septiembre (cuando las temperaturas son más bajas) y bajo plástico negro, en lugar del transparente utilizado para la solarización en los meses de verano (Julio – Agosto), cuando se alcanzan las temperaturas más altas (Chen y Katan, 1980). En 2009-10, en parcelas tratadas con BP-DBLM se observó una alta mortalidad de plantas y una baja producción de fruto, por lo que se reemplazó (sobre las mismas parcelas) por el tratamiento de biosolarización con alperujo de olivo, durante las siguientes campañas. En estas parcelas se encontraron unas densidades altas de población de *M. phaseolina* en suelo, lo que puede deberse a un efecto residual del tratamiento de BP-DBLM aplicado en 2009-2010. Sin embargo, la aplicación del

tratamiento AL-O disminuyó la población de *M. phaseolina* en suelo, desde el inicio hasta la finalización de la campaña agrícola 2010-11.

*M. phaseolina* está considerado como un hongo patógeno de climas cálidos. Se considera que el desarrollo de la podredumbre carbonosa puede estar favorecido por la combinación de estrés térmico, déficit de agua y suelos de textura ligera (Khan, 2007; Papavizas y Klag, 1975), coincidiendo con las condiciones medioambientales de la provincia de Huelva. Aunque, estudios previos indican que los síntomas de la podredumbre carbonosa aparecen en campos donde se cultiva la fresa al final de la campaña agrícola (Miranda *et al.*, 2012), en este trabajo hemos detectado plantas con síntomas, en el mes de enero, cuando la temperatura alcanzó los 20°C y la humedad fue inferior al 50%. En 2010-11, desde abril hasta mayo se registraron las temperaturas más altas, coincidiendo la mayor incidencia de podredumbre carbonosa (Fang *et al.*, 2011).

Los tratamientos de biosolarización con gallinaza y vinaza de remolacha fueron los más eficaces en el control de la población de *M. phaseolina* en suelo y de la incidencia de podredumbre carbonosa. Además, la biosolarización con gallinaza produjo los rendimientos de producción más elevados. A pesar de que no se detectaron diferencias significativas entre la biosolarización con gallinaza a dosis alta y baja, la producción fue ligeramente superior a la dosis más alta, resultados muy similares a los obtenidos por Gamliel y colaboradores (1993) y posteriormente por Klein y colaboradores (2007). Cuando al tratamiento con gallinaza a dosis baja se le añadió TUSAL<sup>®</sup>, se observó un incremento de la producción acumulada a final de campaña. Cuando se aplica *Trichoderma* spp, en combinación con biofumigantes, se han detectado efectos positivos como: el control de los patógenos que afectan a las raíces o a las hojas, inducción de resistencia, control biológico de enfermedades por antagonismo directo o antibiosis frente a hongos patógenos, entre otros (Harman, 2006; Washington *et al.*, 1999). Se encontraron resultados similares cuando las aplicaciones de *Trichoderma* spp. se combinaron con la técnica de solarización, observándose incrementos en los rendimientos del cultivo y una mejora de las condiciones de la rizosfera (Porras, 2005; Porras *et al.*, 2007 b), debido a la actividad antagonista de *Trichoderma* spp. frente a algunos patógenos de suelo (Zveibil y Freeman, 2005). Porras y colaboradores (2007 a), demostraron que algunas especies de *Trichoderma* resistían altas temperaturas, aunque otros estudios señalan que los niveles de *Trichoderma* spp. en suelo pueden verse reducidos por la solarización (Ben-Yephet *et al.*, 1987).

Aunque, Zveibil y colaboradores (2012) indican que el incremento de la podredumbre de corona o la necrosis de raíces en plantas de fresa, ocasionada por *M. phaseolina*, puede ser debido a la retirada del BM como principal fumigante para este cultivo, en nuestro campo de

ensayo nunca se habían aplicado BM u otros compuesto químicos para la desinfección de suelo. Esta situación, junto al hecho de que no se ha detectado *M. phaseolina* en plantas procedentes de viveros, hace que nos planteemos la hipótesis de que *M. phaseolina* podría haberse detectado en los cultivos de fresa de la provincia de Huelva, debido a dos razones principales:

- (i) Compartir un hábitat común con otras especies de plantas previamente infectadas con el patógeno.
- (ii) Un aumento progresivo de la temperatura durante la última década, consecuencia del cambio climático, que podría favorecer el desarrollo o aparición de nuevos patógenos y enfermedades emergentes. Además, las condiciones climáticas de Huelva, podrían incrementar la incidencia de la enfermedad con el paso del tiempo.

El objetivo de este estudio fue el desarrollo de técnicas de biofumigación para reemplazar a los tratamientos químicos en el control de patógenos de suelo en el cultivo de la fresa. A pesar de que *M. phaseolina* permanece en el suelo entre campañas agrícolas, nuestro estudio reveló que algunos de los tratamientos de biosolarización aplicados controlaron la podredumbre carbonosa. Podemos concluir que la aplicación repetida de tratamientos de biosolarización (principalmente en los que se usó gallinaza), fueron eficaces en la reducción y control de las poblaciones de *M. phaseolina* en el suelo. Este efecto tiene una relación directa con el aumento de los rendimientos en el cultivo de la fresa. Por otra parte, las producciones obtenidas con las enmiendas de gallinaza, fueron similares o incluso superiores a las producciones previamente descritas para el tratamiento químico estándar con 1,3 D:cloropicrina (alrededor de 54.000 – 60.000kg/ha) (López-Aranda, 2008). Dosis reducidas de gallinaza, en combinación o no con aplicaciones de *Trichoderma* spp., pueden ser utilizadas para evitar posibles riesgos de contaminación por nitrato en el suelo. En la zona mediterránea, el cultivo de la fresa, podría tener como principal alternativa a los fumigantes químicos, la técnica de biosolarización como herramienta fundamental en la desinfección de suelo. Esta estrategia puede aprovechar la actividad industrial local para la obtención de los biofumigantes, que están disponibles y que resultan económicamente viables para su uso por los productores de fresa. Según López-Aranda y colaboradores (2012), a pesar de que la mayoría de los productores conocen este tipo de técnicas de aplicación de enmiendas orgánicas, es necesario trabajar en el proceso de transferencia de la tecnología, ya que en gran medida su éxito, será directamente proporcional al correcto conocimiento y aplicación de las dosis, el momento y el método de aplicación.

## 2.6.- Bibliografía

- Ajwa, H.A., Klose, S., Nelson, S.D., Minuto, A., Gullino, M.L., Lamberti, F., y López-Aranda J.M.** 2003. Alternatives to methyl bromide in strawberry production in the United States of America and the Mediterranean region. *Phytopathol. Mediterr.* 42:220-244.
- Angelini, R., y Faedi, W.** 2010. Malattie e fisiopatie. In: ART (Ed) *La Fragola*, Bologna, Italy, pp 228-246.
- Anónimo.** 2011. [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org)
- Avilés, M., Castillo, S., Bascon, J., Zea-Bonilla, T., Martín-Sánchez, P.M., y Pérez-Jiménez, R.M.** 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. *Plant Pathol.* 57:382.
- Baino, O.M., Salazar, S.M., Ramallo, A.C., y Kirschbaum, D.S.** 2011. First report of *Macrophomina phaseolina* causing strawberry crown and root rot in north-western Argentina. *Plant Disease* 95:1477.
- Bello, A., López-Pérez, J.A., García-Álvarez, A., Fresno, J., Escuer, M., Arcos, S.C., Lacasa, A., Sanz, R., Gómez, P., Díez-Rojo, M.A., De la Goitia, C., Horra, J.L., y Martínez, C.** 2004. Biofumigation, fallow, and nematode management in vineyard replant. *Nematropica* 34:36-39.
- Benlioğlu, S., Yıldız, A., y Döken, T.** 2004. Studies to determine the causal agents of soil-borne fungal diseases of strawberries in Aydin and to control them by soil disinfestation. *J. Phytopathology* 152:509-513.
- Ben-Yephet, Y., Stapleton, J.J., Wakeman, R.J., y DeVay, J.E.** 1987. Comparative effects of soil solarization with single and double layers of polyethylene film on survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Phytoparasitica* 15:181-185.
- Bianco, V., Nicholls, J., Mattner, S., Allen, D., y Porter, I.** 2000. Biofumigation in Australian horticulture: an integrated approach to MB replacement. 2000 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. Conference Proceedings. Available on line: [www.mbao.org/altmet00/18bianco.pdf](http://www.mbao.org/altmet00/18bianco.pdf)
- Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C., y Scala, F.** 2007. Suppression of soil-borne fungal diseases with organic amendments. *J. Plant Pathol.* 89:311-324.
- Chen, Y., y Katan, J.** 1980. Effect of solar heating of soils by transparent polyethylene mulching on their chemical properties. *Soil Sci.* 130:271-276.
- Colla, P., Gilardi, G., y Gullino, M.L.** 2012. A review and critical analysis of the European situation of soil-borne disease management in the vegetable sector. *Phytoparasitica* 40:515-523.
- De los Santos, B., Barrau, C., Blanco, C., Arroyo, F., Porras, M., Medina, J. J., y Romero, F.** 2003. Relationship between *Trichoderma* soil population and strawberry fruit production in soils previously fumigated. *HortScience* 7:1400-1402.

- Dhingra, O.D., y Sinclair, J.B.** 1975. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil: Effects of soil moisture, carbon:nitrogen ratios, carbon sources, and nitrogen concentrations. *Phytopathology* 65:236-240.
- Duniway, J.M.** 2002. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. *Phytopathology* 92:1337-1343.
- Elad, Y., Zvieli, Y., y Chet, I.** 1986. Biological control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. by *Trichoderma harzianum*. *Crop Protection* 5:288-292.
- Fang, X.L., Phillips, D., Li, H., Sivasithamparam, K., y Barbetti, M.J.** 2011. Comparisons of virulence of pathogens associated with crown and root diseases of strawberry in Western Australia with special reference to the effect of temperature. *Sci. Hort.* 131:39-48.
- Gamliel, A., y Stapleton, J.J.** 1993. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. *Phytopathology* 83:899-905.
- Golzar, H., Phillips, D., y Mack, S.** 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in western Australia. *Australasian Plant Dis. Notes* 2:145-147.
- Harman, G.E.** 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Katan, J.** 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soil-borne pests. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19: 211-236.
- Khan, S.N.** 2007. *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower *Mycopathology* 5:111-118.
- Klein, E., Katan, J., Austerweil, M., y Gamliel, A.** 2007. Controlled laboratory system to study soil solarization and organic amendment effects on plant pathogens. *Phytopathology* 97:1476-1483.
- Koike, S.T.** 2008. Crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in California. *Plant Disease* 92:1253.
- Koike, S. T.** 2012. Soil-borne diseases of strawberry: A review. *Monterey Crop Notes* 5: 7-10.
- Lodha, S., Sharma, S.K., y Aggarwal, R.K.** 1997. Solarization and natural heating of irrigated soil amended with cruciferous residues for improved control of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Pathol.* 46:186-190.
- López-Aranda, J.M.** 2008. The cultivation of the strawberry in Huelva. In: de Andalucía J (ed) *The strawberry crop at Huelva. Ideas, Exclusivas y Publicidad S.L., Sevilla (Spain), pp 101-174.*
- López-Aranda, J.M.** 2012. Methyl bromide alternatives (chemical & non-chemical) for strawberry cultivation in conventional areas of production. *Book of Abstracts VII International Strawberry Symposium ISHS, Acta Horticulturae pp 13.*

- López-Aranda, J.M., Miranda, L., Medina, J.J., Soria, C., De los Santos, B., Romero, F., Pérez-Jiménez, R.M., Talavera, M., Fennimore, S.A. y Santos B.M.** 2009. Methyl Bromide alternatives for high tunnel strawberry production in Southern Spain. *HortTechnology* 19:187-192.
- López-Aranda, J.M., Miranda, L., Domínguez, P., Soria, C., Pérez-Jiménez, R.M., Zea, T., Talavera, M., Velasco, L., Romero, F., De los Santos, B., y Medina, J.J.** 2012. Soil biosolarization for strawberry cultivation. *Acta Horticulturae* 926:407-413.
- Mazzola, M.** 2011a. Potential of biofumigation for soilborne pest control in strawberry. Proceedings Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, 47:1-2.
- Mazzola, M.** 2011b. Active manipulation of resident biology to suppress *Macrophomina phaseolina* in strawberry. *Phytopathology* 101:S117.
- Medina, J.J.** 2002. Soil solarization and biofumigation in strawberries in Spain. Proceedings of International Conferences on Alternatives to Methyl Bromide, pp 108-110.
- Medina, J.J., Miranda, L., Soria, C., Palencia, P., y López-Aranda, J.M.** 2009. Non-chemical alternatives to methyl bromide for strawberry: biosolarization as a case-study in Huelva. *Acta Hort.* 842:961-964.
- Medina, J.J., Miranda, L., Domínguez, P., Soria, C., Pérez-Jiménez, R.M., Zea, T., Talavera, M., Velasco, L., Romero, F., De los Santos, B., y López-Aranda, J.M.** 2012a. Chemical and non-chemical alternatives to Methyl Bromide on strawberry in Huelva (Spain): 2008-2010 results. *Acta Hort.* 926:637-643.
- Medina, J.J., Miranda, L., Domínguez, P., Soria, C., Pérez-Jiménez, R.M., Zea, T., Talavera, M., Velasco, L., Romero, F., De los Santos, B., y López-Aranda, J.M.** 2012b. Comparison of different chemical and non-chemical alternatives to Methyl Bromide for Strawberry in Huelva (Spain). *Journal of Berry Research* 2:113-121.
- Mertely, J., Seijo, T., y Peres, N.** 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. *Plant Disease* 84:434.
- Mian, I.H., Godoy, G., Rodríguez-Kabana, R., y Morgah-Jones, G.** 1982 Chitin amendments from control of *Meloidogyne arenaria* in infested soils. *Nematologica* 12: 71-84.
- Mihail, J.D.** 1989. *Macrophomina phaseolina*: Spatio-temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. *Phytopathology* 79:848-855.
- Mihail, J.D., y Alcorn, S.M.** 1987. *Macrophomina phaseolina*: Spatial patterns in a cultivated soil and sampling strategies. *Phytopathology* 77:1126-1131.
- Miranda, L., Domínguez, P., Soria, C., Talavera, M., Chamorro, M., Romero, F., De los Santos, B., Medina-Mínguez, J.J., y López-Aranda, J.M.** 2012. Nuevos resultados en la evaluación de desinfectantes de suelos para el cultivo de la fresa. *Agrícola Vergel*, Enero-Febrero: 1-6.

## Capítulo 2

- Ndiaye, M., Termorshuizen, A.J., y van Bruggen, A.H.C.** 2007. Combined effects of solarization and organic amendment on charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* in the Sahel. *Phytoparasitica* 35:392-400.
- Papavizas, G., y Klag, N.G.** 1975. Isolation and quantitative determination of *Macrophomina phaseolina* from soil. *Phytopathology* 65:182-187.
- Pinkerton J.N., Ivors K.L., Reeser P.W., Bristow P.R., y Windom G.E.** 2002. The use of soil solarization management on soilborne plant pathogens in strawberry and red raspberry production. *Plant Dis.* 86:645-651.
- Porras, M.** 2005. Respuesta de patógenos de fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.) a la utilización de *Trichoderma* spp. y solarización. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Porras, M., Barrau, C., Arroyo, F.T., De los Santos, B., Blanco, C., y Romero, F.** 2007a. Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma* spp. and soil solarization. *Plant Dis.* 91:142-146.
- Porras, M., Barrau, C., y Romero, F.** 2007b. Effects of soil solarization and *Trichoderma* on strawberry production. *Crop Prot.* 26:782-787.
- Pratt, R.G.** 2006. A direct observation technique for evaluating sclerotium germination by *Macrophomina phaseolina* and effects of biocontrol materials on survival of sclerotia in soil. *Mycopathologia* 162:121-131.
- Ramezani, H.** 2008. Biological control of root-rot of Eggplant caused by *Macrophomina phaseolina*. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 4:218-220.
- Ros, M., García, C., Hernández, M.T., Lacasa, A., Fernández, P., y Pascual, J.A.** 2008. Effects of biosolarization as methyl bromide alternative for *Meloidogyne incognita* control on quality of soil under pepper. *Biol. Fertil. Soils* 45:37-44.
- Roskopf, E.N., Kokalis-Burelle, N., Butler, D.M., Muramoto, J., Shenan, C., Noling, J., He, Z., Booker, B., y Campbell, T.** 2011. Field evaluation of non-fumigant pest control for Florida strawberry production. *Proceedings 2011 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions.* 45:1-3.
- Sandoval, I., y López, M.O.** 2000. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* A34 hacia *Macrophomina phaseolina* y otros patógenos fúngicos del frijol. *Fitosanidad* 4:69-72.
- Santos, B.M., Gilreath, J.P., López-Aranda, J.M., Miranda, L., Soria, C., Medina, J.J., y Whidden, A.J.** 2006. Performance of Methyl Bromide Alternatives for Strawberry Production in Florida and Spain. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 119.
- Sharifi, K., y Mahdavi, M.** 2011. First report of strawberry crown and root rot caused by *Macrophomina phaseolina* in Iran. *Iran. J. Plant Pathol.* 47:161.

## Capítulo 2

- Su, G., Suh, S.O., Schneider, R.W., y Russin, J.S.** 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 91:120-126.
- Tjamos, E.C., Antoniou, P.P., Skourtaniotis, A., Kikrilis, E., y Tjamos, S.E.** 2006. Impermeable plastics and methyl bromide alternatives in controlling soilborne fungal pathogens of strawberries in Greece. *Proceedings 12th Cong. Med. Phytopath. Union*, pp 255-257.
- Tuite, J.** 1979. *Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria*. Burgess Publishing Company. 238pp.
- Uclés, D., Cabrera, A., Gómez, J.A., y Torres, M.** 2011. Análisis de la campaña hortofrutícola de Huelva. Campaña 2010/2011. Edita: Fundación Cajamar. Almería. 66 pp.
- Washington, W.S., Engleitner, S., Boontjes, G., y Shanmuganathan, N.** 1999. Effect of fungicides, seaweed extracts, tea tree oil, and fungal agents on fruit rot and yield in strawberry. *Aust. J. Exp. Agric.* 39:487-494.
- Wyllie, T.D.** 1988. Charcoal rot of soybean-current status. In: Wyllie TD, Scott DH (Eds) *Soybean diseases of the north central region*, APS Press, St. Paul, MN, pp 106-113.
- Yildiz, A., Benlioğlu, S., Boz, Ö., y Benlioğlu, K.** 2010. Use of different plastics for soil solarization in strawberry growth and time-temperature relationships for the control of *Macrophomina phaseolina* and weeds. *Phytoparasitica* 38:463-473.
- Young, D.J., y Alcorn, S.M.** 1984. Latent infection of *Euphorbia lathyris* and weeds by *Macrophomina phaseolina* and propagule populations in Arizona field soil. *Plant Dis.* 68:587-589.
- Zveibil, A., y Freeman, S.** 2005. First report of crown and root rot in strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Israel. *Plant Dis.* 89:1014.
- Zveibil, A., y Freeman, S.** 2009. Methods for detection of soilborne pathogens affecting strawberry in Israel. *Acta Hort.* 842:191-194.
- Zveibil, A., Mor, N., Gnyem, N., y Freeman, S.** 2012. Survival, host-pathogen interaction, and management of *Macrophomina phaseolina* on strawberry in Israel. *Plant Dis.* 96:265-272.



***EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS QUÍMICOS Y DE BIOSOLARIZACION  
PARA EL CONTROL DE MACROPHOMINA PHASEOLINA  
EN EL CULTIVO DE LA FRESA***

***3.1. – Resumen.***

La retirada gradual del bromuro de metilo (BM) en el cultivo de la fresa, ha provocado problemas en el control de algunos hongos de suelo como es el caso de *Macrophomina phaseolina*, agente causal de la podredumbre carbonosa. En este trabajo, se comparó la eficacia de varios tratamientos de tipo químico y un tratamiento de biosolarización, en el control de *M. phaseolina*. Los ensayos se llevaron a cabo, durante tres campañas consecutivas (2009, 2010 y 2011), en dos parcelas experimentales situadas en la costa suroeste de España (Huelva), con diferente historial de fumigación del suelo. En la finca “Fres-Gómez S.L.” (Palos de la Frontera) el suelo fue fumigado con BM hasta 2005 y con 1,3-dicloropropeno:cloropicrina hasta 2008, mientras que, en “Occifresa S.C.A.” (Moguer) las últimas fumigaciones de suelo con BM se realizaron en la campaña 2000-01. En los ensayos se determinaron los efectos de los tratamientos sobre: la mortalidad de plantas, la población de *M. phaseolina* en suelo y el rendimiento en la producción de fruta acumulada hasta el final de cada campaña. En la campaña 2009-10, se aplicaron cinco tratamientos, y siete tratamientos durante las campañas 2010-11 y 2011-12. Los tratamientos de fumigación fueron: biosolarización con gallinaza, dazomet:1,3-dicloropropeno, 1,3-dicloropropeno:cloropicrina, cloropicrina, dimetil disulfuro:cloropicrina por inyección en rejao a través de riego por goteo, y dazomet. Durante las tres campañas se usaron plantas del cultivar ‘Camarosa’ y el manejo del cultivo se realizó siguiendo la directiva de producción integrada en fresa y bajo macrotúnel. La mayoría de los tratamientos consiguieron reducir significativamente la población de *M. phaseolina* en suelo (20–100%), con la excepción del tratamiento con dimetil disulfuro:cloropicrina aplicado en riego por goteo. En ambas fincas, todos los tratamientos redujeron la mortalidad de plantas causadas por podredumbre carbonosa (35–100%), observándose una mayor producción de fruto acumulada en comparación con el testigo (5–56%). Los análisis de costos para la aplicación de cada uno de los fumigantes, demuestran que son viables y rentables para su utilización en el cultivo de la fresa, en ausencia de BM.

**Abstract**

The phase-out of methyl bromide (MB) in strawberry has increased the difficulty of controlling *Macrophomina phaseolina*, a soil-borne pathogen and causal agent of charcoal rot disease. In this study, several chemicals and one biosolarization treatment were compared for the control *M. phaseolina* in three successive seasons between 2009 and 2011. Trials were conducted in two fields with different history of chemical soil treatments in south-western coast of Spain (Huelva). At the first field at Fres-Gómez S.L. farm in Palos de la Frontera, the soil was fumigated with 1,3-dichloropropene:chloropicrin from 2005 to 2008, whereas the soil of the second field at Occifresa S.C.A. farm in Moguer, was fumigated with MB until 2000-2001. We determined treatments effect on plant mortality, *M. phaseolina* population in soil over time, and yield. Five and seven treatments plus an untreated control were applied the 2009-10 and 2010-12 seasons, respectively. The treatments were: biosolarization with chicken manure, dazomet:1,3-dichloropropene, 1,3-dichloropropene:chloropicrin, chloropicrin, dimethyl disulfide:chloropicrin by shank, dimethyl disulfide:chloropicrin through drip irrigation, and dazomet. Strawberry cv. 'Camarosa' was grown following standard production practices under large plastic tunnels. The majority of treatments reduced *M. phaseolina* populations in soil (20–100%), except dimethyl disulfide:chloropicrin applied through drip irrigation that was not significantly different from the untreated control. In both experimental fields all treatments reduced plant mortality caused by charcoal rot (35–100%) and provided greater yields than the untreated control (5–56%). Additionally, cost analyses showed positive economic impacts of the treatments on strawberry production in the absence of MB.

**3.2. – Introducción.**

El cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) está muy extendido en los cinco continentes, siendo China y Estados Unidos los mayores productores del mundo. A nivel mundial, el cultivo de fresa se ha visto incrementado significativamente en los últimos años, llegando a 241.109 hectáreas, en 2012 (Anónimo, 2014 a). En ese año, la superficie cultivada en la provincia de Huelva (costa suroeste de España) alcanzó las 7.600 has con una producción de 289.900 toneladas (Anónimo, 2012). Para esta provincia, el cultivo de la fresa ha supuesto una gran revolución desde que, a mediados de los años sesenta del pasado siglo, se iniciara en la zona. Debido no solo a la importancia económica que tiene la fresa en España, sino también al impacto social del cultivo, se están realizando grandes esfuerzos en la investigación para la mejora de la producción y de la calidad del fruto de fresa, para hacer frente a las necesidades de este sector (Martínez-Ferri *et al.*, en prensa).

3.2.1. - Situación actual de los fumigantes químicos.

En los países de la Unión Europea (UE), y particularmente, en los de la cuenca mediterránea, como Francia, Italia y España, la fumigación del suelo representa un factor fundamental en los cultivos hortícolas, como la fresa y frambuesa, entre otros. La aplicación del Protocolo de Montreal, y del Reglamento nº 2037/2000 de 29 de junio de la Comunidad Europea, que regula las sustancias que agotan y deterioran la capa de ozono, resultó en la eliminación del bromuro de metilo (BM) de forma irreversible en los países desarrollados, a partir de 2007. En el caso del cultivo de la fresa en Huelva, esta prohibición, tuvo un impacto negativo en el control de patógenos de suelo y otras plagas (López-Aranda, 2013). Debido a las políticas agroambientales seguidas por la UE y a la percepción negativa del consumidor, el uso de agroquímicos en la agricultura intensiva se ha visto reducido en más de un 30% en los últimos 8 años. Los reglamentos de la UE, son muy restrictivos en el uso de pesticidas y fumigantes químicos, y tienen como objetivo principal, estimular a las industrias en la búsqueda de alternativas de tipo no químico, para el manejo y/o control de patógenos y plagas (Colla *et al.*, 2012).

Actualmente, los únicos fumigantes de suelos autorizados en la UE son: las sales de metam potasio y metam sodio, y dazomet. En Europa, estos fumigantes podrán aplicarse tan sólo una vez cada tres campañas, con una dosis máxima de 153kg/ha y su aplicación deberá ser bajo cubierta plástica. El 1,3-dicloropropeno (1,3 D) y cloropicrina (PIC), se han considerado las principales alternativas químicas al BM, sin embargo, estos fumigantes están excluidos del anexo I (Directiva Europea CE 91/414), que regula el uso de fumigantes y su aplicación, desde el año 2010 y 2013, respectivamente, y por tanto, muy probablemente no estarán a disposición para su aplicación en la industria fresera. Sin embargo, los estados miembros de la UE, pueden emitir ciertas autorizaciones excepcionales (emergencia nacional), para el uso y/o aplicación de PIC y 1,3 D de forma temporal (120 días/año), en determinados sectores agrícolas (De Cal *et al.*, 2004). 1,3 D tuvo autorización excepcional en Bélgica, Chipre, Francia, Grecia, Italia, Portugal y España desde 2009 hasta 2013, mientras que, las autorizaciones en el caso de aplicaciones de PIC, han sido aprobada en España, hasta el 29 de Octubre 2014 y están en marcha en Italia y Reino Unido (Anónimo, 2014 b). Entre los productos químicos, de nueva inclusión en la UE, se encuentra el dimetil disulfuro (DMDS), que en la actualidad está registrado como fumigante de suelo en EEUU. Durante la campaña de fresa de 2012-13, los fumigantes aplicados en la provincia de Huelva, fueron: la mezcla de 1,3 D:PIC (73% de la superficie), PIC (10%), dazomet solo o mezclado con 1,3 D (12%), sales de metam sodio y potasio (López-Aranda, 2013). La reevaluación de los plaguicidas marcada por la Directiva Europea CE 91/414 sobre productos fitosanitarios, y posteriormente, por el Reglamento Europeo nº 1107/2009 y 540/2011 (UE), relativo a la comercialización de productos

fitosanitarios en el mercado, reduce drásticamente el número de fumigantes disponibles en el territorio europeo.

En ensayos llevados a cabo en el suroeste de España, los tratamientos de suelo preplantación con cloropicrina, 1,3 D:cloropicrina, dimetil disulfuro:cloropicrina, ioduro de metilo + cloropicrina o Dazomet (incorporado al suelo con Mix-Tiller<sup>®</sup>), no solo redujeron la población de *M. phaseolina* en el suelo, sino que mantuvieron estos bajos niveles del patógeno hasta finales de campaña (final de Mayo). Así, mientras que la mortalidad de plantas del cultivar ‘Camarosa’ fue del 20% en suelos no tratados, en los suelos fumigados no alcanzó al 10%, y en los suelos fumigados con dazomet no se detectaron plantas muertas (Miranda *et al.*, 2012). Zveibil y colaboradores (2012), estudiaron el efecto de varios fumigantes químicos en el control de *M. phaseolina*. Metam sodio y BM fueron los más efectivos, en la erradicación de varios tipos del inóculo de *M. phaseolina* (microesclerocios, coronas y estolones naturalmente infectados). Sin embargo, las fumigaciones con cloropicrina o con la combinación 1,3 D:cloropicrina no fueron tan eficaces como los tratamientos con metam sodio o BM, a las distintas profundidades analizadas en este estudio.

### 3.2.2.- *Macrophomina phaseolina*, agente causal de podredumbre carbonosa en el cultivo de la fresa.

La producción en el cultivo de la fresa ha sido dependiente del BM, como principal fumigante de suelo, en el control de enfermedades, malas hierbas y nematodos. Después de la prohibición de su uso, el cultivo de la fresa se ha visto amenazado a nivel mundial por varias enfermedades emergentes, como es el caso de la podredumbre carbonosa, causada por *M. phaseolina*. Este hongo de suelo es un patógeno con una amplia variedad de huéspedes (más de 500 especies de plantas cultivadas y silvestres), además posee una gran longevidad en suelo y una alta capacidad saprófita, que lo convierten en un patógeno altamente competitivo, frente a otros microorganismos (Su *et al.*, 2001). En fresa ocasiona el marchitamiento y/o muerte de las hojas más viejas, con el eventual colapso y posterior muerte de la planta (Koike, 2008). En los tejidos internos de plantas sintomáticas se puede apreciar una coloración marrón oscuro a anaranjado en la zona vascular de la corona y en los tejidos corticales (Mertely *et al.*, 2005), además, puede provocar necrosis en las raíces (Avilés *et al.*, 2008). La podredumbre carbonosa, puede verse favorecida por condiciones de alta temperatura y baja humedad en suelo, así como por la combinación de estrés climático, déficit de agua en suelo, textura de suelo ligera (arenosa), y/o el estrés asociado a la reproducción del hospedador, condiciones que provocan un rápido desarrollo de esta enfermedad en la planta (Mihail, 1989). Por tanto, las condiciones climáticas y edáficas de la provincia de Huelva, son óptimas para el desarrollo y

dispersión de *M. phaseolina*, en meses donde las temperaturas a menudo alcanzan los 30°C , provocando pérdidas en la producción debido, principalmente, a la muerte de plantas (Fang *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2012).

*M. phaseolina* sobrevive en el suelo y en tejido de plantas infectadas, como microesclerocios, estructuras de resistencias que permiten al hongo vivir durante largos periodos de tiempo en el suelo. Cuando las condiciones climáticas son óptimas para su dispersión, puede ser capaz de infectar nuevas plantas de fresa en sucesivas campañas (Dhingra y Sinclair, 1975; Zveibil *et al.*, 2012). Una baja densidad de inóculo puede ser suficiente para causar podredumbre carbonosa, especialmente cuando el huésped es altamente susceptible (Young y Alcorn, 1984).

Los microesclerocios se producen en el tejido del huésped y, tras la descomposición de los tejidos infectados, se liberan en el suelo. Por otra parte, el monocultivo sin rotación, usado en el cultivo de la fresa en Huelva, puede favorecer un aumento en la población de microesclerocios de *M. phaseolina* (Mihail, 1989; Zveibil *et al.*, 2012). Los microesclerocios de *M. phaseolina* se distribuyen en el suelo en forma de parches. En los campos de cultivo, donde la enfermedad se ha desarrollado durante más de una campaña agrícola, se produce la dispersión del patógeno en el suelo desde el foco inicial, debido a los movimientos de tierra realizados durante las tareas de laboreo y preparación del terreno (Koike, 2008).

La podredumbre carbonosa, se ha detectado en las distintas zonas donde se cultiva la fresa, como: Argentina, (Baino *et al.*, 2011), Australia (Golzar *et al.*, 2007), California (Koike, 2008), Florida (Mertely *et al.*, 2005), Grecia (Tjamos *et al.*, 2006), Italia (Angelini y Faedi, 2010), Irán (Sharifi y Mahdavi, 2011), Israel (Zveibil y Freeman, 2005), España (Avilés *et al.*, 2008), y Turquía (Benlioğlu *et al.*, 2004). El incremento en el número de casos de detección de *M. phaseolina*, en el cultivo de la fresa, puede ser debido a un aumento de la dispersión del patógeno, a la prohibición de uso del BM o a un mayor conocimiento de la enfermedad.

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de distintos tratamientos de desinfección de suelo en la población de *M. phaseolina*, en la incidencia de podredumbre carbonosa, así como su influencia en la producción de fruto de fresa, en las condiciones de cultivo de la provincia de Huelva.

### **3.3. - Materiales y métodos.**

#### **3.3.1. - Historial y características de los campos de ensayo.**

Los ensayos se han llevado a cabo, durante las campañas agrícolas 2009-10, 2010-11 y 2011-12, en las fincas comerciales: Fres-Gómez S.L. (Palos de la Frontera) y Occifresa S.C.A. (Moguer), ambas en la zona costera de Huelva (Figura 3.1). En la primera de ellas se

realizaron desinfecciones con BM desde 2000-01 hasta 2005-06, continuándose con aplicaciones de 1,3 D:PIC hasta 2008-09. En Occifresa S.C.A., la última fumigación del suelo con BM fue en la campaña 2000-01, desde entonces nuestro equipo de investigación, ha llevado a cabo ensayos con distintos fumigantes en la búsqueda de alternativas al BM para el cultivo de la fresa (2002 hasta 2008).

Los suelos, en ambas fincas, son de textura arenosa y de composición similar (Tabla 3.1). Las características del agua de riego se muestran en la Tabla 3.2.

**Figura 3.1.** – Localización geográfica de las fincas Occifresa S.L. (Moguer), y Fres-Gómez S.C:A (Palos de la Frontera).



**Tabla 3.1.** – Composición del suelo en las fincas Occifresa S.L. (Moguer), y Fres-Gómez S.C:A. (Palos de la Frontera).

	<b>Occifresa S.C.A.</b>	<b>Fres-Gómez S.L.</b>
<b>Textura (%)</b>	Arenosa	Arenosa
<b>pH</b>	6,09	6,05
<b>Materia orgánica (%)</b>	0,78	0,47
<b>Contenido de Nitrógeno (%)</b>	0,06	0,05
<b>Contenido de Fósforo (mg/kg)</b>	25,68	27,78
<b>Conductividad eléctrica (mS/cm)</b>	0,11	0,08

**Tabla 3.2.** – Características del agua de riego en las fincas Occifresa S.L. (Moguer), y Fres-Gómez S.C.A. (Palos de la Frontera).

<b>Occifresa S.L. y Fres-Gómez S.C.A.</b>			
<b>Conductividad eléctrica (mS/cm)</b>	0,16	<b>Cl<sup>-</sup> (mg/L)</b>	21,0
<b>K<sup>+</sup> (mg/L)</b>	2,6	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/L)</b>	<2,50
<b>Na<sup>+</sup> (mg/L)</b>	11,3	<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg/L)</b>	<0,05
<b>Ca<sup>2+</sup> (mg/L)</b>	18,0	<b>Cu (mg/L)</b>	<0,05
<b>Mg<sup>2+</sup> (mg/L)</b>	10,0	<b>Mn (mg/L)</b>	<0,05
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/L)</b>	<0,06	<b>Fe (mg/L)</b>	<0,10
<b>CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (mg/L)</b>	<25,0	<b>Zn (mg/L)</b>	<0,05
<b>CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> (mg/L)</b>	55,0	<b>B (mg/L)</b>	<0,50
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mg/L)</b>	16,8	<b>Relación de adsorción de sodio (meq)</b>	<0,50

### 3.3.2. *Diseño experimental y descripción de los tratamientos.*

El diseño experimental fue de bloques al azar con tres repeticiones. En 2009-10, se aplicaron cinco tratamientos, y siete en 2010-11 y 2011-12, además de un testigo no tratado (UC). Los tratamientos fueron superimpuestos, en las mismas parcelas y repeticiones, año tras año. Las medidas de cada parcela elemental fueron: 25m de largo por 3,3m de ancho, con tres lomos de 50cm y dos hileras de plantas cada uno.

Los tratamientos aplicados durante las tres años de estudio fueron: biosolarización con gallinaza (2.500g/m<sup>2</sup>) (BIO); dazomet (8g/m<sup>2</sup> en 2009-10, y 20g/m<sup>2</sup> en 2010-11 y 2011-2012) + 1,3-dicloropropeno (40g/m<sup>2</sup> en 2009-10, y 30g/m<sup>2</sup> en 2010-11 y 2011-2012) (DAZ:1,3 D); 1,3-dicloropropeno:cloropicrina (40g/m<sup>2</sup>) (1,3 D:PIC); cloropicrina (40g/m<sup>2</sup>) (PIC), y dimetil disulfuro (40g/m<sup>2</sup>) + cloropicrina (13g/m<sup>2</sup>) aplicado mediante inyección en reja (DMDS:PIC S). En las dos últimas campañas, se añadieron dos nuevos tratamientos: dimetil disulfuro (40g/m<sup>2</sup> en 2010-11, y 30g/m<sup>2</sup> en 2011-12) + cloropicrina (13g/m<sup>2</sup> en 2010-11, y 10g/m<sup>2</sup> en 2011-12) aplicados en riego por goteo, bajo lomo con cubierta de plástico de polietileno negro (PE) en 2010-11 y bajo lomos con cubierta de plástico virtualmente impermeable (VIF) en 2011-12 (DMDS:PIC D), y dazomet (50g/m<sup>2</sup>) (DAZ) (Tabla 3.3).

A mediados de Julio, se realizó el abonado con enmienda orgánica en todos los tratamientos, incorporándose en el suelo a una profundidad de 20cm con la ayuda de un rotovator (16 de

Julio de 2009, 16 de Julio 2010, 20 de Julio de 2011 en Fres-Gómez S.L., y 13 Julio 2009, 20 de Julio de 2010 y 21 Julio 2011 en Occifresa S.C.A.).

El tratamiento de biosolarización (BIO), se llevó a cabo desde mediados del mes de julio hasta mediados de agosto (18 Julio - 14 Agosto 2009, 21 de Julio - 17 Agosto 2010 y 22 Julio - 18 Agosto 2011 en Fres-Gómez S.L., y 17 Julio - 19 Agosto 2009, 23 Julio-19 Agosto, 2010 y 22 Julio - 18 Agosto, 2011, en Occifresa S.C.A.), cubriendo el suelo con plástico de polietileno transparente de baja densidad de 0,05 mm de espesor (Katan, 1981; Medina *et al.*, 2009) (ver Capítulo 2, apartado 2.3.2). A mediados de Agosto, se llevó a cabo el alomado del terreno con plástico de PE negro, en lomos con una anchura de 50cm, colocando una cinta de riego por goteo en la parte central de cada uno. Los tratamientos químicos, fueron aplicados mediante riego por goteo o mediante inyección en reja en diferentes fechas (Figura 3.2. A) (Tabla 3.3). El tratamiento con dazomet se aplicó a todo terreno, mediante una Mix Tiller Dry® (Forigo), antes de la formación de los lomos (Figura 3.2. B).

La plantación, se llevó a cabo a mediados del mes de Octubre (23 Octubre 2009, 24 de Octubre de 2010 y 24 Octubre 2011 en Fres-Gómez S.L., y 16 de Octubre de 2009, 18 de Octubre 2010 y 25 de Octubre de 2011, en Occifresa S.C.A.), con plantas de fresa del cultivar 'Camarosa'. En Fres-Gómez S.L. la densidad de plantación fue de 72.000 plantas/ha, con un marco de plantación de 25 x 25cm, mientras que en Occifresa se dispusieron 87.000 plantas/ha, con un marco de 20 x 22cm. En el primer caso las plantas procedían de "Viveros Niharra" (Segovia), y en el segundo de "Viveros Cuna de Platero" (Ávila). En estos ensayos se utilizó el cultivar 'Camarosa', debido a que se ha considerado la variedad más importante en la zona de Huelva desde 1997 hasta 2010 y por ser susceptible a podredumbre carbonosa causada por *M. phaseolina* (Koike *et al.*, 2009).

Las plantas fueron cultivadas en un sistema intensivo anual bajo macrotúnel (Medina *et al.*, 2009). Un mes después de la plantación, se llevó a cabo el forzado del cultivo mediante macrotúneles, bajo plástico transparente de 0,15 mm de espesor. Para el manejo del cultivo se siguieron las recomendaciones del reglamento de producción integradas para el cultivo de la fresa (López-Aranda, 2008). Durante cada campaña agrícola (Octubre - Mayo), el abonado se realizó mediante fertirrigación: 175 kg N/ha, 77 kg P<sup>+</sup>/ha, 185 kg K<sup>+</sup>/ha, 85 kg Ca<sup>2+</sup>/ha, 14 kg Mg<sup>2+</sup>/ha.

Figura 3.2. - A). Aplicación de 1,3 Dicloropropeno:Cloropicrina en inyección a lomo, en el cultivo de fresa. B). Aplicación de Dazomet a todo terreno.



**Tabla 3.3.** – Descripción de los tratamientos de desinfección de suelo (Occifresa S.C.A., Moguer, y Fres-Gómez S.L., Palos de la Frontera, en la provincia de Huelva).

Tratamientos	Descripción	Dosis (g/m <sup>2</sup> )			Métodos de aplicación	Fecha de aplicación <sup>y</sup>		
		2009	2010	2011		2009	2010	2011
<b>UC</b>	Control	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>BIO</b>	Biosolarización con gallinaza	2.500	2.500	2.500	Toda superficie	13, 16 Jul	13, 16 Jul	21, 20 Jul
<b>DAZ:1,3D</b>	Dazomet:1,3-dicloropropeno	8:40	20:30	20:30	Toda superficie + Cinta por riego <sup>x</sup>	10, 11 Sep	10, 7 Sep <sup>z</sup>	6, 14 Sep
<b>1,3D:PIC</b>	1,3-dicloropropeno:cloropicrina	40	40	40	Inyección en reja bajo PE	3, 4 Sep	1, 4 Sep	6, 1 Sep
<b>PIC</b>	Cloropicrina	40	40	40	Inyección en reja bajo PE	3, 4 Sep	1, 4 Sep	6, 1 Sep
<b>DMDS:PIC S</b>	dimetil disulfuro:cloropicrina	40:13	40:13	40:13	Inyección en reja bajo PE	3, 4 Sep	1, 4 Sep	6, 1 Sep
<b>DMDS:PIC D</b>	dimetil disulfuro:cloropicrina	----	40:13	30:10	Cinta de riego bajo PE (2010) y bajo VIF (2011)	----	14, 13 Sep	15, 15 Sep
<b>DAZ</b>	Dazomet	----	50	50	Toda superficie	----	1, 4 Sep	6, 1 Sep

<sup>x</sup> Dazomet fue aplicado por cinta de riego en 2009 y a toda superficie en 2010 y 2011, 1,3-dicloropropeno se aplicó por cinta de riego durante las tres campañas. <sup>y</sup> La primera fecha corresponde a Occifresa S.C.A. y la segunda a Fres-Gómez S.L. <sup>z</sup> La fecha corresponde a la aplicación de 1,3D, ya que el tratamiento DAZ fue aplicado a la misma vez que se hicieron los lomos del cultivo. “n.a.” = no aplicado. “----” = no determinado. “PE” = Film de plastic de polietileno. “VIF” = plástico virtualmente impermeable.

*3.3.3. - Determinación de la población de M. phaseolina, en suelo.*

Con el fin de evaluar la eficacia de cada tratamiento se determinó la población de *M. phaseolina* en cada parcela como unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (UFC/g). Para ello, se tomaron muestra de suelo antes y después de la aplicación de los tratamientos, así como al final de cada campaña (mediados de mayo), para, de esta forma determinar la duración y eficacia de los tratamientos en el control de los microesclerocios de *M. phaseolina*, en suelo. En las parcelas correspondientes al tratamiento BIO, las muestras de suelo se tomaron siguiendo un patrón de zig-zag a toda superficie, antes de la aplicación de los tratamientos (09 de Julio de 2009, 16 de Julio de 2010 y 19 de Julio de 2011), y del lomo central en el resto (22 de Agosto de 2009, 26 de Agosto de 2010 y 23 de Agosto de 2011). Después de la aplicación de los tratamientos (14 de Octubre 2009, 01 de Octubre de 2010 y 11 Octubre de 2011) y al final de cada campaña (14 de Mayo de 2010, 16 de Mayo de 2011 y 15 de Mayo de 2012), se tomaron tres muestras de los lomos centrales de cada parcela elemental. En cada toma de muestras, el suelo recogido de cada parcela se mezcló para su homogeneización. Todas las muestras fueron tomadas hasta 20cm de profundidad, con una sonda vertical graduada. Posteriormente, las muestras de suelo se llevaron al laboratorio y se dejaron secar al aire libre.

La metodología seguida para el procesamiento de las muestras de suelo en una modificación de la utilizada por Papavizas y Klag (1975) (ver Capítulo 2, Apartado 2.3.3). Las colonias fueron inspeccionadas microscópicamente, para determinar las características morfológicas propias de *M. phaseolina* (Avilés *et al.*, 2008)

*3.3.4. - Efecto de los tratamientos en la incidencia de podredumbre carbonosa de fresa.*

Antes de la plantación se realizaron aislamientos de tejido de las plantas procedentes de vivero, para determinar su estado sanitario. Las muestras se tomaron mediante muestreo estratificado.

La incidencia de la podredumbre carbonosa se evaluó semanalmente, mediante la recogida de plantas muertas, en los lomos centrales de cada parcela experimental. El procesamiento de las plantas se realizó tal y como se indica en el apartado 2.3.4.

*3.3.5. - Efecto de los tratamientos en la producción comercial de fresa.*

Los frutos fueron recolectados al menos dos veces por semana, desde el inicio de la producción (mediados de Enero) hasta final de cada campaña agrícola (mediados de Mayo). Los datos se

### Capítulo 3

registraron para cada parcela experimental. Toda la fruta recolectada se pesó y se clasificó, en base a los criterios comerciales de la normativa europea de regulación para la fruta fresca. Solamente se llevó a cabo el pesado de la fruta comercial y los datos fueron expresados en kg/ha. La fruta no apta comercialmente, fue rechazada sin el registro de datos (menos del 2-3% del total de frutos cosechados). Se realizaron, al menos, 25 recolecciones de frutos en cada una de las campañas agrícolas.

#### 3.3.6. - *Análisis estadístico.*

La incidencia de podredumbre carbonosa, se expresó como porcentaje acumulado de plantas muertas o enfermas. Los datos de porcentaje, se transformaron mediante el arcoseno de la raíz cuadrada antes del análisis de la varianza. Los datos de población del suelo fueron transformados mediante la raíz cuadrada de UFC/g + 0,5 de cada réplica entre el total del número de muestras. Cuando el estadístico F de ANOVA, fue significativo a  $P < 0,05$ , las medias se compararon mediante la prueba de la mínima diferencia significativa de Fischer (MDS), en un nivel de significación del 5% (De los Santos *et al.*, 2003). Para los análisis estadísticos de datos, se utilizó el programa “Statistix” vs 8.0 (Analytical Software, Ltd., La Jolla, CA, EE.UU.).

### 3.4. – *Resultados.*

#### 3.4.1. - *Efecto de los tratamientos en la población de M. phaseolina en suelo.*

En Fres-Gómez S.L. no se detectó *M. phaseolina* en las muestras de suelo tomadas antes de la aplicación de los tratamientos en 2009, mientras que la población inicial en los suelos de Occifresa S.C.A. fue elevada, presentando una distribución homogénea en la parcela experimental (Tabla 3.4). En esta finca, los tratamientos BIO, 1,3D:PIC, y DAZ:1,3D redujeron la densidad de microesclerocios de *M. phaseolina* en suelo de forma significativa con respecto al control no tratado. El efecto de estos tratamientos se mantuvo hasta finales de Mayo, con una reducción porcentual, respecto al muestreo inicial de entre 90–100% (Tabla 3.4). En Fres-Gómez no se detectó *M. phaseolina*, en ninguno de los muestreos realizados a lo largo de 2009-10.

En Occifresa S.C.A., en el comienzo de la segunda campaña (2010-11), encontramos niveles de microesclerocios de *M. phaseolina*, superiores a 10,0 UFC/g de suelo, en todos los tratamientos. Todos los tratamientos redujeron de forma significativa las poblaciones de *M. phaseolina*, respecto al control no tratado. Los niveles poblacionales se mantuvieron hasta finales de Mayo de 2011, con valores significativamente inferiores al control no tratado en la mayoría de los tratamientos, con la

excepción de DMDS:PIC D, aunque en este caso se observó una reducción, con respecto a la población inicial, del 38% (Tabla 3.4). En Fres-Gómez, no se detectaron niveles superiores a 0,7 UFC/g de suelo, en ninguno de los muestreos realizados en 2010-11.

En 2011-12, los efectos de los tratamientos en la finca de Occifresa S.C.A. fueron muy similares a los observados en la campaña 2010-2011 (Tabla 3.4). Durante esta campaña agrícola, en la finca de Fres-Gómez S.L., en el muestreo previo a la aplicación de los tratamientos, solo se detectó *M. phaseolina* en los suelos correspondientes a los tratamientos 1,3D:PIC, DAZ y en el control no tratado, observándose en estos dos últimos los valores medios más altos (1,3 UFC/g). Tras la aplicación de los tratamientos, solo se detectó *M. phaseolina*, en las parcelas no tratadas, llegándose a incrementar el promedio de esclerocios de *M. phaseolina* en suelo, en más de 4 veces, en el muestreo llevado a cabo en Mayo de 2012.

#### 3.4.2. - Mortalidad de plantas e incidencia de podredumbre carbonosa.

En los aislamientos realizados a las plantas provenientes de viveros de alturas, antes de la plantación, no se detectó *M. phaseolina*, aislándose en porcentajes bajos *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., y *Pythium* spp., entre otros.

A lo largo de las tres campañas agrícolas, se observó un mayor porcentaje de plantas muertas y mayor incidencia de podredumbre carbonosa en Occifresa S.C.A. (Tabla 3.5).

En Occifresa S.C.A, cuando la mortalidad de plantas superó el 5%, el porcentaje de plantas muertas en los suelos desinfestados fue significativamente inferior que en el control no tratado, con la excepción de los tratamientos con DAZ:1,3D y BIO en 2009-2010 y 2010-11, respectivamente (Tabla 3.5).

En 2009-10, sólo los tratamientos 1,3D:PIC y PIC redujeron de forma significativa la incidencia de podredumbre carbonosa con respecto al control no tratado, en Occifresa S.C.A., mientras que en Fres-Gómez S.L, no se detectó la enfermedad. En las siguientes campañas, y en ambas localidades, todos los tratamientos redujeron significativamente la incidencia de podredumbre carbonosa. En 2011-12, la incidencia de la enfermedad fue inferior o igual al 1% en los suelos tratados (Tabla 3.5).

**Tabla 3.4.** - Población de *M. phaseolina* (UFC/g de suelo seco) antes, después y al final de cada campaña en Occifresa S.C.A, en tres campañas consecutivas<sup>x</sup>.

Tratamientos <sup>y</sup>	2009-10				2010-11				2011-12			
	Antes	Después	Final	Reducción final <sup>z</sup>	Antes	Después	Final	Reducción final	Antes	Después	Final	Reducción final
UC	13,6 <sup>x</sup>	11,3 a	11,3 a	-17%	11,0 b	29,3 a	12,0 a	+9%	9,3 ab	24,0 a	9,6 ab	+3%
BIO	12,7	2,7 bc	0,7 b	-95%	10,0 b	4,0 b	0 b	-100%	14,0 ab	3,3 b	0,9 b	-94%
DAZ:1,3D	18,7	2,7 bc	1,3 b	-93%	68,7 a	0 b	0 b	-100%	7,8 b	2,0 b	0,2 b	-97%
1,3D:PIC	4,0	0,7 c	0 b	-100%	14,7 b	3,3 b	0 b	-100%	12,7 ab	0,7 b	2,2 b	-83%
PIC	34,7	5,3 abc	3,3 ab	-91%	42,0 ab	1,3 b	2,7 b	-94%	18,7 ab	2,0 b	0,2 b	-99%
DMDS:PIC S	10,0	8,7 ab	8,0 ab	-20%	31,3 ab	0 b	0,7 b	-98%	40,0 a	1,1 b	0 b	-100%
DMDS:PIC D	----	----	----		17,3 b	10,7 b	10,7 a	-38%	19,6 ab	25,3 a	17,3 a	-12%
DAZ	----	----	----		28,0ab	0 b	0 b	-100%	11,3ab	0 b	0 b	-100%

<sup>x</sup> Unidades formadoras de colonias de *M. phaseolina* por gramo de suelo seco. Cada valor es la media de tres parcelas y de tres a cinco repeticiones (después de los tratamientos y antes de su aplicación, respectivamente). Los valores seguidos por la misma letra en una columna no difieren significativamente según la prueba MDS ( $P < 0,05$ ) (datos transformados mediante raíz cuadrada). Se presentan los datos no transformados. --- = no determinado. <sup>y</sup> Los detalles de los tratamientos se describen en la Tabla 3.3. <sup>z</sup> La reducción final de UFC/g fue hecha para el final de la campaña entre las UFC/g antes de aplicar los tratamientos.

### Capítulo 3

**Tabla 3.5.** - Efecto de los tratamientos de desinfección de suelo en el porcentaje acumulado de plantas muertas (PM) y en la incidencia de podredumbre carbonosa (PMRC), causada por *M. phaseolina*, desde la campaña 2009-10 hasta 2011-12 en las fincas Occifresa S.C.A. (Moguer) y Fres-Gómez S.L. (Palos de la Frontera). Mortalidad de plantas acumulada hasta el final de cada campaña (mediados de Mayo).

Tratamientos <sup>z</sup>	% Mortalidad de plantas (PM)			% Mortalidad de plantas por podredumbre carbonosa (PMCR)		
	2009-10	2010-11	2011-12	2009-10	2010-11	2011-12
<b>Occifresa S.C.A.</b>						
UC	49,1 a <sup>y</sup>	48,8 a	19,4 a	17,2 a	29,6 a	12,8 a
BIO	23,5 bc	30,7 ab	4,3 b	7,0 ab	12,3 b	1,1 b
DAZ:1,3D	36,9 ab	0,5 d	0,5 bc	11,2 ab	0,5 cd	0,2 bc
1,3D:PIC	6,7 c	10,1 cd	0,5 bc	0 b	3,2 bcd	0,1 bc
PIC	18,6 bc	15,4 bc	0,3 c	1,5 b	7,4 bc	0,1 c
DMDS:PIC S	15,9 bc	2,8 cd	0,3 c	7,6 ab	2,3 cd	0 c
DMDS:PIC D	----	11,9 c	0 c	----	6,22 bc	0 c
DAZ	----	1,8 cd	0,7 bc	----	0 d	0,2 bc
<b>Fres-Gómez S.L.</b>						
UC	1,0 <sup>y</sup>	6,2 a	20,2 a	0	6,2 a	19,0 a
BIO	0,4	1,3 b	0,3 b	0	1,0 b	0 b
DAZ:1,3D	0,3	0,5 b	0,1 b	0	0,1 b	0 b
1,3D:PIC	0,1	0,3 b	0,4 b	0	0 b	2 b
PIC	0,2	0,3 b	0,5 b	0	0 b	0 b
DMDS:PIC S	0,2	0,2 b	0,5 b	0	0,2 b	0,3 b
DMDS:PIC D	----	1,1 b	0,2 b	----	0,8 b	0 b
DAZ	----	0,5 b	0,4 b	----	0 b	0,1 b

<sup>y</sup> Valores seguidos por la misma letra en una columna no fueron significativamente diferentes según test MDS ( $P < 0,05$ ). Los datos fueron transformados mediante la transformación del arcoseno. Se presentan los datos no transformados. “----” = no determinado. <sup>z</sup> Los detalles de los tratamientos se describen en la Tabla 3.3.

### Capítulo 3

#### 3.4.3. - Efecto de los tratamientos en la producción de fresa.

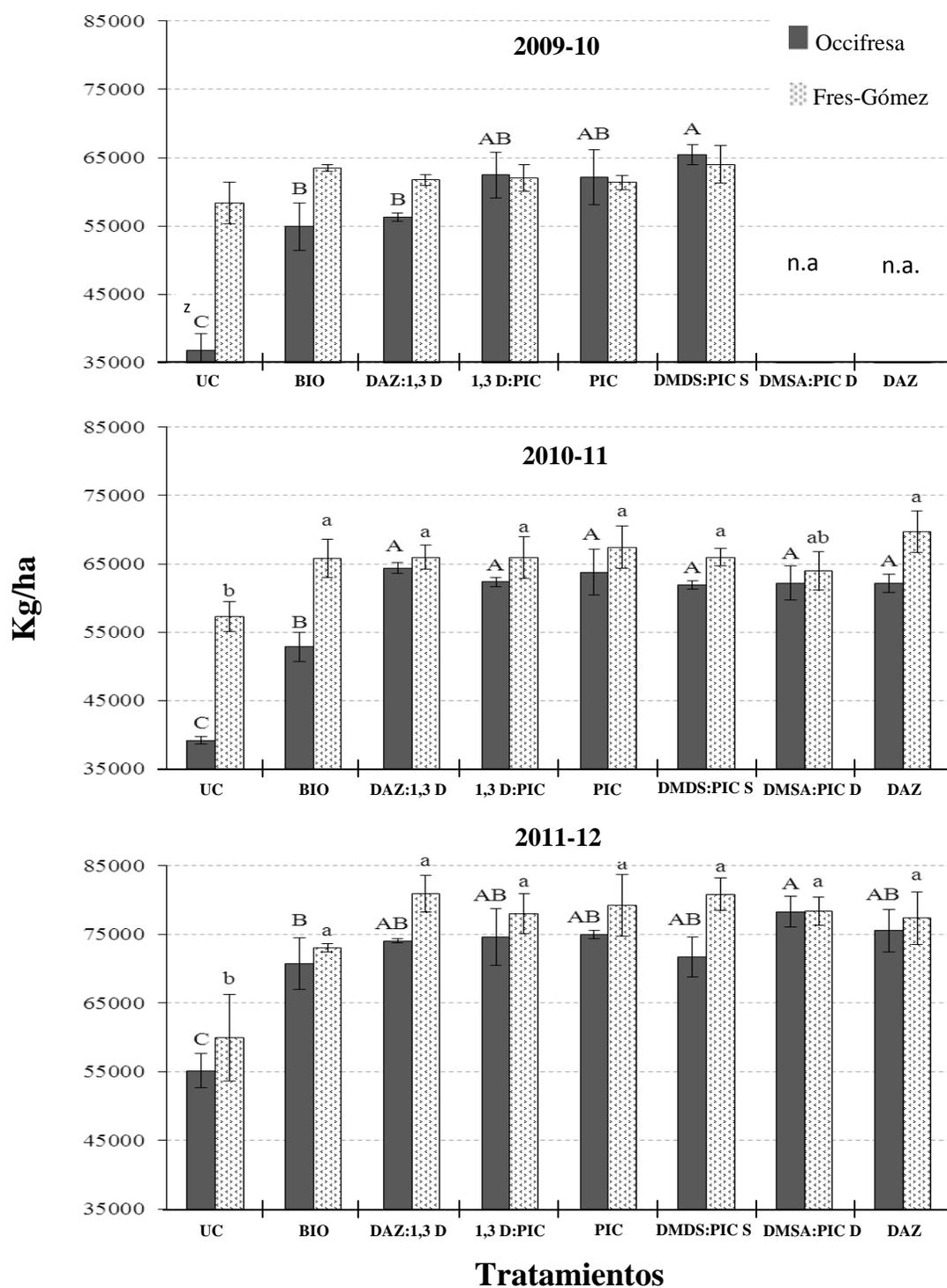
A lo largo de este estudio las producciones medias fueron más elevadas en Fres-Gómez S.L., fundamentalmente en los suelos no tratados. En esta localización, no se observaron diferencias en la producción hasta la segunda campaña. La producción fue significativamente más alta en suelos tratados, no observándose diferencias significativas entre tratamientos en Fres-Gómez S.L. En Occifresa S.C.A., los rendimientos en suelos tratados con BIO y DAZ:1,3D fueron significativamente inferiores a los de DMDS:PIC S, en 2009-2010. En 2010-11, y en esta finca, la producción en el tratamiento BIO fue significativamente inferior a la de los tratamientos de desinfección química, pero, en el último año, los rendimientos de este tratamiento fueron similares a los del resto, siendo en todo caso significativamente superiores al control no tratado (Figura 3.3).

#### 3.5. – *Discusión.*

Este trabajo se ha realizado en dos parcelas con distinto historial de desinfección química. Los resultados muestran que el tiempo transcurrido desde las últimas fumigaciones con BM o 1,3 D:cloropirina es determinante en la aparición y dispersión de *M. phaseolina*, coincidiendo con la opinión de algunos autores que indican que el abandono del uso de BM y los cambios en los fumigantes y en la forma de aplicación han influido en el establecimiento de este patógeno (Avilés *et al.*, 2008; Mertely *et al.*, 2005; Koike, 2008; Koike, 2012; Zveibil y Freeman, 2005). En los suelos que se dejaron de desinfectar con 1,3 D:cloropirina en 2008 (Fres-Gómez S.C.A.) los niveles de *M. phaseolina* en suelo se mantuvieron muy bajos hasta la última campaña, durante el segundo año la mortalidad por podredumbre carbonosa no superó el 7% en las parcelas control, siendo la incidencia superior en el último año, lo que se refleja en una disminución de los rendimientos de cosecha en estas campañas. Se observó como el patógeno se propaga en el suelo desde el foco inicial, las zonas no tratadas, a zonas adyacentes (Koike, 2008). La alta incidencia de podredumbre carbonosa en los suelos no tratados en Occifresa S.C.A., pudo deberse principalmente a la alta densidad de *M. phaseolina* en suelo, ya que en ningún caso se aisló de plantas procedentes de vivero.

Los tratamientos químicos fueron aplicados por inyección o cinta de riego en lomo, con la excepción del tratamiento con dazomet, que se realizó a toda superficie, lo que permite la desinfección no solo de los lomos, sino también de los pasillos, facilitando una gran eficacia en el control de patógenos de suelo, plagas y malas hierbas, como se observó anteriormente en California (Koike *et al.*, 2012). En nuestro caso la aplicación de DAZ es tan eficaz en el control de

**Figura 3.3.** - Producción total (kg/ha) en suelos fumigados y biosolarizados en pre-plantación en las fincas de Occifresa (Moguer) y Fres-Gómez (Palos de la Frontera) (cv. ‘Camarosa’).



<sup>z</sup>Valores seguidos por la misma letra en una columna no fueron significativamente diferentes según test MDS ( $P < 0,05$ ). “n.a.” = no aplicado. Los tratamientos se describen en la tabla 3.3. Las barras verticales indican el error estándar de cada media.

### Capítulo 3

*M. phaseolina* como 1,3 D:PIC, considerado tratamiento estándar, y que fue utilizado por el 73% de los productores en Huelva durante la campaña agrícola 2012-13. La elección de 1,3 D:PIC se debe, no sólo a que proporciona un control satisfactorio de hongos y nematodos en el suelo (Noling y Becker, 1994), sino también a la facilidad de su aplicación y/o uso, ya que no requiere ningún equipo adicional o calibración.

Varios autores han observado que mediante aplicaciones repetidas de tratamientos de biosolarización durante dos o más años consecutivos puede ejercerse el control de hongos como *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., y *Cylindrocarpon* spp. (Ben-Yephet *et al.*, 1987; Su *et al.*, 2001). En Occifresa S.C.A., el tratamiento BIO redujo la población *M. phaseolina*, e incremento de forma significativa la producción final acumulada, en comparación a las parcelas controles, durante las tres campañas agrícolas. Además, las aplicaciones con biosolarización, podrían haber tenido un efecto beneficioso acumulado en el tiempo, que da como resultado un bajo porcentaje de plantas muertas en el último año (Pinkerton *et al.*, 2002). La repetición de este tratamiento a toda superficie hace que sea tan eficaz y presente rendimientos similares al tratamiento estándar 1,3 D:PIC.

La mayoría de los tratamientos, con la excepción de DMDS:PIC D, fueron eficaces en el control de la población de *M. phaseolina*, desde su aplicación hasta el final de la campaña. Aunque la densidad de esclerocios tras la aplicación de DMDS:PIC D se mantuvo alta, cuando se utilizó plástico VIF en lugar de PE no se observó muerte de plantas. Según Santos y colaboradores (2007), el uso de plástico VIF incrementa la duración de concentraciones relativamente altas del fumigante en el suelo, permitiendo más tiempo de exposición de los patógenos a dosis letales y, también, una mejor distribución lateral en el suelo. Gerik (2005) observó que las aplicaciones con DMDS, reducían las poblaciones de *Pythium ultimum* y *Fusarium oxysporum*, aunque, investigaciones llevadas a cabo en viveros de fresas españoles, han mostrado resultados inconsistentes en el control de patógenos de suelo con este compuesto (De Cal *et al.*, 2004). DMDS no está aún autorizado para su uso en Europa, aunque ya se comercializa en EEUU e Israel como Paladin™.

En los suelos tratados los rendimientos del cultivo son similares a los obtenidos con las fumigaciones con BM, en concordancia con los resultados obtenidos en campos de producción de fresa, en Florida (EEUU) (Albregts *et al.*, 1996; Overman *et al.*, 1987). En ambas fincas experimentales, se observó una tendencia muy similar en todos los tratamientos, obteniendo de mayor a menor producción acumulada final los tratamientos de: DAZ, DMDS:PIC D, DMDS:PIC S, PIC, 1,3 D:PIC, DAZ:1,3 D y BIO.

### Capítulo 3

Según Domínguez y colaboradores (2014) los costos en fumigantes y de la aplicación fueron: DAZ = 2.800 €/ha, DAZ:1,3 D = 1.214 €/ha para 2009-10 que se aplicó DAZ a todo terreno y 1.863 €/ha para 2010-11 y 2011-12, donde DAZ se aplicó en cinta por riego, PIC = 1.140 €/ha, 1,3 D:PIC = 1.110 €/ha y BIO = 850 €/ha. El costo máximo fue el de la aplicación con DAZ (0,037 €/kg) y el mínimo el del tratamiento de biosolarización (0,012 €/kg). A pesar de que el tratamiento DAZ fue más caro que el tratamiento BIO, el aumento en la producción podría justificar la aplicación de este fumigante, en precios actuales para la fruta de fresa en el mercado europeo.

#### 3.6. – Bibliografía.

**Albregts, E.E., Gilreath, J.P., y Chandler, C.K.** 1996. Soil solarization and fumigant alternatives to methyl bromide for strawberry fruit production. *Soil Crop Sci. Soc. Fla. Proc.* 55:16-20.

**Angelini, R., y Faedi, W.** 2010. Malattie e fisiopatie. In: ART (Ed) *La Fragola*, Bologna, Italy, pp 228-246.

**Anónimo** (2012) [www.heconomia.es](http://www.heconomia.es).

**Anónimo** (2014a) [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org).

**Anónimo** (2014b) [www.magrama.es](http://www.magrama.es).

**Anónimo** (2014c) [www.cap.junta-andalucia.es](http://www.cap.junta-andalucia.es).

**Avilés, M., Castillo, S., Bascon, J., Zea-Bonilla, T., Martín-Sánchez, P.M., y Pérez-Jiménez, R.M.** 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. *Plant Pathol.* 57:382.

**Baino, O.M., Salazar, S.M., Ramallo, A.C., y Kirschbaum, D.S.** 2011. First report of *Macrophomina phaseolina* causing strawberry crown and root rot in north-western Argentina. *Plant Dis.* 95:1477.

**Benlioglu, S., Yildiz, A., y Döken, T.** 2004. Studies to determine the causal agents of soil-borne fungal diseases of strawberries in Aydin and to control them by soil disinfestation. *J. Phytopathol.* 152:509-513.

**Ben-Yephet, Y., Stapleton, J.J., Wakeman, R.J., y DeVay, J.E.** 1987. Comparative effects of soil solarization with single and double layers of polyethylene film on survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Phytoparasitica* 15:181-185.

**Colla, P., Gilardi, G., y Gullino, M.L.** 2012. A review and critical analysis of the European situation of soil-borne disease management in the vegetable sector. *Phytoparasitica* 40:515-523.

**De Cal, A., Martínez-Treceño, A., López-Aranda, J.M., y Melgarejo, P.** 2004. Chemical alternatives to Methyl Bromide in Spanish strawberry nurseries. *Plant Dis.* 88:210–214.

### Capítulo 3

- De los Santos, B., Barrau, C., Blanco, C., Arroyo, F., Porrás, M., Medina, J.J., y Romero, F.** 2003. Relationship between *Trichoderma* soil population and strawberry fruit production in soils previously fumigated. HortScience 7:1400-1402.
- Dhingra, O.D., y Sinclair, J.B.** 1975. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil: Effects of soil moisture, carbon:nitrogen ratios, carbon sources, and nitrogen concentrations. Phytopathology 65:236-240.
- Domínguez, P., Miranda, L., Soria, C., de los Santos, B., Chamorro, M., Romero, F., Daugovish, O., López-Aranda, J.M., y Medina, J.J.** 2014. Soil biosolarization for sustainable strawberry production. Agron. Sustain. Dev. DOI 10.1007/s13593-014-0211-z.
- Fang, X.L., Phillips, D., Li, H., Sivasithamparam, K., y Barbetti, M.J.** 2011. Comparisons of virulence of pathogens associated with crown and root diseases of strawberry in Western Australia with special reference to the effect of temperature. Sci. Hort. 131:39-48.
- Gerik, J.S.** 2005. Evaluation of soil fumigants applied by drip irrigation for liatris production, Plant Dis. 89:883-887.
- Golzar, H., Phillips, D., y Mack, S.** 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in Western Australia. Australasian Plant Dis. Notes 2:145-147.
- Katan, J.** 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soil-borne pests. Ann. Rev. Phytopathol. 19:211-236.
- Koike, S.T.** 2008. Crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in California. Plant Dis. 92:1253.
- Koike S.T., Gordon, R., Ajwa, H., Daugovish, O., Bolda M., y Legard, D.** 2009. Fumigant and variety evaluations in *Macrophomina* and *Fusarium* infested fields. 2009 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. San Diego, California, USA, November 11, 2009. 13:1-4.
- Koike, S.T., Gordon, R., Daugovish, O., Ajwa, H., Bolda, M., y Subarao, K.** 2012. Recent Developments on Strawberry Plant Collapse Problems in California Caused by *Fusarium* and *Macrophomina*. Intl. Journal of Fruit Science 13:76-83.
- López-Aranda, J.M.** 2008. The cultivation of the strawberry in Huelva. In: de Andalucía J (ed) The strawberry crop at Huelva. Ideas, Exclusivas y Publicidad S.L., Sevilla (Spain), pp 101-174.
- López-Aranda, J.M.** 2013. Agricultural production in the EU, five years after the end of methyl bromide: problems and solutions. 2013 Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. San Diego, California, USA, November 4, 2013.
- Martínez-Ferri, E., Ariza, M.T., Domínguez, P., Medina, J., Miranda, L., Muriel, J.L., Montesinos, P., Rodríguez-Díaz, J.A., y Soria, C.** Cropping strawberry for improving productivity and environmental

### Capítulo 3

sustainability. In: Strawberries: Cultivation, Antioxidant Properties and Health Benefits. Nova Science Publishers, Inc. (en prensa)

**Medina, J.J., Miranda, L., Soria, C., Palencia, P., y López-Aranda, J.M.** 2009. Non-chemical alternatives to methyl bromide for strawberry: biosolarization as a case-study in Huelva. *Acta Hortic.* 842:961-964.

**Mertely, J., Seijo, T., y Peres, N.** 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. *Plant Dis.* 84:434.

**Mihail, J.D.** 1989. *Macrophomina phaseolina*: Spatio-temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. *Phytopathology* 79:848-855.

**Miranda, L., Domínguez, P., Soria, C., Talavera, M., Chamorro, M., Romero, F., De los Santos, B., Medina-Mínguez, J.J., y López-Aranda, J.M.** 2012. Nuevos resultados en la evaluación de desinfectantes de suelos para el cultivo de la fresa. *Agrícola Vergel* enero-febrero, 1-6.

**Noling, J.W., y Becker, J.O.** 1994. The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. *J. Nematol.* 26:573-586.

**Overman, A.J., C.M. Howard., y Albrechts, E.E.** 1987. Soil solarization for strawberries. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 100:236- 239.

**Papavizas, G., y Klag, N.G.** 1975. Isolation and quantitative determination of *Macrophomina phaseolina* from soil. *Phytopathology* 65:182-187.

**Pinkerton J.N., Ivors K.L., Reeser P.W., Bristow P.R., y Windom G.E.** 2002. The use of soil solarization management of soilborne plant pathogens in strawberry and red raspberry production. *Plant Dis.* 86:645-651.

**Santos, B.M., Gilreath, J.P., López-Aranda, J.M., Miranda, L., Soria, C., y Medina, J.J.** 2007. Comparing methyl bromide alternatives for strawberry in Florida and Spain. *Journal of Agronomy* 6:225-227.

**Sharifi, K., y Mahdavi, M.** 2011. First report of strawberry crown and root rot caused by *Macrophomina phaseolina* in Iran. *Iran. J. Plant Pathol.* 47:161.

**Su, G., Suh, S. O., Schneider, R.W., y Russin, J.S.** 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 91:120-126.

**Tjamos, E.C., Antoniou, P.P., Skourtaniotis, A., Kikrilis, E., y Tjamos, S.E.** 2006. Impermeable plastics and methyl bromide alternatives in controlling soilborne fungal pathogens of strawberries in Greece. *Proceedings 12th Cong. Med. Phytopath. Union*, pp 255-257.

**Wyllie, T.D.** 1988. Charcoal rot of soybean-current status. In: Wyllie TD, Scott DH (Eds) *Soybean diseases of the north central region*, APS Press, St. Paul, MN, pp 106-113.

### Capítulo 3

**Young, D.J., y Alcorn, S.M.** 1984. Latent infection of *Euphorbia lathyris* and weeds by *Macrophomina phaseolina* and propagule populations in Arizona field soil. Plant Dis. 68:587–589.

**Zveibil, A., y Freeman, S.** 2005. First report of crown and root rot in strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Israel. Plant Dis.89:1014.

**Zveibil, A., y Freeman, S.** 2009. Methods for detection of soilborne pathogens affecting strawberry in Israel. Acta Hortic. 842:191-194.

**Zveibil, A., Mor, N., Gnyem, N., y Freeman, S.** 2012. Survival, host–pathogen interaction, and management of *Macrophomina phaseolina* on strawberry in Israel. Plant Dis. 96:265-272.

**CAPITULO 4**

**EVALUACION DE LA RESISTENCIA DE CULTIVARES DE FRESA A  
MACROPHOMINA PHASEOLINA, AGENTE CAUSAL  
DE PODREDUMBRE CARBONOSA**

**4.1. – Resumen.**

El cultivo de la fresa se ha visto afectado por la retirada del bromuro de metilo como principal fumigante, lo que ha propiciado la aparición de nuevos patógenos y problemas en su control. Tal es el caso de *Macrophomina phaseolina*, hongo patógeno de suelo que ocasiona la podredumbre carbonosa (charcoal rot). Dadas las restricciones vigentes en la utilización de desinfectantes químicos, el uso de cultivares resistentes se considera una de las alternativas para reducir la incidencia de podredumbre carbonosa en el cultivo de la fresa. El objetivo de este trabajo, fue determinar la respuesta de variedades de fresa a *M. phaseolina* en condiciones controladas y de campo. La respuesta al patógeno de algunos de los cultivares de uso común en la provincia de Huelva se caracterizó mediante inoculación artificial bajo condiciones controladas. Se utilizaron dos aislados del patógeno y la inoculación se realizó mediante riego con una suspensión de esclerocios. Se realizaron observaciones semanales, para comprobar el estado y las necesidades hídricas de las plantas, y se determinó la susceptibilidad al patógeno mediante una escala de severidad de 0 (planta sana) a 5 (planta muerta), además de la incidencia, como porcentaje de plantas muertas a la finalización del ensayo. Las diferencias observadas se debieron al cultivar, no siendo significativa la interacción entre cultivar y aislado. Sólo ‘Splendor’ resultó resistente al patógeno, mientras que ‘Camarosa’, ‘Florida Fortuna’, ‘Candongá’ y ‘Benicia’, fueron susceptibles. Los ensayos de campo se llevaron a cabo, durante dos campañas agrícolas, en una parcela experimental que nunca había sido desinfectada y que presentaba una población homogénea en suelo del patógeno objeto de estudio. El diseño experimental fue de bloques al azar con 3 repeticiones y 12 plantas por cultivar y repetición. Los resultados fueron similares a los obtenidos en condiciones controladas. El cultivar ‘Splendor’ fue el más resistente, mientras que ‘Camarosa’ y ‘Florida Fortuna’ resultaron los más susceptibles.

### 4.2. – **Introducción.**

Aunque la podredumbre carbonosa de la fresa, ocasionada por el patógeno de suelo *M. phaseolina*, fue detectada a mediados de los años 50 del siglo XX en Illinois (EEUU) (Maas, 1998), su expansión a la mayoría de las zonas donde se cultiva la fresa ha sido reciente (Mertely *et al.*, 2005; Zveibil y Freeman, 2005), siendo descrita por primera vez en Huelva en 2007 (Avilés *et al.*, 2008). Los síntomas en fresa consisten en marchitamiento foliar, secado y muerte de las hojas más viejas, seguido de un eventual colapso y muerte de la planta (Koike, 2008). En corte longitudinal de la corona, se observa una coloración negra o marrón que indica necrosis en los tejidos corticales y vasculares (Mertely *et al.*, 2005). Esta enfermedad también puede ocasionar necrosis en las raíces de la planta (Avilés *et al.*, 2008). Las condiciones que facilitan el desarrollo de la enfermedad son elevadas temperaturas y estrés hídrico. El hongo produce estructuras de resistencia que le permiten sobrevivir en el suelo o sobre restos de plantas durante largos periodos de tiempo. Ocasionalmente se pueden desarrollar picnidios ostiolados en tejidos del huésped, y estos a su vez producir conidios, los cuáles, juegan un importante papel en la dispersión del patógeno (Holliday y Punithaligam, 1970; Mihail y Taylor, 1995; Smith y Wyllie, 1999). Las enfermedades ocasionadas por patógenos de suelo son de difícil control. Tras el abandono del uso del bromuro de metilo se estudia la eficacia de otros fumigantes químicos, sometidos a importantes restricciones de uso por las diversas normativas y legislaciones. El uso de alternativas químicas implica alteraciones en el medioambiente, afectando, entre otros factores, a la fertilidad del suelo y a la calidad del agua. El uso de plantas resistentes o tolerantes frente a *M. phaseolina* y otros patógenos de suelo, como parte de las estrategias de control integrado es una alternativa que debe ser tomada en cuenta (Avilés *et al.*, 2009; Khan, 2007). Los programas de mejora encaminados al desarrollo de cultivares resistentes a patógenos de suelo están en progreso en diferentes países (Faedi *et al.*, 2002), entre ellos España. En nuestro caso, los convenios de mejora que mantiene el Instituto de Formación Agraria, Pesquera y del Medio Rural (IFAPA) con otros organismos y empresas del sector fresero, incluyen el estudio de la resistencia de las líneas en desarrollo a *M. phaseolina*.

Los estudios llevados a cabo por diferentes autores indican que los cultivares de fresa varían en su susceptibilidad a este patógeno, observándose distinto comportamiento en plantas inoculadas artificialmente o mantenidas en campo (Koike, 2008; Koike *et al.*, 2009). Avilés y colaboradores (2009), indicaron que la respuesta de los cultivares a la enfermedad depende del aislado de *M. phaseolina*. Aunque en un trabajo posterior determinaron tres grupos de susceptibilidad al patógeno (Avilés *et al.*, 2012).

## Capítulo 4

El objetivo de este trabajo es caracterizar la respuesta de variedades de fresa, de uso común en la provincia de Huelva, a *M. phaseolina*, mediante inoculación artificial y ensayos de campo.

### 4.3. - Materiales y métodos

#### 4.3.1. - Inoculación de *M. phaseolina* en condiciones controladas.

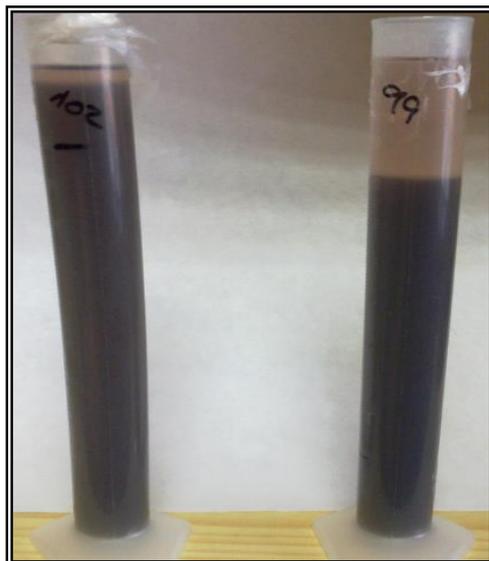
Se llevaron a cabo dos ensayos, desde Octubre 2011 - Marzo 2012 y Octubre 2012 - Marzo 2013. En estos ensayos, se analizó la respuesta de cinco cultivares comerciales de fresa de uso común en la provincia de Huelva: ‘Benicia’, ‘Camarosa’, ‘Candongga’, ‘Florida Fortuna’ y ‘Splendor’. Para la inoculación se utilizaron dos aislados de *M. phaseolina*: TOR-99, aislado procedente de tejidos de planta sintomática de fresa (‘Camarosa’), y TOR-102, aislado de suelo donde se cultiva fresa (Moguer, Huelva).

Las plantas de fresa se trasplantaron a macetas de 16cm de diámetro, que contenían turba estéril, manteniéndose en cámara de cultivo a 27°C, en condiciones de fotoperiodo con 16h de luz (SYLVANIA LUXLINE PLUS F58W/840 Cool White DE LUXE, GERMANY, 100.5  $\mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Figura 4.1). El diseño experimental fue de bloques al azar con 3 repeticiones (2 plantas por repetición) por aislado y cultivar. Cuatro semanas después de la plantación, se realizó la inoculación mediante riego con 50ml de una suspensión de esclerocios ( $6 \times 10^3$  esclerocios/ml) de cada uno de los aislados de *M. phaseolina* (Figura 4.2). Las plantas usadas como control se regaron con agua (Avilés *et al.*, 2009). Se realizaron riegos periódicos (dos semanales) con 100ml de agua/maceta.

**Figura 4.1.** - Ensayo en cámara de cultivo, en condiciones controladas.



Figura 4.2. - Suspensión de esclerocios de los aislados TOR-102 y TOR-99.



El seguimiento del desarrollo de la enfermedad se llevó a cabo mediante observaciones semanales. La susceptibilidad al patógeno, se determinó mediante una escala de 0 (planta sana) hasta 5 (planta muerta) (Tabla 4.1) (Fang *et al.*, 2011), la incidencia de podredumbre carbonosa se expresó como porcentaje de plantas muertas sobre el total. A la finalización del ensayo, todas las plantas fueron extraídas de las macetas y lavadas bajo agua corriente para eliminar el suelo adherido a las raíces. Para confirmar la infección por el patógeno, se realizaron aislamientos de tejidos sintomáticos sobre medio de cultivo patata dextrosa agar (ver apartado 2.3.4, capítulo 2), manteniéndose las placas a 30°C y en oscuridad durante 7 días, para la posterior identificación del patógeno.

Tabla 4.1. - Escala de severidad en plantas (Fang *et al.*, 2011).

---

0	Planta asintomática
1	Planta con ligero retraso del crecimiento
2	Planta enana y ligero marchitamiento
3	Planta decaída
4	Planta con mayoría de hojas marchitas o muertas
5	Planta muerta

---

## Capítulo 4

### 4.3.2. – *Ensayo de campo, en parcelas naturalmente infestadas con M. phaseolina.*

Durante las campañas agrícolas 2011-12 y 2012-13, en una parcela situada en la finca experimental El Cebollar (Moguer, Huelva), se llevaron a cabo ensayos encaminados a determinar la respuesta de cuatro de los cultivares comerciales más utilizados en la provincia de Huelva, así como en otras zonas de cultivo. Estos fueron: ‘Splendor’, ‘Camarosa’, ‘Florida Fortuna’ y ‘Candongá’. Esta parcela no ha sido desinfestada desde que en ella se cultiva fresa. *M. phaseolina* fue detectada por primera vez en 2009. El diseño experimental fue en bloques al azar con tres repeticiones, 12 plantas por repetición y cultivar, dispuestas en un lomo con dos hileras de plantas (marco de plantación 25 × 25cm).

Cada año, a mediados de septiembre se llevó a cabo el abonado de fondo y el alomado con la colocación simultánea de las cintas de riego. La plantación se realizó a mediados de Octubre, con plantas procedentes de viveros de altura. Las plantas fueron cultivadas en un sistema intensivo anual (Medina *et al.*, 2009). Un mes después de la plantación, se llevó a cabo el forzado del cultivo mediante macrotúneles de plástico transparente (0,15mm de espesor). Para el manejo del cultivo se siguieron las recomendaciones de la producción integrada para el cultivo de la fresa (López-Aranda, 2008). Durante cada campaña experimental (Octubre – Mayo), las plantas recibieron mediante fertirrigación: 175kg N/ha, 77kg P<sup>+</sup>/ha, 185kg K<sup>+</sup>/ha, 85kg Ca<sup>2+</sup>/ha, 14kg Mg<sup>2+</sup>/ha.

#### 4.3.2.1. - *Determinación de la población de M. phaseolina, en suelo.*

Se determinó la población en suelo de *M. phaseolina* en cada una de las parcelas elementales. Cada año, se realizaron tres muestreos: antes de la formación de los lomos (4 de Julio de 2011 y 5 de Julio de 2012), en el momento de la plantación (6 de Octubre de 2011 y 10 de Octubre de 2012, y al final de cada campaña agrícola (11 de Abril de 2012 y 8 de Mayo de 2013). Antes del alomado, se tomaron cinco muestras en un patrón en zig-zag a toda superficie con una sonda graduada de 5cm de diámetro, y se mezclaron para componer una muestra homogénea. Después del alomado y al final de la campaña, se tomaron tres muestras de los lomos de cultivo de cada una de las parcelas elementales con una sonda graduada de 2cm de diámetro, mezclándose para homogenizarlas. La toma de suelo se realizó de los primeros 20cm de profundidad para cada parcela. Las muestras fueron procesadas en laboratorio (apartado 2.3.3, capítulo 2).

## Capítulo 4

### 4.3.2.2 - Determinación de la incidencia de podredumbre carbonosa en campo.

En cada una de las parcelas elementales, se registró, semanalmente, la incidencia de la podredumbre carbonosa a lo largo de las dos campañas agrícolas. Desde la aparición de los primeros síntomas y hasta mediados de Mayo, se recogieron todas las plantas muertas para su diagnóstico en laboratorio (apartado 2.3.4., capítulo 2).

### 4.3.3. - Análisis estadístico.

La incidencia de la podredumbre carbonosa, se expresó como porcentaje acumulado de plantas muertas o enfermas. Los datos de porcentaje, se transformaron mediante el arcoseno de la raíz cuadrada antes del análisis de la varianza. Los datos de población de suelo fueron transformados mediante la raíz cuadrada  $\text{CFU/g} + 0,5$  de cada réplica entre el total del número de muestras. Cuando el estadístico F de ANOVA, fue significativo a  $P < 0,05$ , las medias se compararon con la prueba de mínima diferencia significativa de Fischer, en un nivel de significación del 5% (De los Santos *et al.*, 2003). Para los análisis estadísticos de datos, se utilizó el programa “Statistix” vs 8.0 (Analytical Software, Ltd., La Jolla, CA, EE.UU.).

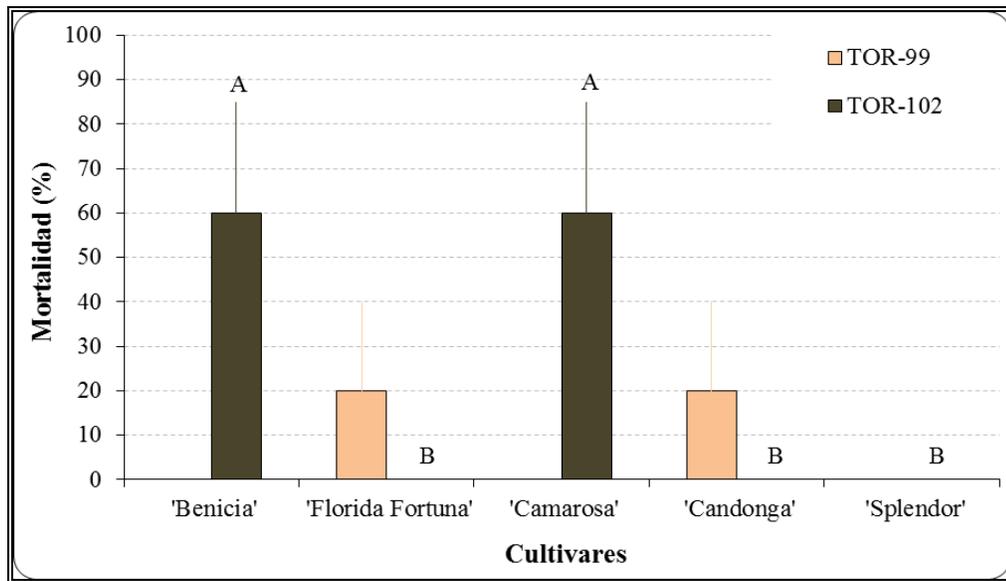
## 4.4. – Resultados.

### 4.4.1. – Incidencia de la podredumbre carbonosa en la inoculación de *M. phaseolina*, en condiciones controladas.

Los resultados de los análisis de varianza sobre severidad e incidencia de podredumbre carbonosa mostraron que el efecto de la interacción [ensayo  $\times$  tratamiento] no fueron significativos, de manera que las medias se calcularon para los dos ensayos. Según los resultados de los análisis de varianza, el único factor de variación que afectó a la severidad de la enfermedad fue el cultivar ( $P = 0,0000$ ), no siendo significativos el aislado o la interacción [cultivar  $\times$  aislado]. Al analizar el porcentaje de plantas muertas, sólo la interacción [cultivar  $\times$  aislado] resultó significativa ( $P = 0,0057$ ).

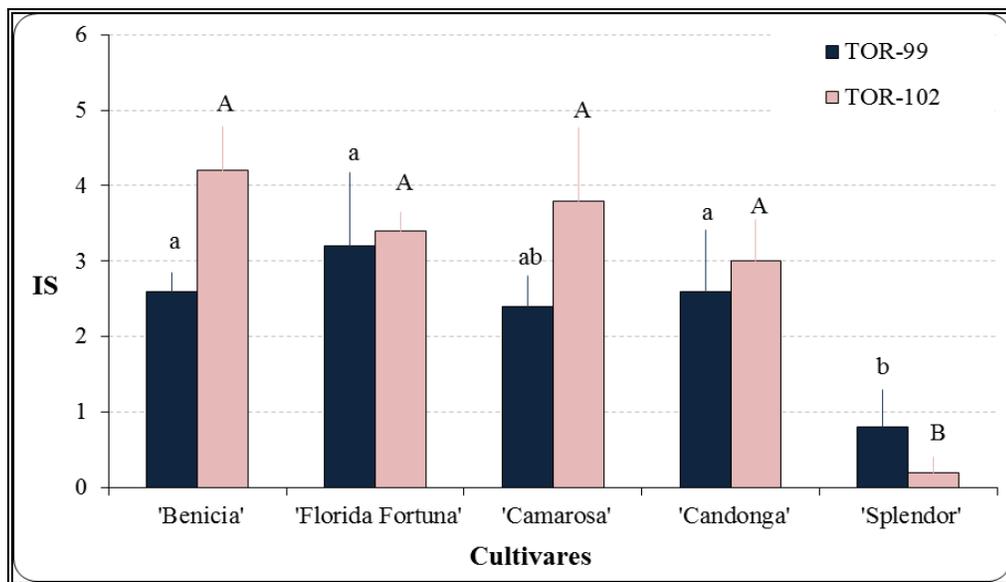
En el caso de los cultivares ‘Benicia’, ‘Florida Fortuna’, ‘Camarosa’ y ‘Candongá’, el aislado procedente de suelo infectado (TOR-102), fue ligeramente más virulento que el aislado obtenido de planta sintomática (TOR-99) (Figura 4.3). La inoculación con TOR-102 produjo la muerte del 60% de las plantas de ‘Benicia’ y ‘Camarosa’, mientras que el aislado TOR-99, ocasionó la muerte del 20% de ‘Candongá’ y ‘Florida Fortuna’ (Figura 4.3), no observándose muerte de plantas. ‘Splendor’ un IS de 0,2 y 0,8, para los aislados TOR-102 y TOR-99, respectivamente (Figura 4.3 y 4.4).

**Figura 4.3.** - Incidencia de podredumbre carbonosa (porcentaje de plantas muertas), tras la inoculación con dos aislados de *M. phaseolina*, en condiciones controladas.



Distintas letras sobre una serie indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Las barras verticales indican el error estándar de la media.

**Figura 4.4.** - Respuesta de cinco cultivares de fresa a la inoculación con dos aislados de *M. phaseolina*, en condiciones controladas.



Distintas letras sobre una serie indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Las barras verticales indican el error estándar de la media.

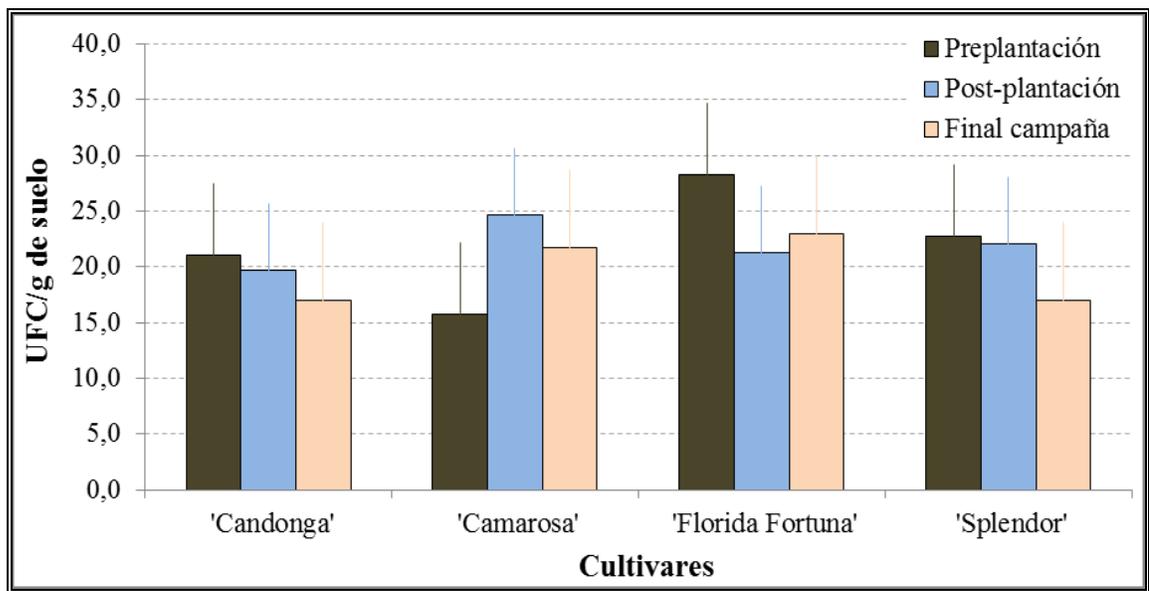
## Capítulo 4

### 4.4.2. – Ensayo de campo: determinación de la población de *M. phaseolina* en suelo.

En las muestras de suelo antes de la formación de los lomos el número medio de esclerocios por gramo de suelo fue de 8, en 2011, y de 25 UFC/gr, 2012.

Los análisis de varianza para el número medio de propágulos de *M. phaseolina* por gramo de suelo, en los tres momentos de toma de muestra indican que la interacción [cultivar × campaña] no fue significativa, por lo que los resultados se muestran como la media de los dos años. No se observan diferencias significativas entre el número de esclerocios en los suelos de las distintas parcelas elementales (Figura 4.5).

**Figura 4.5.** - Número medio de esclerocios de *M. phaseolina* por gramo de suelo seco (UFC/g), media de dos campañas agrícolas.



Las barras verticales indican el error estándar de la media.

### 4.4.3. – Ensayo de campo: determinación de la incidencia de podredumbre carbonosa.

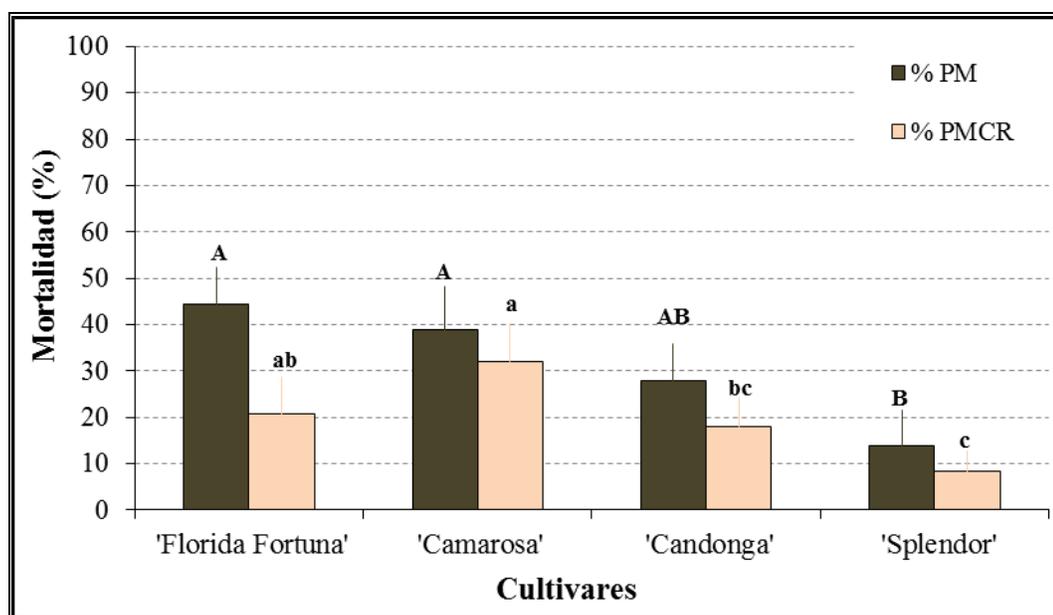
En los muestreos realizados antes de la plantación no se detectó *M. phaseolina*, aunque sí en bajos porcentajes *Phoma* spp., *Rhizoctonia* spp., y *Fusarium* spp.

Los análisis de varianza para el porcentaje de plantas muertas y porcentaje de plantas con podredumbre carbonosa, indican que la interacción [cultivar × campaña] no fue significativa, por lo que los resultados se muestran como la media de los dos años.

## Capítulo 4

El porcentaje de medio de plantas muertas acumulado en el caso del cultivar 'Florida Fortuna' fue del 44,5%, valor significativamente superior al 'Splendor' (13,9%) (Figura 4.6). 'Camarosa', fue el cultivar más susceptible a podredumbre carbonosa causada, con una incidencia del 32,0% y 'Splendor' la más tolerante, con una incidencia significativamente inferior 8,3%. No se encontraron diferencias significativas entre 'Camarosa' y 'Florida Fortuna', ni entre 'Candongga' y 'Splendor' (Figura 4.6).

**Figura 4.6.-** Porcentaje de mortalidad e incidencia de podredumbre carbonosa (porcentaje de plantas muertas), media de dos campañas agrícolas.



Distintas letras sobre una serie indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Las barras verticales indican el error estándar de la media.

### 4.5. – Discusión.

Los ensayos realizados en condiciones controladas y de campo, muestran resultados muy similares en la susceptibilidad y tolerancia, al patógeno de suelo *M. phaseolina*, siendo 'Splendor' el cultivar más resistente. En condiciones controladas, la severidad e incidencia de la enfermedad no depende del aislado utilizado, sin embargo, Avilés y colaboradores (2009), utilizando este método de inoculación y aislados de *M. phaseolina*, obtenidos de tejidos de planta sintomática, observaron que las diferencias en la susceptibilidad, se debían al aislado o a la interacción [cultivar × aislado]. Por lo que, llegaron a la conclusión, que los resultados podrían indicar que los cultivares

## Capítulo 4

caracterizados, manifiestan diferentes grados de susceptibilidad a podredumbre carbonosa de corona y necrosis de raíz causada por *M. phaseolina*, dependiendo del tipo de aislado. En un trabajo posterior, determinaron que ‘Candonga’ y ‘Florida Fortuna’ eran más susceptibles que ‘Camarosa’ (Avilés *et al.*, 2012), lo que observamos en nuestro caso, al inocular con el aislado procedente de tejidos de planta sintomática, TOR-99.

En ensayos llevados a cabo en condiciones controladas de laboratorio, algunos de los cultivares usados como ‘Albion’, ‘Camarosa’, ‘Diamante’, y ‘Ventana’ resultaron muy susceptibles a *M. phaseolina*. Las plantas inoculadas mostraron síntomas de marchitez, dos semanas después de la inoculación, y tan solo cuatro semanas más tarde, todas las plantas murieron con síntomas de podredumbre carbonosa. Sin embargo, ‘Seascape’, fue tolerante y sólo mostró síntomas de marchitamiento de las hojas más viejas en los últimos días del ensayo experimental (Koike, 2008). Posteriormente, Koike y colaboradores (2009), observaron en suelos no fumigados de cultivo de fresa, que las variedades ‘Camarosa’ y ‘Albion’, obtuvieron los menores rendimientos de fruto acumulado a final de campaña, debido a su sensibilidad por el patógeno *M. phaseolina*, mientras que, la variedad ‘Ventana’ fue la más tolerante. Sin embargo, Fang y colaboradores (2012) observaron, tras inoculaciones artificiales, que ‘Albion’ fue más resistente que ‘Camarosa’. Por el contrario, en condiciones experimentales de campo, ‘Camino Real’, obtuvo el mayor rendimiento acumulado de fruta, tanto en lomos de cultivo donde se aplicó un fumigante como lomos no fumigados, mostrándose como el cultivar más resistente a muchas de las enfermedades. Solamente ‘Aromas’, se determinó como resistente frente a los patógenos de *M. phaseolina* y *F. oxysporum*. Avilés y colaboradores (2012), determinaron tres grupos de cultivares, con distinta susceptibilidad a la enfermedad de podredumbre carbonosa, causada por el patógeno *M. phaseolina*;

1. Susceptibilidad alta: ‘Carmela’, ‘Candonga’, ‘Antilla’ y ‘Florida Fortuna’.
2. Susceptibilidad media: ‘Camarosa’ y ‘Primoris’.
3. Susceptibilidad baja: ‘Coral’.

Daugovish y colaboradores, detectaron una alta mortalidad en plantas de los cultivares ‘Benicia’ y ‘Camarosa’, ocasionada en su mayoría por *M. phaseolina* y *Fusarium* spp., en parcelas fumigadas con bromuro de metilo:cloropicrina, en Ventura County (California) durante la campaña agrícola 2011-12 (Daugovish, comunicación personal).

En otros estudios realizados con tres cultivares comerciales de Florida, se observó que ‘Florida Sensation’ y ‘Florida Fortuna’, mostraron una moderada resistencia a la enfermedad, mientras que,

## Capítulo 4

‘Florida Festival’ resultó susceptible (Whidden, 2013). En nuestro caso, ‘Florida Fortuna’ fue una de las variedades más susceptibles a *M. phaseolina*.

El éxito de una buena campaña agrícola: alta producción, baja mortalidad, alta calidad del fruto, se basa principalmente en una buena elección del cultivar, que depende directamente del grado de infestación, del tipo de hongo que predomine en el terreno, las condiciones climáticas, etc. así por ejemplo, ‘Florida Sensation’ y ‘Florida Fortuna’, se muestran resistentes a la enfermedad de antracnosis, causada por *Colletotrichum acutatum*, ‘Florida Festival’, es resistente a la necrosis de raíz causada por *Phytophthora cactorum*, y a *Botrytis cinérea* (Whidden, 2013).

Por lo tanto, para llevar a cabo un buen control de la podredumbre carbonosa u otras enfermedades en fresa, la desinfección del suelo, deberá basarse en una adecuada elección del fumigante, dosis y forma de aplicación, además de la elección de cultivares que sean menos susceptibles al patógeno de suelo, *M. phaseolina*.

### 4.6.- Bibliografía.

**Avilés, M., Castillo, S., Bascon, J., Zea-Bonilla, T., Martín-Sánchez, P.M., y Pérez-Jiménez, R.M.** 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. Plant Pathology 57:382.

**Avilés, M., Castillo, S., Borrero, C., Castillo, M.L., Zea-Bonilla, T., y Pérez-Jiménez, R.M.** 2009. Response of strawberry cultivars: ‘Camarosa’, ‘Candongga’ and ‘Ventana’ to inoculation with isolates of *Macrophomina phaseolina*. Acta Horticulturae ISHS 842:291-294.

**Avilés, M., Castillo, S., Borrero, C., y Refoyo, A.** 2012. Strawberry cultivar susceptibility to charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. Book of Abstracts VII International Strawberry Symposium ISHS, p 224.

**Chamorro, M., Romero, F., y De los Santos, B.** 2012. Evaluación de la resistencia de cultivares de fresa a *Macrophomina phaseolina*, agente causal de podredumbre carbonosa. Libro de Resúmenes XVI Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología, p 217.

**De los Santos, B., Barrau, C., Blanco, C., Arroyo, F., Porras, M., Medina, J. J., y Romero, F.** 2003. Relationship between *Trichoderma* soil population and strawberry fruit production in soils previously fumigated. HortScience 7:1400-1402.

**Faedi, W., Mourgues, F., y Rosati, C.** 2002. Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. Acta Hort. 567:51-59.

## Capítulo 4

**Fang, X.L., Phillips, D., Li, H., Sivasithamparam, K., y Barbetti, M.J.** 2011. Comparisons of virulence of pathogens associated with crown and root diseases of strawberry in Western Australia with special reference to the effect of temperature. *Sci. Hort.* 131:39-48.

**Fang, X.L., Phillips, D., Verheyen, G., Li, H., Sivasithamparam, K., y Barbetti, M.J.** 2012. Yields and resistance of strawberry cultivars to crown and root diseases in the field and cultivar responses to pathogens under controlled environmental conditions. *Phytopathologia Mediterranea* 51:69-84.

**Holliday, P., y Punithaligam, E.** 1970. *Macrophomina phaseolina*. Commonwealth Mycological Institute Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, N° 275. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.

**Khan, S.N.** 2007. *Macrophomina phaseolina* as causal agent for charcoal rot of sunflower *Mycopathology* 5:111-118.

**Koike, S.T.** 2008. *Macrophomina* crown rot-possible new production issue for California strawberries. Available online: <http://westernfarmpress.com/vegetables/macrophomina-crown-rot-possible-new-production-issue-for-california-strawberries>.

**Koike, S.T., Kirkpatrick, S.C., y Gordon, T.R.** 2009. *Fusarium* Wilt of Strawberry Caused by *Fusarium oxysporum* in California. *Plant Disease* 93:1077.

**López-Aranda, J.M.** 2008. The cultivation of the strawberry in Huelva. In: de Andalucía J (ed) The strawberry crop at Huelva. Ideas, Exclusivas y Publicidad S.L., Sevilla (Spain), pp 101–174.

**Maas, J.** 1998. Compendium of Strawberry Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.

**Mazzola, M., Zhao, X., y Cohen, M.F.** 2009. Resident biology restricts *Macrophomina phaseolina* in *Brassicaceous* seed meal amended soil. In, Proceedings Annual International Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emission Reduction. San Diego, CA (Nov. 10-13).

**Medina, J.J., Miranda, L., Soria, C., Palencia, P., y López-Aranda, J.M.** 2009. Non-chemical alternatives to methyl bromide for strawberry: biosolarization as a case-study in Huelva. *Acta Hort.* 842:961-964.

**Mertely, J., Seijo, T., y Peres, N.** 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. *Plant Dis.* 89:434.

**Mihail, J.D., y Taylor, S.J.** 1995. Interpreting variability among isolates of *Macrophomina phaseolina* in pathogenicity, pycnidium production, and chlorate utilization. *Canadian Journal of Botany - Revue Canadienne de Botanique* 73:1596-1603

**Papavizas, G., y Klag, N.G.** 1975. Isolation and quantitative determination of *Macrophomina phaseolina* from soil. *Phytopathology* 65:182-187.

## Capítulo 4

**Smith, G.S., y Wyllie, T.D.** 1999. Compendium of Soybean Diseases. 4th ed. The American Phytopathological Society

**Tuite, J.** 1969. Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company. 239pp.

**Whidden, A.** 2013. Florida Expoagro. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

**Yuen, G.Y., Schroth, M.N., Weinhold, A.R., y Hancock, J.G.** 1991. Effects of soil fumigation with methyl bromide and chloropicrin on root health and yield of strawberry. Plant Dis. 75:416:420.

**Zveibil, A., y Freeman, S.** 2005. First report of crown and root rot in strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Israel. Plant Dis. 89:1014.

**Zveibil, A., y Freeman, S.** 2009. Methods for detection of soilborne pathogens affecting strawberry in Israel. Acta Hort. 842:191-194.



**CAPITULO 5**

**EFICACIA DE FUMIGANTES ALTERNATIVOS AL BROMURO DE METILO,  
EN EL CONTROL DE MACROPHOMINA PHASEOLINA,  
EN CULTIVOS DE FRESA EN FLORIDA.**

**5.1. – Resumen.**

El gran valor alcanzado en el cultivo de la fresa, así como la inversión inicial de plásticos, fumigantes para desinfección de suelo, mano de obra para la recolección, plantación, etc. hacen a la fresa, un cultivo de costoso valor económico. En el caso de Florida, se usa un sistema de lomos de cultivos, anual intensivo, con dos hileras de plantación por lomo y al aire libre, sin plástico de cobertura (VanSickle *et al.*, 2009; Peres *et al.*, 2010). El principal problema para este cultivo a nivel mundial, es la aparición de nuevas enfermedades emergentes debido a la prohibición del uso del BM, como principal fumigante de suelo. En el caso de Florida, las dosis de fumigantes alternativos al BM (metam sodio y potasio, dimetil disulfuro, y dicloropropeno), está siendo incrementada año tras año, para una óptima desinfección del suelo. No solo la dosis empleada, sino también diferentes combinaciones o mezclas de fumigantes son usados por agricultores y técnicos, para el control de patógenos de suelo y con ello un aumento en la producción y la calidad de fruto.

El objetivo de este trabajo es la búsqueda de alternativas al BM, comparando la efectividad de quince tratamientos a diferentes dosis y métodos de aplicación además de un testigo sin tratamiento, en el control sobre un suelo artificialmente inoculado con el patógeno *M. phaseolina*, en condiciones de cultivo de una finca comercial situada en Dover (Florida, EEUU), durante dos campañas agrícolas (2012-13 y 2013-14).

Todos los fumigantes consiguieron reducir el porcentaje de mortalidad de plantas y el porcentaje de plantas con podredumbre carbonosa, causada por *M. phaseolina*, excepto Dazitol™ en combinación con Integrate 20™ (21,4 y 11,3%, respectivamente), con valores significativamente no diferentes al testigo sin tratar (25,1 y 15,4%, respectivamente). En el control de bolsas de pienso de mazorca de maíz inoculadas y coronas secas infectadas con *M. phaseolina*, los tratamientos que tuvieron menos eficacia y no consiguieron reducir significativamente respecto a el control, fueron las distintas dosis de la combinación 1,3 Dicloropropeno:Cloropicrina, además del producto Dazitol™ en combinación con Integrate 20™. Además en este trabajo, se comprobó

## Capítulo 5

como el tratamiento con metam potasio (Kpam<sup>®</sup>) y la combinación de dimetil disulfuro y cloropicrina (DMDS RG:PIC RG), no fueron efectivo en los laterales del lomo de cultivo, debido a una mala difusión del fumigante, ya que aunque tuvo una buena desinfestación en las bolsas con pienso de mazorca de maíz inoculadas con *M. phaseolina* enterradas en el centro del lomo, para ambas profundidades, tuvo valores similares al control, en bolsas enterradas alejadas de la cinta de riego donde se aplicó los fumigantes. En los ensayos llevados a cabo, en diferentes tipos de cubierta plástica del lomo, se determinó que el plástico virtualmente impermeable (VIF) resultó más efectivo en el control de esclerocios de *M. phaseolina*, que el plástico de baja densidad (LDPE), incluso usando dosis de la combinación 1,3-dicloropropeno:cloropicrina más elevada en LDPE que para VIF.

### 5.2. - Introducción

#### 5.2.1. – Producción de fresa en Florida (EEUU.).

La producción de Fresa en EEUU fue aproximadamente 1.246.500 toneladas en 2012, un 3% menos que en 2011 (Anónimo, 2012) (Figura 5.1). La producción de fruta, alcanzó su máximo valor económico en 2011, con un total de 2,4 billones de dólares.

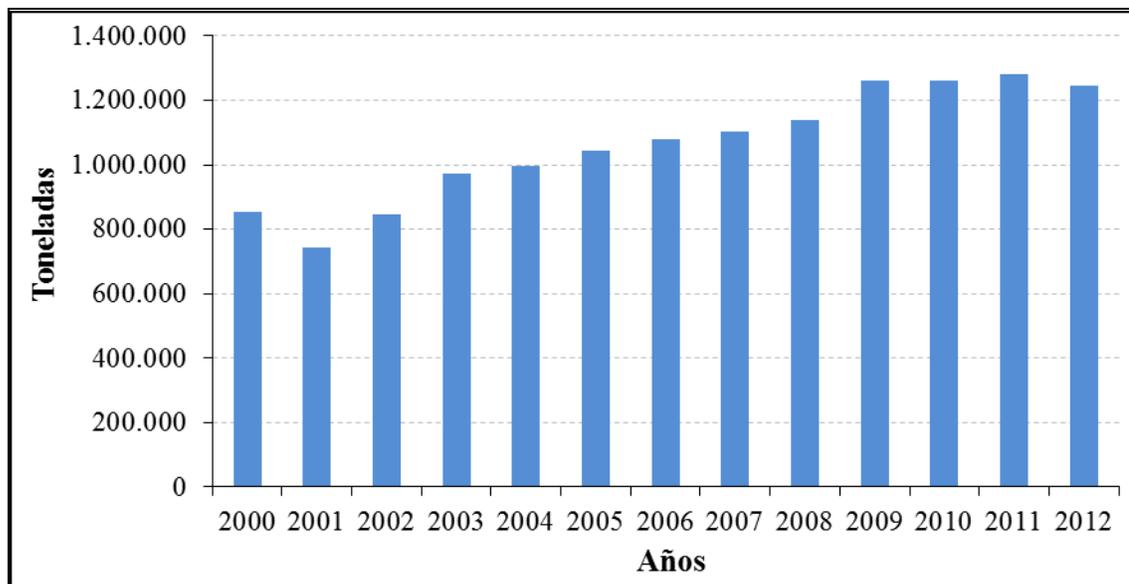
Los tres principales estados productores de fresa en EEUU son; California, Florida y Oregón. La producción en California en 2012 fue de 1.147.500 toneladas, lo que supone el 85% del volumen total. Mientras que en Florida, la producción de la cosecha supone entre un 10-12% del total del cultivo en EEUU, con aproximadamente 107.100 toneladas de fresa en 2012, lo que supuso unos 313 millones de dólares, y una superficie de 3.561 hectáreas en 2009 (Anónimo, 2007 y 2009b). Oregón produjo 7.650 toneladas de fresa en 2012, un 21% menos que 2011, debido a la reducción de superficie cultivada.

Según la Asociación de Productores de Fresas de Florida (FSGA), la superficie cultivada de fresa en 2013 se espera que sea inferior, respecto a los 4.088 ha en 2012 (The Ledger, 2012). Está pequeña reducción se debe principalmente a México, como principal competidor de Florida y al exceso de oferta de fresa, en el mercado.

EEUU se sitúa como el segundo mayor productor, por detrás de China y exportador de fresas, por detrás de España. En 2010, el precio final de las exportaciones alcanzo su nivel máximo con 359,8 millones de dólares (Anónimo, 2014). Aunque, el aumento de la producción y la caída en el precio de la fruta, está causando un pesimismo en la industria, especialmente en Florida, donde la

competencia con México ha demostrado ser devastadora para los productores (Anónimo, 2009 a; Bouffard, 2012)

Figura 5.1. - Producción de fresa en EE.UU, desde 2000-2012. (<http://www.nass.usda.gov>)



### 5.2.2. – Problemas patológicos en campos de fresa de Florida.

Al inicio de cada campaña agrícola se lleva a cabo la aplicación de los fumigantes para la desinfección de suelo, entre dos y cuatro semanas antes de la plantación. El periodo de plantación en Florida empieza a principios de Septiembre hasta finales de Noviembre, utilizando el riego por aspersión y el goteo para ayudar al establecimiento de las plantas, en lomos de cultivo (Price *et al.*, 2007; VanSickle *et al.*, 2009). La recolección de la fruta se realiza cada tres días aproximadamente, desde que la planta empieza a producir a finales de Diciembre (Whidden, 2010).

La universidad de Florida (Gulf coast resear Gulf Coast Research and Education Center) es uno de los principales obtentores de nuevos cultivares de fresa, a nivel mundial. Cultivares como ‘Florida Festival’, ‘Florida Elyana’, ‘Florida Fortuna’, ‘Winterstar’, etc, adaptadas a obtener un óptimo rendimiento en producción y calidad de fruto. Estos nuevos cultivares adaptados a condiciones adversas climáticas, resistentes a ciertos patógenos, etc. no ha solventado el problema debido a la retirada del BM. Entre las principales plagas en Florida, se encuentran, diferentes familias de ácaros; *Tetranychus urticae*, *T. turkestanii* y *T. tumidus*, insectos; *Frankliniella occidentalis*, *Spodoptera frugiperda*, *S. eridania*, *Helicoverpa zea*, Familia *nitidulidae* (Capinera, 2001),

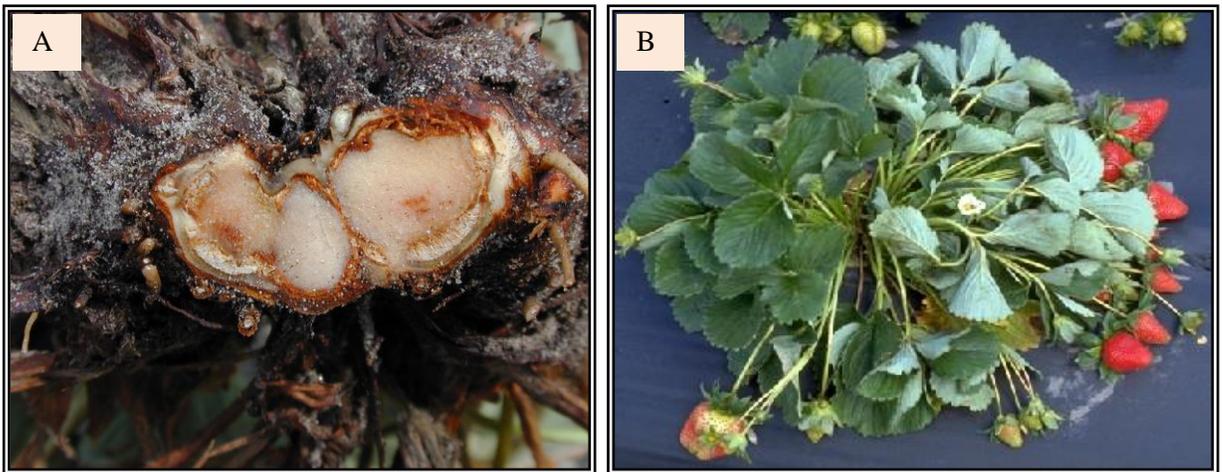
## Capítulo 5

patógenos de suelos como los nematodos; *Meloidogyne hapla*, *Aphelenchoides fragariae*, bacterias; *Xanthomonas fragariae* y hongos fitopatógenos: *Botrytis. cinerea*, *Colletotrichum* spp, *Sphaerotheca macularis*, *Mycosphaerella fragariae*, *Phomopsis obscurans*, *Marssonina fragariae*, *Phytophthora* spp y *Macrophomina phaseolina*, entre otros (Peres, 2006).

Actualmente, no se conocen cultivares resistentes en el caso de la podredumbre carbonosa, causada por *M. phaseolina*, observada por primera vez en cultivo de lomos de fresa no fumigados, en el año 2001 en Florida, (Mertely *et al.*, 2005). Desde la prohibición del BM, la incidencia de esta enfermedad ha extendiéndose en zonas de cultivo de fresa como España, Australia, California y Israel (Avilés *et al.*, 2008; Golzar *et al.*, 2007; Koike, 2008; Zveibil y Freeman, 2005, respectivamente).

*M. phaseolina*, es un patógeno de suelo que causa el decaimiento y la necrosis del tejido vascular de la corona, provocando un colapso y posterior muerte de la planta (Fig. 5.2 A y B).

**Figura 5.2.** – A). Plantas de fresa con vasos necrosados por podredumbre carbonosa. B). Planta de fresa colapsada.



Algunos agricultores han observado pérdidas por muerte de plantas debido a esta enfermedad de entre un 45 a 75% del total de la producción (Peres *et al.*, 2010). Cortes en coronas enfermas, se puede apreciar un color de marrón oscuro a anaranjado en los vasos vasculares de la corona y tejidos corticales (Mehan y McDonald, 1997; Mertely *et al.*, 2005), además, puede provocar necrosis en las raíces (Ashraf y Javaid, 2007). Noling y colaboradores (2013), determinaron una tabla con la dosis máxima de los actuales fumigantes alternativos al BM, en los que se muestra el

Capítulo 5

control que ejercen sobre las enfermedades, nematodos y malas hierbas, más comunes en el cultivo de la fresa (Tabla 5.1.).

**Tabla 5.1.** – Fumigantes químicos alternativos al Bromuro de metilo en el control de patógenos y malas hierbas, en Florida.

Fumigante	Dosis máxima	Control		
		Nematodos	Hongos	Malas hierbas
<b>Bromuro de Metilo 50/50</b>	350 lb	Bueno a	Excelente	Medio a
		Excelente		Excelente
<b>Cloropirina</b>	300 lb	Ninguno a	Excelente	Pobre
		Pobre		
<b>Ioduro de metilo</b>	350 lb	Bueno a	Bueno a	Bueno a
		Excelente	Excelente	Excelente
<b>Metam sodio</b>	75 gal	Inconsistente	Inconsistente	Inconsistente
<b>Telone II</b>	18 gal	Bueno a	Ninguno a	Pobre
		Excelente	Pobre	
<b>Telone C17</b>	26 gal	Bueno a	Bueno	Pobre
		Excelente		
<b>Telone C35</b>	35 gal	Bueno a	Bueno a	Medio a Pobre
		Excelente	Excelente	
<b>Cloropirina y 1,3 Dicloropropeno 40/60</b>	300 lb	Bueno a	Bueno a	Medio a Pobre
		Excelente	Excelente	
<b>Metam potasio</b>	60 gal	Inconsistente	Inconsistente	Inconsistente
<b>Dimetil disulfuro</b>	60 gal	Bueno a	Bueno a	Pobre a
		Excelente	Excelente	Excelente

“gal” = galones. “lb” = libras.

### 5.3. – *Materiales y métodos.*

#### 5.3.1. - *Diseño experimental y descripción de los tratamientos.*

En las campañas agrícolas de 2012-13 y 2013-14, se llevaron a cabo ensayos para determinar la eficacia de distintos tratamientos, en la búsqueda de alternativas al BM. Los experimentos se realizaron en una finca colaboradora de la Universidad de Florida situada en Dover.

El diseño experimental de las parcelas fue de bloques al azar con tres repeticiones con dos lomos para cada tratamiento. Se aplicaron doce tratamientos durante la campaña agrícola 2012-13 y once tratamientos en 2013-14, además de un testigo para ambas campañas. En cada lomo se plantaron, 392 plantas del cultivar ‘Florida Festival’, lo que supone un total de 784 plantas por tratamiento y repetición. El manejo de cultivo fue común, al realizado en fincas comerciales de cultivo de fresa al aire libre, durante las dos campañas agrícolas del ensayo (Strand, 2008). Los tratamientos aplicados durante las dos campañas agrícolas se muestran en la Tabla 5.2.

#### 5.3.2. – *Efecto de los fumigantes en bolsas con mazorca de maíz y coronas infectadas con M. phaseolina.*

Para llevar a cabo la determinación sobre la efectividad de los tratamientos sobre *M. phaseolina*, se realizó una infestación de *M. phaseolina*, en pienso de mazorca de maíz (Kay-kob<sup>®</sup>) y coronas de fresa secas infestadas con *M. phaseolina* de campañas anteriores. El pienso de mazorca de maíz fue previamente esterilizado y posteriormente inoculado con trozos de *M. phaseolina*, crecida en condiciones óptimas y medio de cultivo de PDA (Campbell y van der Gaag, 1993; Dhingra y Sinclair, 1977). El pienso de mazorca de maíz permaneció con las condiciones de humedad propias de la esterilización en cámara de cultivo a 30°C y oscuridad, durante aproximadamente una semana, con agitación diaria de los botes (para asegurar que todo el pienso de mazorca de maíz fuese infestado con el patógeno). A continuación, con una probeta se midieron 3mL de pienso de mazorca de maíz infestada con *M. phaseolina*, y se colocaron en pequeñas bolsas de nylon (Figura 5.3). En los lomos de cultivo del ensayo, se realizaron varios agujeros a distintas profundidades 3 y 7 pulgadas (7,6 y 20,3cm) con una sonda calibrada, donde posteriormente se colocaron las coronas secas de fresa y las bolsas de pienso de mazorca de maíz infestadas con *M. phaseolina*, procediendo al enterrado y tapado de los agujeros con plástico negro de cubierta, hasta la posterior aplicación de los tratamientos en riego por goteo y/o inyección a lomo.

**Tabla 5.2.** – Aplicaciones de diferentes fumigantes durante dos campañas agrícolas, en una finca en Brandon, (Florida).

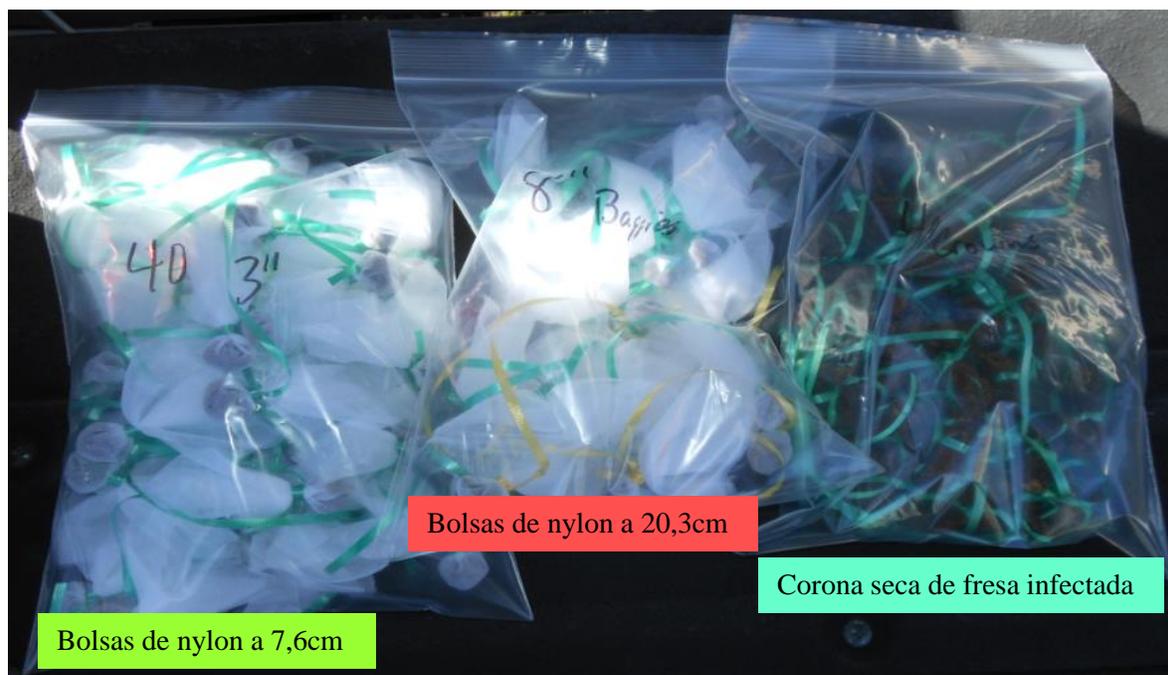
Tratamientos	Descripción	Dosis		Tipo de plástico	Métodos de aplicación
		2012-13	2013-14		
<b>BM:PIC DA</b>	bromuro de metilo:cloropicrina	67/33 (350 lb/ta)	----	VIF	Inyección en lomo
<b>BM:PIC DB</b>	bromuro de metilo:cloropicrina	----	67/33 (218 lb/ta)	VIF	Inyección en lomo
<b>BM:PIC DM</b>	bromuro de metilo:cloropicrina	50/50 (320 lb/ta)	50/50 (320 lb/ta)	VIF	Inyección en lomo
<b>TEL DA</b>	1,3-dicloropropeno:cloropicrina	35 gpta	35 gpta	LDPE	Inyección en lomo
<b>TEL DB</b>	1,3-dicloropropeno:cloropicrina	30 gpta	----	VIF	Inyección en lomo
<b>DMDS:PIC DB</b>	dimetil disulfuro:cloropicrina	45 gpta	----	VIF	Inyección en lomo
<b>DMDS:PIC DA</b>	dimetil disulfuro:cloropicrina	60 gpta	60 gpta	VIF	Inyección en lomo
<b>DMDS RG:VAPAM</b>	dimetil disulfuro:metam sodio	----	50:75 gpta	VIF	Riego por goteo
<b>TRIFECTA IN</b>	dimetil disulfuro:cloropicrina:1,3-dicloropropeno	400 lb/ta	400 lb/ta	VIF	Inyección en lomo
<b>1,3 D DA:PIC</b>	1,3-dicloropropeno:cloropicrina	300 lb/ta	300 lb/ta	LDPE	Inyección en lomo
<b>1,3 D DB:PIC</b>	1,3-dicloropropeno:cloropicrina	250 lb/ta	----	VIF	Inyección en lomo
<b>KPAM</b>	Metam potasio	60 gpta	60 gpta	LDPE	Riego por goteo
<b>VAPAM</b>	Metam sodio	75 gpta	75 gpta	LDPE	Riego por goteo
<b>DAZ:INT</b>	Alil isocianato:surfactante	----	6,25 gpta	LDPE	Riego por goteo
<b>DMDS RG:PIC RG</b>	dimetil disulfuro:cloropicrina	60 gpta	60 gpta	VIF	Riego por goteo
<b>UC</b>	Control no tratado	----	----	LDPE	----

“gpta” = galones por acre fumigada. “lb/ta” = libras/acre fumigado, “LDPE” = Plástico de baja densidad, “VIF” = Plástico virtualmente impermeable.

## Capítulo 5

En la campaña 2012-13, se realizaron tres agujeros junto a la cinta de riego, y uno extra durante la campaña 2013-14, se hizo un agujero extra en el lateral del lomo, para detectar posibles diferencias en la dispersión de los fumigantes aplicados en riegos por goteo, en el control del patógeno *M. phaseolina* (Figura 5.4). En los 3 agujeros centrales de cada lomo, se procedió al enterrado de las bolsas de nylon con mazorca de maíz a profundidades de 7,6 y 20,3cm, y de dos coronas secas de fresas a 7,6cm, infectadas con *M. phaseolina*. En el agujero del lateral del lomo se procedió al enterrado de la bolsa de nylon con *M. phaseolina* a 7,6cm de profundidad. Las bolsas de nylon y las coronas secas de fresa, fueron extraídas de los lomos previamente a la plantación y 4 semanas después de la aplicación de los tratamientos. Las muestras fueron conservadas en bolsa de papel, para su secado a temperatura ambiente, hasta aproximadamente un mes, cuándo se llevó a cabo el procesamiento de las muestras.

**Figura 5.3.** – Bolsas de nylon con mazorca de maíz y coronas secas de fresas infectadas con *M. phaseolina*.



**Figura 5.4.-** Lomo de fresa con 4 agujeros para la colocación de las bolsas de pienso con mazorcas de maíz y coronas infectadas con *M. phaseolina*, a distintas profundidades durante la campaña 2013-14.



### 5.3.3. – Procesamiento de bolsas con mazorca de maíz y coronas infectadas con *M. phaseolina*.

Una vez que los fumigantes fueron aplicados a las bolas de mazorca de maíz inoculadas y las coronas secas infectadas, previamente enterradas en suelo, se procedió a la recogida de las muestras y al secado de las mismas. El procedimiento seguido para las bolsas de nylon con 3ml de pienso de mazorca de maíz, inoculadas con *M. phaseolina*, se desinfectaron en un tubo de falcon de 50ml, añadiendo 40ml de lejía a 0,5 NaOCl (83 mL al 6% de NaOCl en 1l de H<sub>2</sub>O) durante 3 min, en agitación periódica y se vertió su contenido a un tamiz con luz de malla de 45µm, donde los microesclerocios quedarían retenidos (> 50 × 50µm), lavándose con agua estéril destilada para eliminar restos de lejía. El pienso de mazorca de maíz infestado con *M. phaseolina*, fue recogido en un vaso de precipitado con una espátula, usándose 10ml de H<sub>2</sub>O<sub>e</sub> para su traspaso desde el tamiz. A continuación, se rellenó hasta 50ml con medio de cultivo semi-selectivo RB (Tabla 5.3), al vaso de precipitado y en continua agitación se vertió sobre placas Petri de 100mm. En las muestras ensayadas en 2012-13, se realizó una dilución al 4%, mientras que, en las muestras tomadas en la

## Capítulo 5

campana 2013-14 se realizaron diluciones 1:10 y 1:100, además de la concentración original en ambas campañas. Se usaron 3 réplicas por concentración original o dilución. A continuación, las placas se incubaron a 30°C en condiciones de oscuridad entre 4 – 7 días. Las colonias desarrolladas se observaron mediante microscopía, para determinar su coincidencia con las características de *M. phaseolina* (Zveibil y Freeman, 2009).

Para el procesado de las coronas secas de fresas infectadas con *M. phaseolina*, se trituraron en una batidora de café las dos coronas para cada repetición y tratamiento, pesándose entre 2 – 8g. Posteriormente, el procedimiento y diluciones, fueron los mismos indicados anteriormente.

**Tabla 5.3.-** Composición del medio de cultivo RB en 1l de agua destilada estéril.

<b>Producto</b>	<b>Dosis (g)</b>	<b>Producto</b>	<b>Dosis (ml)</b>
Patata Dextrosa Agar (PDA)	39,0	Ridomil gold	1,0
Rifampicina	0,1	Tergitol	0,5
Carbonato Sódico*	1,0		

\*Disuelto en 2ml de etanol con agitación.

### 5.3.4. - Determinación de la incidencia de podredumbre carbonosa en campo.

En Dover durante la campaña agrícola 2013-14, se llevó a cabo el estudio de la incidencia de podredumbre carbonosa, causada por *M. phaseolina*, mediante el registro de plantas muertas de cada tratamiento y su posterior diagnóstico en el laboratorio. Esto se realizó, desde el inicio de la aparición de los primeros síntomas y plantas muertas, hasta la finalización de la campaña agrícola (17 de Abril de 2014). Por cada tratamiento se recogieron 6 plantas en total (una planta por lomo y repetición), de las cuales 3 de ellas tuvieron síntomas de marchitamiento (wilt) y las otras 3 fueron plantas muertas. A las plantas muertas o marchitadas recogidas se le extrajo la parte aérea y se lavó la corona y raíces con agua corriente de grifo, para el análisis de estos tejidos por separado. Tanto la raíz como la corona, se desinfectaron en superficie durante 2 minutos en una solución acuosa al 1% de NaClO y posteriormente, se enjuagó dos veces con agua destilada estéril, dejándose secar en una campana de flujo laminar, para posterior siembra en medio de cultivo no selectivo de GI (17g agar, 12g patata dextrosa en caldo (PDB), 0,1g estreptomina y 0,25g ampicilina). Las placas se incubaron a 27°C, en condiciones de oscuridad durante 7 días, y luego las colonias de *M. phaseolina*

## Capítulo 5

se inspeccionaron microscópicamente, para caracterizarlas morfológicamente (Dhingra y Sinclair, 1975; Zveibil y Freeman, 2009).

### 5.3.5. - *Análisis estadístico.*

La incidencia de la podredumbre carbonosa, se expresó como porcentaje acumulado de plantas muertas o enfermas. Los datos de porcentaje, se transformaron mediante la raíz cuadrada antes del análisis de la varianza. Los datos representados de los esclerocios viables por bolsa y en corona seca de fresa, infectada con *M. phaseolina*, son los valores de tres repeticiones por tratamiento y tres repicas por muestras, los datos se transformaron mediante la raíz cuadrada. Cuando el estadístico F de ANOVA, fue significativo a  $P < 0,05$ , las medias se compararon con la prueba de mínima diferencia significativa de Fischer, en un nivel de significación del 5% (De los Santos *et al.*, 2003). Para los análisis estadísticos de datos, se utilizó el programa “SAS analysis”.

## 5.4. – *Resultados.*

### 5.4.1. - *Efecto de los fumigantes en bolsas con mazorca de maíz inoculadas y coronas de fresa infectadas con M. phaseolina.*

Durante la campaña 2012-13, los tratamientos contra la viabilidad de los esclerocios de las bolsas de nylon con mazorca de maíz infestada de *M. phaseolina*, obtuvo los valores medios máximos en lomos del control no tratado (UC), con niveles entre 1.310 – 2.637 esclerocios/bolsa en profundidades de 7,6 y 20,3cm, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas en todos los tratamientos, excepto en las combinaciones de 1,3 dicloropropeno:cloropicrina a las dosis de 300lbs y 250lbs (PIC:1,3 D DA y DB), resultando los menos eficaces en ambas profundidades. La determinación de los esclerocios viables en las coronas infectadas de *M. phaseolina*, resultó similar al de las bolsas de nylon con pienso de mazorca de maíz, resultando los tratamientos menos efectivos las combinaciones de 1,3 Dicloropropeno y cloropicrina a las dosis altas y bajas (1,3 D DA:PIC y 1,3 D DB), además de la aplicación con Telone C35<sup>®</sup> a dosis de 35gal (TEL DA), que tuvieron resultados parecidos al control (Tabla 5.4).

Durante la campaña 2013-14, se modificaron algunos de los tratamientos, además de la realización de un nuevo agujero en el lateral del lomo, para el enterrado a 7,6cm de una bolsa con pienso de mazorca de maíz, infestada con *M. phaseolina*, alejada de la cinta de riego. El tratamiento con los valores medios máximos, se produjo en las bolsas de nylon con UC, enterradas en el lateral del lomo, alcanzando los 4.879 esclerocios viables/bolsa. El tratamiento con la combinación de

## Capítulo 5

Dazitol™ y el producto Integrate 20™ (DAZ:INT), tuvo un comportamiento similar al control en todas las muestras y resultó el menos eficaz de todos los tratamientos aplicados. La mayoría de tratamientos a distintas profundidades, obtuvieron buenos resultados y mostraron cierta efectividad en el control de *M. phaseolina* (Figura 5.5). Sin embargo, en las muestras enterradas en el lateral de los lomos, hubo fumigantes con una mala difusión y por tanto no fueron efectivos contra los esclerocios de *M. phaseolina*, como es el caso de la combinación de dimetil disulfuro y cloropicrina (DMDS RG:PIC RG), que obtuvo los valores más elevados de todo el ensayo (6.077 esclerocios/bolsa) y la aplicación con metam potasio (KPAM) (1.334 esclerocios/bolsa), ambos aplicados mediante riego por goteo (Figura 5.6). En la viabilidad de esclerocios encontrados en las coronas secas de fresa infectadas por *M. phaseolina*, el único tratamiento que no resultó ser efectivo fue 1,3 D DA:PIC, no siendo significativamente diferente a UC (897 y 1.052 esclerocios/g de corona, respectivamente) (Tabla 5.4).

**Tabla 5.4.** – Efecto de los fumigantes, en la viabilidad de esclerocios en mazorca de maíz y coronas secas de fresa, infectadas con *M. phaseolina*, en una finca en Brandon (Florida), durante 2012-13 y 2013-14.

Tratamientos <sup>y</sup>	2012-13			2013-14			
	Esclerocios viables/bolsa 7,6cm	Esclerocios viables/bolsa 20,3cm	Esclerocios viables/g de corona 7,6cm	Esclerocios viables/bolsa 7,6cm centro	Esclerocios viables/bolsa 20,cm centro	Esclerocios viables/bolsa 7,6cm lateral	Esclerocios viables/g de corona 7,6cm
<b>BM:PIC DA</b>	5 d <sup>x</sup>	4 b	2 e	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>BM:PIC DB</b>	n.a.	n.a.	n.a.	6 d	4 c	6 c	2 b
<b>BM:PIC MD</b>	1 d	9 b	n.a.	1 d	1 c	15 c	1 b
<b>TEL DA</b>	262 cd	11 b	558 ab	7 d	1 c	2 c	332 b
<b>TEL DB</b>	8 d	1 b	120 de	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>DMDS:PIC DB</b>	4 d	3 b	6 e	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>DMDS:PIC DA</b>	4 d	5 b	1 e	295 d	1.250 b	927 c	165 b
<b>DMDS RG:VAPAM</b>	n.a.	n.a.	n.a.	11 d	2 c	2 c	11 b
<b>TRIFECTA IN</b>	31 d	10 b	90 de	18 d	7 c	4 c	6 b
<b>1,3 D DA:PIC</b>	1.037 ab	1.883 a	734 a	1.657 c	160 c	1.165 bc	897 a
<b>1,3 D DB: PIC</b>	696 bc	2.635 a	481 bc	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Continuación Tabla 5.4.

Tratamientos <sup>y</sup>	2012-13			2013-14			
	Esclerocios viables/bolsa 7,6cm	Esclerocios viables/bolsa 20,3cm	Esclerocios viables/g de corona 7,6cm	Esclerocios viables/bolsa 7,6cm centro	Esclerocios viables/bolsa 20,3cm centro	Esclerocios viables/bolsa 7,6cm lateral	Esclerocios viables/g de corona 7,6cm
<b>KPAM</b>	2 d	1 b	1 e	11 d	1 c	1.334 bc	2 b
<b>VAPAM</b>	2 d	2 b	4 e	3 d	4 c	4 c	1 b
<b>DAZ:INT</b>	n.a.	n.a.	n.a.	3.705 a	2.996 a	4.879 a	336 b
<b>DMDS RG:PIC RG</b>	2 d	1 b	11 e	31 d	2 c	6.077 a	23 b
<b>UC</b>	1.310 a	2.637 a	268 cd	2.753 b	2.996 a	2.941 b	1.052 a

<sup>x</sup> Esclerocios viables aisladas en medio de cultivo RB, de *M. phaseolina*. Cada valor es la media de tres repeticiones/tratamiento y tres repicas por muestra. Los valores seguidos por la misma letra en una columna no difieren significativamente, según la prueba MDS ( $P < 0,005$ ) (datos transformados mediante raíz cuadrada). Se presentan los datos no transformados. “n.a”.= no aplicado. <sup>y</sup> Los detalles de los tratamientos se describen en la Tabla 5.2.

Figura 5.5. – Efecto de dos fumigantes, en la viabilidad de esclerocios en mazorca de maíz, infestadas con *M. phaseolina*, en diferentes profundidades y diluciones.

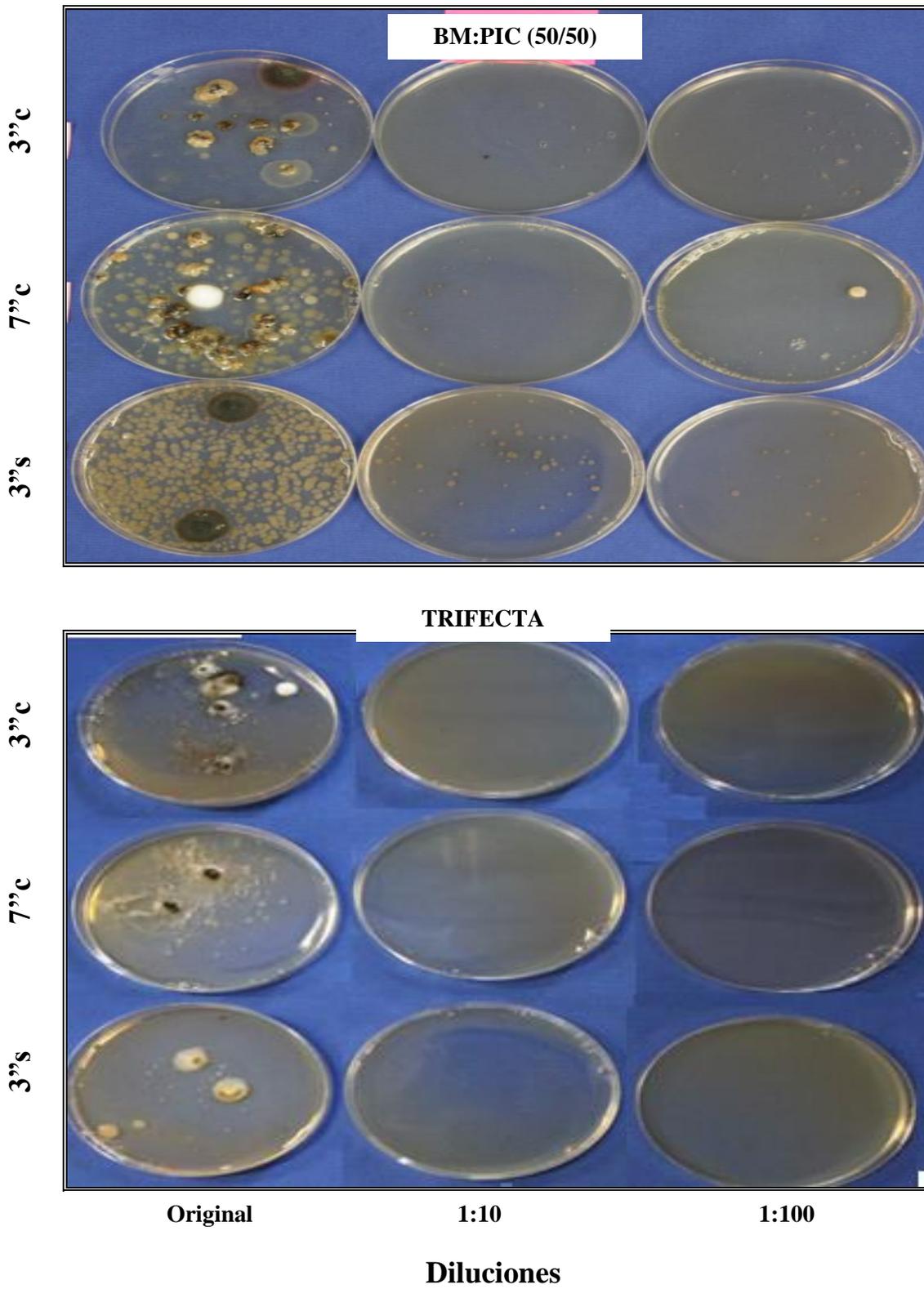
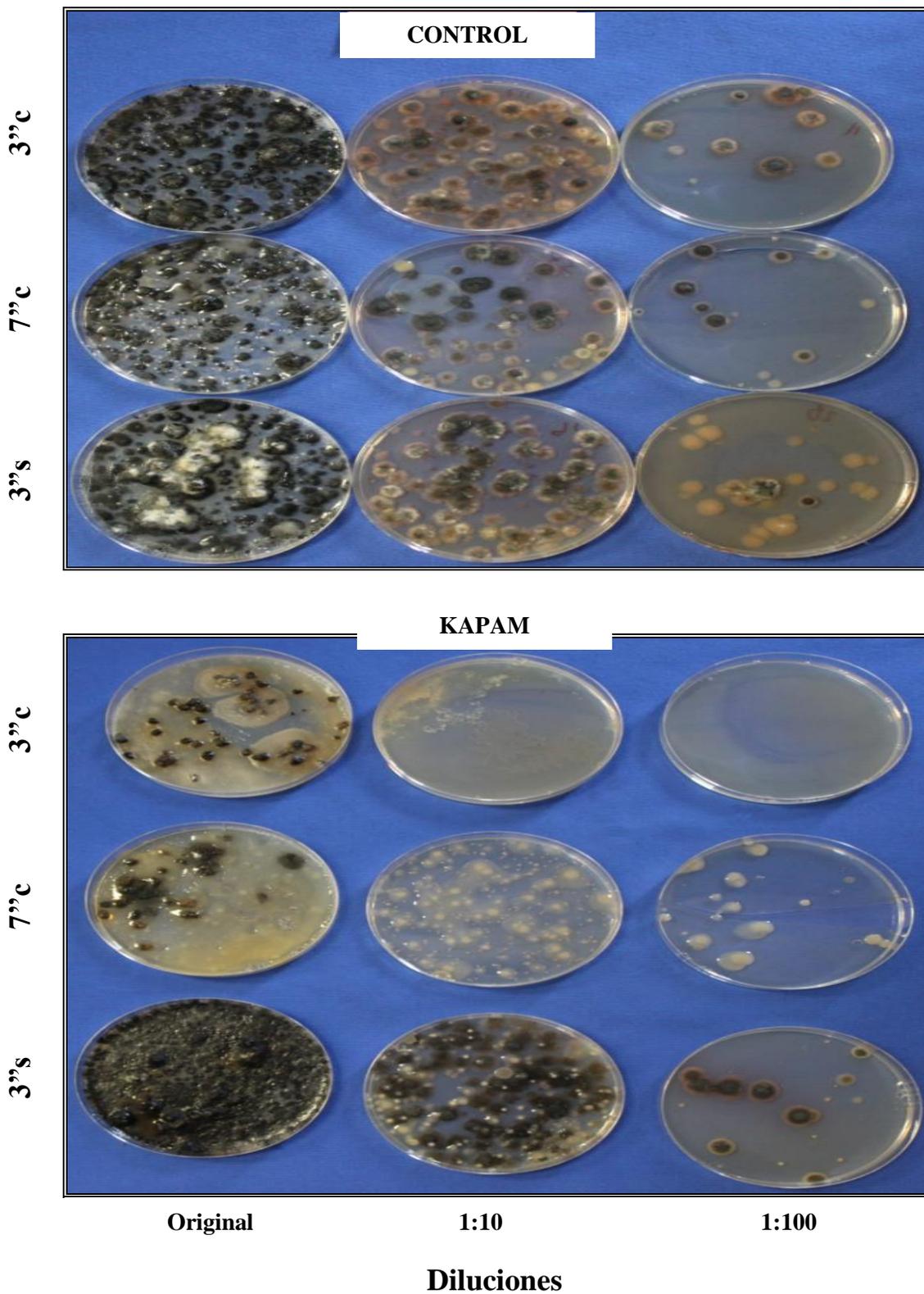


Figura 5.6. – Efecto de un fumigante y un control, en la viabilidad de esclerocios en mazorca de maíz, infestadas con *M. phaseolina*, en diferentes profundidades y diluciones.



## Capítulo 5

### 5.4.2. - Efecto de los fumigantes en la incidencia de podredumbre carbonosa, en la campaña 2013-14.

La efectividad de los tratamientos aplicados para el control en la mortalidad de plantas (PM%) y las coronas con podredumbre carbonosa, durante la campaña 2013-14, tuvo valores máximos las parcelas control (UC), con 25,1% de plantas muertas al finalizar la campaña, de las cuales se aisló *M. phaseolina* (PMCR%), en el 15,4% del total. El tratamiento con Dazitol™ en combinación con Integrate 20™ (DAZ:INT), tuvo valores similares tanto en PM%, como en PMCR% (21,4 y 11,3%, respectivamente), no obteniendo diferencias significativas con UC. Los 10 tratamientos aplicados restantes, fueron eficaces en el control de PM% y PMCR%, aunque en todos los tratamientos aplicados se produjo mortalidad, todos tuvieron valores significativamente menores en comparación con las parcelas control, observándose en la aplicación 1,3-dicloropropeno y cloropicrina en inyección a lomo (1,3 D DA:PIC), los valores máximos de mortalidad (3,2%). La menor mortalidad e incidencia de podredumbre carbonosa, se detectó en parcelas tratadas con la combinación de dimetil disulfuro y metam sodio aplicados en riego por goteo (DMDS RG:VAPAM) (1,0% y 0,1%, respectivamente) (Tabla 5.5.).

**Tabla 5.5.** – Efecto de los fumigantes en el porcentaje de plantas muertas (PM%) y el porcentaje de incidencia de podredumbre carbonosa causada por *M. phaseolina* (PMCR%), en una finca en Brandon (Florida), durante 2013-14.

Tratamientos	Descripción	2013-14		Tipos de plástico	Dosis	Métodos de aplicación
		PM% <sup>x</sup>	PMCR% <sup>x</sup>			
<b>BM:PIC DB</b>	bromuro de metilo:cloropicrina	2,1 bc	0,9 b	VIF	218 lb/ta (67/33)	Inyección en lomo
<b>BM:PIC DM</b>	bromuro de metilo:cloropicrina	1,3 c	0,2 b	VIF	320 lb/ta (50/50)	Inyección en lomo
<b>TEL DA</b>	1,3-dicloropropeno:cloropicrina	2,3 bc	1,0 b	LDPE	320 lb/ta (50/50)	Inyección en lomo
<b>DMDS:PIC DA</b>	dimetil disulfuro:cloropicrina	1,9 bc	0,4 b	VIF	60 gpta	Inyección en lomo
<b>DMDS RG:VAPAM</b>	dimetil disulfuro:metam sodio	1,0 c	0,1 b	VIF	50:75 gpta	Riego por goteo
<b>TRIFECTA IN</b>	dimetil disulfuro:1,3-dicloropropeno:cloropicrina:	1,7 bc	0,3 b	VIF	400 lb/ta	Inyección en lomo
<b>1,3 D DA:PIC</b>	1,3-dicloropropeno:cloropicrina	3,2 b	1,0 b	LDPE	300 lb/ta	Inyección en lomo
<b>KPAM</b>	Metam potasio	2,6 b	1,0 b	LDPE	60 gpta	Riego por goteo
<b>VAPAM</b>	Metam sodio	2,1 bc	0,9 b	LDPE	75 gpta	Riego por goteo
<b>DAZ:INT</b>	Alil isocianato:surfactante	21,4 a	11,3 a	LDPE	6,25 gpta	Riego por goteo
<b>DMDS RG:PIC RG</b>	dimetil disulfuro:cloropicrina	2,0 bc	0,9 b	VIF	60 gpta	Riego por goteo
<b>UC</b>	Control no tratado	25,1 a	15,4 a	LDPE	n.a.	n.a.

<sup>x</sup> Cada valor es la media de cuatro repeticiones/tratamiento. Los valores seguidos por la misma letra en una columna no difieren significativamente según la prueba MDS ( $P < 0,05$ ) (datos transformados mediante raíz cuadrada). Se presentan los datos no transformados. “n.a.” = no aplicado

**5.5. – Discusión.**

Durante las campañas agrícolas 2012-13 y 2013-14, se llevaron a cabo un total de 15 tratamientos a diferentes dosis, métodos de aplicación y cubiertas plásticas en lomo, además de un testigo no tratado. De los tratamientos aplicados en inyección a lomo, la combinación de bromuro de metilo con cloropicrina a las tres dosis, fueron siempre efectivas, en el control de *M. phaseolina*, en ambas profundidades (BM:PIC DA, DM y DB). El tratamiento con el producto TRIFECTA® IN fue efectivo en ambas campañas agrícolas, tanto en bolsas de pienso con mazorca de maíz como en corona seca de fresa, infectada con *M. phaseolina*. Entre los tratamientos más efectivos durante la campaña 2012-13, fueron las aplicaciones de dimetil disulfuro en combinación con cloropicrina en ambas dosis (DMDS:PIC DA y DB). Sin embargo, el tratamiento TEL DB fue efectivo en la erradicación de esclerocios en bolsas con pienso de mazorca de maíz inoculada, no obtuvo buenos resultados en las coronas infectadas de fresa.

De los tratamientos aplicados en riego por goteo, VAPAM fue el más efectivo durante las dos campañas agrícolas, que junto con el tratamiento DMDS RG:VAPAM (2013-14), consiguieron reducir de manera significativa las poblaciones de esclerocios en las bolsas de nylon con pienso de mazorca de maíz y coronas secas de fresa, a diferentes profundidades tanto en la parte central del lomo como en el lateral. Por el contrario, los tratamientos de KAPAM, y DMDS RG:PIC RG, fueron efectivos a distintas profundidades en los tres agujeros de la parte central del lomo, mientras que, no fueron eficaces en las bolsas de pienso de mazorca de maíz inoculadas, enterradas a 7,6cm en el lateral del lomo y más alejadas de la cinta de riego. Por lo que este estudio reveló que la difusión de los tratamientos de KAPAM, y DMDS RG:PIC RG, en aplicaciones de riego por goteo no resultó efectiva en la erradicación de esclerocios de *M. phaseolina*.

Durante las dos campañas agrícolas de estudio, el tratamiento estándar de dicloropropeno más cloropicrina no tuvo una buena eficacia, en el control de *M. phaseolina*, para ninguna de las dosis aplicadas (1,3 D DA:PIC 2012-13 y 2013-14 y 1,3 D DB:PIC 2012-13). La combinación de Dazitol™ con Integrate 20™ (DAZ:INT 2013-14), obtuvo malos resultados en todas las profundidades y métodos de inoculación en el control de *M. phaseolina*.

De acuerdo con estos estudios, Zveibil y colaboradores (2012), realizaron ensayos con coronas de fresa infectada por *M. phaseolina* a 30cm de profundidad, con aplicaciones de Cloropicrina a diferentes dosis (180 y 360 lb/a), obteniendo resultados ineficaces en la reducción del porcentaje de esclerocios y no encontrando diferencias significativas al control. Sin embargo, en aplicaciones de metam sodio a distintas dosis (40 y 70lb/a), obtuvieron los mejores resultados en erradicación de esclerocios de *M. phaseolina*, ya que encontraron diferencias

## Capítulo 5

significativas al control. En nuestros ensayos, el metam sodio (VAPAM) también obtuvo buenos resultados en el control de la enfermedad de podredumbre carbonosa y en la erradicación de esclerocios de *M. phaseolina*.

Los diferentes plásticos para la cubierta de lomos usadas para estos ensayos, se realizó debido a la pérdida por difusión del fumigante después de su aplicación, ya que el plástico estándar (LDPE), tiene una alta permeabilidad. En este ámbito la industria provee al sector fresero de nuevos plásticos más impermeables, entre ellos: SIF (Semi-impermeable), VIF (Virtualmente impermeable), TIF (Totalmente impermeable), EVOH (etileno vinilo alcohol) (Noling *et al.*, 2013). Nuestros trabajos realizados con distintos plásticos de cobertura del lomo, fueron encaminados a comprobar la eficacia contra la viabilidad de los esclerocios de *M. phaseolina*, después de la aplicación del fumigante, en la finca de Dover. En la campaña 2012-13, se aplicó el tratamiento estándar (1,3 D:PIC), y Telone C35<sup>®</sup>, ambos con aplicación en inyección a lomo, a diferentes dosis, en las aplicaciones de dosis alta el lomo fue cubierto con plástico LDPE y las aplicaciones a dosis bajas con plástico VIF (300 y 250lbs/ta para 1,3 D:PIC, y 35 y 30gpta para el Telone C35<sup>®</sup>). Estos ensayos determinaron, que el plástico VIF resultó más efectivo que el LDPE, en la erradicación de esclerocios de *M. phaseolina*, incluso cuando en lomos con LDPE se aplicaron dosis del fumigante más elevada que para VIF.

Benlioğlu y colaboradores (2014), determinó que aplicaciones de metam sodio (100ml/m<sup>2</sup>) mejoró significativamente las producciones de fresa entre 18,5 – 21,6% y 14,5 – 18,5%, para LDPE y VIF, respectivamente. Sin embargo, estos mismos autores determinaron que la fruta de fresa comercial, no mejoró con ningún otro fumigante aplicado, incluyendo la práctica de la solarización.

Zveibil y colaboradores (2012), observó que la erradicación de poblaciones remanentes de *M. phaseolina* en suelo, puede depender de la proveniencia del inóculo, así, los microesclerocios de suelo, podrían ser más susceptibles a los efectos de fungicidas y la solarización, que los que han infectado tejidos de plantas como estolones o coronas de fresa. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, indican que en el caso de Telone C35<sup>®</sup> aplicado a diferentes dosis (TEL DA y TEL DB), funciona bien contra bolas de pienso de mazorca de maíz infestada con *M. phaseolina*, pero no contra los esclerocios de las corona seca de fresa, algo parecido ocurrió con la fumigación de Trifecta<sup>®</sup>, aunque los resultados no fueron tan evidente como con la aplicación del fumigante Telone C35<sup>®</sup>. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Hutton y colaboradores (2013), que mostró en algunos fumigantes de suelo, diferente rango en la capacidad para erradicar los microesclerocios de *M. phaseolina*, en suelos de cultivo de fresa intensivo. Sin embargo, otros estudios previos en suelo fumigados con BM,

## Capítulo 5

demonstró que las coronas enterradas infectadas con *M. phaseolina*, fue el único capaz de erradicar en su totalidad los microsclerocios (Hutton, 2010).

Todo esto señala, la importancia que tiene para los agricultores y técnicos, la eliminación de los residuos y restos de fresas infectados de los campos de fresa campaña tras campaña (Hutton *et al.* 2013).

Por último, en la última campaña agrícola 2013-14, se registró la mortalidad de plantas de fresa y se determinó el porcentaje de corona con podredumbre carbonosa de un total de 11 tratamientos fumigantes aplicados y un control. Todos los tratamientos y formas de aplicación resultaron efectivos contra la mortalidad y el control de podredumbre carbonosa causada por *M. phaseolina*, excepto el tratamiento con alil isocianato (Dazitol™) en combinación con un surfactante (Integrate 20™), que tuvo valores de PM y PMCR, no diferentes significativamente y por tanto similares a los obtenidos en las parcelas control.

### 5.6. – Bibliografía.

**Anónimo.** 2007. U.S. Dept. of Agriculture/National Agricultural Statistics Service. 2009. 2007 Census of Agriculture: National, State and County Tables. U.S. Dept. of Agriculture/National Agricultural Statistics Service.

**Anónimo.** 2009a. IBIS World Industry Report, Fruit & Tree Farming in the US, January, 2009 International Group, Ltd., Fruit - U.S., February 2009.

**Anónimo.** 2009b. U.S. Dept. of Agriculture/National Agricultural Statistics Service. 2009. Vegetable Summary 2009. National Agricultural Statistics Service. U.S. Dept. of Agriculture/National Agricultural Statistics Service.

**Anónimo.** 2012. <http://www.nass.usda.gov/>

**Anónimo.** 2014. <http://www.statista.com/statistics/194235/top-10-strawberry-producing-us-states/>

**Ashraf, H., y Javaid, A.** 2007. Evaluation of antifungal activity of *Meliaceae* family against *Macrophomina phaseolina*. Mycopathology 2:81-84.

**Avilés, M., Castillo, S., Bascon, J., Zea-Bonilla, T., Martín-Sánchez, P.M., y Pérez-Jiménez, R.M.** 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. Plant Pathol. 57:382.

**Benlioğlu, S., Yildiz, A., Boz, Ö., y Benlioğlu, K.** 2014. Soil disinfestation options in Aydın province, Turkey, strawberry cultivation. Phytoparasitica 42:397-403

**Bouffard, K.** 2012. "Florida Strawberry Farmers Face Increasing Competition from Mexico." The Ledger, Aug 25, 2012.

**Capinera, J.L.** 2001. *Handbook of Vegetable Pests*. Academic Press, San Diego, CA.

## Capítulo 5

- Campbell, C.L., y van der Gaag, D.J.** 1993. Temporal and spatial dynamics of microsclerotia of *Macrophomina phaseolina* in three fields in North Carolina over four to five years. *Phytopathology* 83:1434–1440.
- Cloud, G.L., y J.C. Rupe.** 1991. Comparison of three media for enumeration of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Dis.* 75:771-772.
- Dhingra, O.D., y Sinclair, J.B.** 1975. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil: Effects of soil moisture, carbon:nitrogen ratios, carbon sources, and nitrogen concentrations. *Phytopathology* 65:236-240.
- Dhingra, O.D., y Sinclair, J.B.** 1977. An annotated bibliography of *Macrophomina phaseolina*. 1905-1975. Universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais, Brazil.
- Golzar, H., Phillips, D., y Mack, S.** 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in western Australia. *Australasian Plant Dis. Notes* 2:145-147.
- Hutton, D.G.** 2010. Alternatives to methyl bromide for strawberry production in Queensland. In: Final Report Project BSO7017. Horticulture Australia Ltd., Sydney, Australia, pp 11-12
- Hutton, D.G., Gomez, A.O., y Mattner S.W.** 2013. *Macrophomina phaseolina* and its association with strawberry crown rot in Australia. *International Journal of Fruit Science* 13:149-155. Available on line: <http://dx.doi.org/10.1080/15538362.2012.698143>.
- Koike, S.T.** 2008. Crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in California. *Plant Disease* 92:1253.
- Mehan, V.K., y McDonald, D.** 1997. Charcoal Rot. In *Compendium of peanut diseases*, 2nd Edition. N. Kokalis-Burelle et al. eds. APS Press. St. Paul MN.
- Mertely, J., Seijo, T., y Peres, N.** 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. *Plant Dis.* 84:434.
- Noling, J.W., Botts, D.A., y MacRae, A.W.** 2013. Capítulo 6. Alternatives to Methyl Bromide Soil Fumigation for Florida Vegetable Production. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Peres, N.A.** 2006. *Florida Plant Disease Management Guide: Strawberry*. Plant Pathology Department document PDMG-V3-50. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Peres, N.A., Price, J.F., Stall, W.M., Chandler, C.K., Olson, S.M., Smith, S.A., Simonne, E. H., y Santos, B.M.** 2010. *Strawberry Production in Florida*. Horticultural Sciences Department document HS736. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Price, J.F., Nagle, C., McCord, E., y Webb, S.E.** 2007. *Insecticides, Miticides, and Molluscicides Available to Florida's Strawberry Industry*. Entomology & Nematology Department document ENY-

## Capítulo 5

657. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

**VanSickle, J.J., Smith, S., y Weldon, R.** 2009. *Impacts of EPA Proposed Buffer-Zone Restrictions on Profitability of Florida Strawberry Growers*. Food and Resource Economics Department document FE795. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

**Whidden, A.** 2010. *Berry/Vegetable Times June 2010*. Hillsborough County Extension. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

**Zveibil, A., Mor, N., Gnayem, N., y Freeman, S.** 2012. Survival, host–pathogen interaction, and management of *Macrophomina phaseolina* on strawberry in Israel. *Plant Dis.* 96:265-272.

**Zveibil, A., y Freeman, S.** 2005. First report of crown and root rot in strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Israel. *Plant Dis.* 89:1014.

**Zveibil, A., y Freeman, S.** 2009. Methods for detection of soilborne pathogens affecting strawberry in Israel. *Acta Hort.* 842:191-194.



**CAPITULO 6**  
**CONCLUSIONES**

Atendiendo a los resultados obtenidos en los diferentes trabajos experimentales planteados en la presente Tesis Doctoral, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

**Primero:** La técnica de biosolarización fue más efectiva, en aplicaciones repetidas durante varias campañas agrícolas, en el control del patógeno de suelo, *M. phaseolina*.

**Segundo:** Los tratamientos de biosolarización más eficaces fueron las aplicaciones con gallinaza a 25.000kg/ha o vinaza de azúcar de remolacha a 15.000kg/ha, que redujeron las poblaciones de *M. phaseolina* en suelo.

**Tercero:** La población de *M. phaseolina*, en dos fincas con distintos historiales de desinfección del suelo, se expresó en menores niveles en suelos con las aplicaciones de bromuro de metilo más recientes (Fres-Gómez, 2004-2005). Sin embargo, encontramos los mayores niveles de *M. phaseolina*, en suelos donde las aplicaciones con bromuro de metilo fueron hace más años (Occifresa, 2000-2001).

**Cuarto:** Los tratamientos químicos y de biosolarización consiguieron reducir el porcentaje de plantas muertas y la incidencia de podredumbre carbonosa causada por *M. phaseolina*, en dos fincas de la provincia de Huelva.

**Quinto:** Los fumigantes con las combinaciones de bromuro de metilo:cloropicrina (a cualquiera de las tres dosis aplicadas), el producto Trifecta™, y Vapam®, resultaron los más efectivos en la erradicación de microesclerocios de bolsas de pienso de mazorca de maíz inoculadas y coronas secas infectadas con *M. phaseolina*.

**Sexto:** El producto Dazitol™ en combinación con Integrate 20™ y el tratamiento estándar 1,3 dicloropropeno:cloropicrina a dosis de 250 y 300lb/ac, no fueron efectivos erradicando los microesclerocios de bolsas de pienso de mazorca de maíz inoculadas y coronas secas infectadas con *M. phaseolina*.

**Séptimo:** Entre los once fumigantes aplicados en la campa 2013-2014 para el control de muerte de plantas e incidencia de la enfermedad de podredumbre carbonosa, sólo el Dazitol™ en combinación con Integrate 20™, no resultó efectivo y obtuvo valores similares al control.

## Capítulo 6

**Octavo:** Las fumigaciones con Kpam<sup>®</sup> y la combinación de dimetil disulfuro:cloropicrina, aplicados en cinta de riego, no fueron efectivos contra los microesclerocios de *M. phaseolina* en los laterales del lomo de cultivo.

**Noveno:** Los plásticos de cubierta VIF resultaron más efectivo en la erradicación de microesclerocios de *M. phaseolina*, que el plástico LDPE, para las fumigaciones con 1,3-dicloropropeno:cloropicrina. Se determinó la respuesta de resistencia/susceptibilidad de variedades de fresa comerciales a *M. phaseolina*, mediante inoculación artificial, en condiciones controladas, y en condiciones de campo, en suelos naturalmente infestados. Los resultados obtenidos en ambas condiciones fueron similares, siendo el cultivar ‘Splendor’ el más resistente a la enfermedad.

**Décimo:** El cultivar ‘Splendor’ resultó el más resistente, mientras que ‘Camarosa’ y ‘Florida Fortuna’ los más susceptibles, a la enfermedad de podredumbre carbonosa, en ensayos realizados en condiciones controladas (inoculación artificial) y en condiciones de campo (suelos naturalmente infestados).

## **BREVE CURRÍCULUM VITAE**

Manuel Chamorro Rodríguez es Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla en 2008. Cuenta con un Master en ‘Genética molecular y biotecnología’ desarrollado por la Universidad de Sevilla. Tras finalizar sus estudios superiores obtuvo una beca postdoctoral convocada por el Instituto Investigación y Formación Agraria, Pesquera (IFAPA) de la Junta de Andalucía. Es miembro del grupo de Investigación Protección de cultivos (AGR-234) y socio de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF).

Sus líneas de investigación abarcan el estudio de diferentes tipos de prácticas en el estudio de nuevas alternativas al uso del que fue el principal fumigante de suelo en el cultivo de la fresa y el control de las nuevas enfermedades emergentes como es el caso del hongo patógeno, *M. phaseolina*. En estos cuatro años de beca ha tenido la oportunidad de participar en diversos congresos a nivel mundial mediante comunicaciones escritas (7th International Strawberry Symposium, 2012, American Phytopathological society, Texas 2013) y orales (8th International Symposium on chemical and non-chemical soil and substrate disinfestation 2014) y congresos a nivel nacional con ponencias orales y escritas en (SEF 2012 y 2014, Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas 2012). Ha participado activamente en las actividades docentes del IFAPA, impartiendo cursos de Producción Integrada de Fresa, seminarios, jornadas y clases en el máster de especialistas en fresas del Colegio Oficial de Ingenieros Técnicos Agrícolas de Andalucía Occidental (COITAND).

Durante los dos últimos años de su beca ha tenido la oportunidad de realizar estancias en el extranjero de 3 meses aproximadas cada una, en la University of Florida (Gulf Coast Research and Education Center, GCREC), donde ha llevado trabajos y proyectos directamente relacionado con su tesis, en el estudio de distintos fumigantes de tipo químico, en el control de patógenos de fresa. Actualmente cuenta con 2 artículos publicados en revistas internacionales de reconocido prestigio, 1 capítulo de libro y numerosos artículos en diferentes libros de actas de congresos nacionales e internacionales o revistas de transferencia relacionadas con el sector agrario. Ha desarrollado una destacable actividad docente en el IFAPA y la University of Florida (GCREC). Actualmente ejerce su labor investigadora en el IFAPA Centro “Las Torres Torres-Tomejil”.

Su dirección de correo electrónico es: [manuel.chamorro@juntadeandalucia.es](mailto:manuel.chamorro@juntadeandalucia.es)