

# BIOFUMIGACIÓN Y BIOSOLARIZACIÓN EN EL CONTROL DEL ToMV: UNA BUENA ALTERNATIVA AL BROMURO DE METILO

**Juan Carlos Vilaseca, María Isabel Font, Concepción Jordá**

*Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n 46022, Valencia. E-mail: juaviber@doctor.upv.es*

## Resumen

Los restos de cosechas son a menudo portadores de insectos, ácaros y agentes de fitopatógenos, desaconsejando su presencia en campo. Sin embargo el proceso de compostaje en el interior del suelo mediante los procesos de biofumigación y biosolarización, favorecen el control de estos agentes en función de la temperatura, tiempo, microorganismos implicados, plantas empleadas y características del suelo. Este trabajo determinó, en condiciones controladas, la eficacia de la biofumigación y biosolarización en el control del virus del mosaico del tomate en macetas empleando 3 dosis de material vegetal infectado con el virus y en mangas de fibra de coco de un año de uso donde quedaban restos de raíces del cultivo anterior infectadas con el virus. Tanto las macetas como las mangas de fibra de coco fueron sometidas a diferentes tratamientos de embolsado, no embolsado y tiempo de tratamiento. Se consideró biofumigación al tratamiento con 25 °C y biosolarización al tratamiento con 45 °C. Los resultados obtenidos demuestran la eficacia de la biosolarización en el control del virus en macetas sobre la biofumigación; ya que tan solo 4 semanas de tratamiento fueron suficientes frente a las 6 semanas necesarias en la biofumigación. En las mangas de fibra de coco la biosolarización durante 5 semanas resultó ineficaz para el control del virus, pero se redujo el porcentaje de plantas infectadas y se observó un mayor desarrollo vegetativo y el adelanto en su floración. La biofumigación y biosolarización pueden ser consideradas como técnicas alternativas al uso del Bromuro de metilo en el control de agentes fitopatógenos.

**Palabras clave:** Bromuro de metilo, biofumigación, biosolarización, virus, ToMV.

## Summary

### **Biofumigation and biosolarization for the control of tomv: a good alternative for the use of methyl bromide**

Crop residues are often an important source of insects, mites and phytopathogenic agents avoiding their presence in the field. Nevertheless, the process of composting in the soil by means of biofumigation and biosolarization can help to control these agents depending of some factors as temperature, time of treatment, implicated microorganisms and the kind of soil. This research deals about the use of biofumigation and biosolarization for the control of *Tomato mosaic virus* (ToMV) under controlled conditions in pots and 3 different doses of infected vegetal material with the virus were used. Cocopeat slabs infected with the virus were used, too. These growbags had been used during one year and the virus was detected on the remained roots.

Both pots and growbags were placed in open or shut plastic bags and were treated at different temperatures during different periods of time. The treatment at 25 °C was considered as biofumigation and the treatment at 45 °C was considered as biosolarization. Since 4 weeks of treatment at 45 °C was sufficient to control ToMV in pots, biosolarization was more effective than biofumigation. 6 weeks of treatment at 25 °C were necessary to control the virus. In growbags, 5 weeks of treatment at 45 °C were not sufficient to control the virus, but the percentage of infected plants was reduced and a greater development and premature flowering period were observed. Biofumigation and biosolarization can be considered as alternative techniques for the use of Methyl Bromide for the control of phytopathogenic agents.

**Key words:** Methyl Bromide, biofumigation, biosolarization, viruse, ToMV

## Introducción

El bromuro de metilo (en lo sucesivo, BM) ha sido el producto químico más ampliamente utilizado comercialmente para la fumigación del suelo en agricultura intensiva debido a sus propiedades como gas fumigante del suelo de alta eficacia y rápida actuación en el control de enfermedades de origen edáfico, mostrando un amplio espectro de actividad frente a los patógenos. Sin embargo el BM no se retiene en su totalidad en el suelo, sino que del 50 al 95% pasa en forma de emisiones gaseosas a la estratosfera, donde se liberan átomos de bromo que reaccionan con el ozono y otras moléculas estables que contienen cloro, dando lugar a una reacción en cadena que contribuye a la disminución de la capa de ozono, incrementando la emisión de rayos ultravioleta (Thomas 1997, Müller *et al.* 1999). Además, una de las principales desventajas de este producto radica en su alta toxicidad, reduciendo la biodiversidad del suelo y provocando problemas de fitotoxicidad y contaminación.

En el protocolo de Montreal de 1997, se determinó la retirada del BM antes del año 2005 en los países desarrollados quedando su uso limitado a pequeñas cantidades dedicadas a usos críticos. Actualmente en horticultura uno de los mayores retos es el encontrar alternativas a la aplicación de determinados productos fitosanitarios y, en especial al mencionado BM.

Aunque han surgido diversos métodos alternativos al uso del mismo para la desinfestación de suelos (Rodríguez-Kabana 1997), su eficiencia debe ser comparada en cada caso y necesidad. Muchas de estas alternativas han sido discutidas en los distintos seminarios y publicaciones del *Methyl Bromide Technical Options* Comité (MBTOC). Las alternativas pueden clasificarse en químicas y no químicas, pero algunas de estas últimas, por sí mismas y de forma individual han demostrado no tener una buena eficacia ni consistencia para controlar las plagas del suelo y son necesarias combinaciones con otros métodos de control para reemplazar a la fumigación del suelo con este producto. En cuanto a las alternativas químicas, algunas de sus combinaciones se han mostrado efectivas, pero el perfil toxicológico debe ser tenido en cuenta ya que su potencial toxicidad puede resultar una restricción importante a la hora de sustituir al BM. Según Stepleton (2000) el uso de Cloropirina, 1,3-Dicloropropeno, Ethylene dibromide (EDB), Metam sodio y Dazomet, así como sus combinaciones serían algunas posibles alternativas químicas, pero el uso de Cloropirina ya cuenta con prohibición en algunos países. La utilización de este producto en combinación con el Telone, considerado como buen fungicida y nematicida, plantea medidas restrictivas por ser sospechosa su combinación de cancerígena; así como el Metan sodio y Dazomet, con menor acción fumigante que el BM pero que actúan como contaminantes (Bello & Díaz-Rojo 2004). Hasta el momento las alternativas encontradas

plantean serias dudas sobre su eficiencia pero el punto más trascendente a tener en cuenta es la posibilidad de encontrarnos con problemas de toxicidad importantes e incluso más que el que se pretende solucionar.

Entre las alternativas no químicas se incluyen los métodos para tratar el suelo sin el uso de pesticidas para eliminar malas hierbas y plagas, o aquellos métodos de cultivo de plantas en sustrato sin suelo. Entre estas se encuentran el uso de las enmiendas orgánicas, la rotación de cultivos, las técnicas de control biológico con la utilización de hongos (*Trichoderma sp*, *Gliocladium sp*) y/o bacterias (*Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, etc) antagonistas, las prácticas culturales, el empleo de material de plantación sano, la búsqueda de variedades resistentes, el injerto y los métodos físicos como termoterapia con vapor de agua, agua caliente, solarización o la combinación de algunas de las técnicas citadas, dando como resultado un manejo integrado del cultivo. Dentro de las consideradas como prácticas culturales empleando materia orgánica, se encuentra la biofumigación que en combinación con otras como las pertenecientes a los métodos físicos, por ejemplo la solarización, puede aumentar la eficacia de estas últimas (Rodríguez-Kabana 1997).

En lo referente a la biofumigación como alternativa al BM, la materia orgánica a través de sus procesos de biodegradación supone una prometedora alternativa en la regulación de los patógenos del suelo. La biodegradación de la materia orgánica está basada en los mismos principios de los fumigantes que el BM (Bello *et al.* 2000), la única diferencia se encuentra en que la biofumigación utiliza los gases y otros productos resultantes de la biodegradación de las enmiendas orgánicas y residuos agroindustriales. Su eficacia se incrementa al incorporarla en los sistemas de manejo integrado de cultivos, diferenciándose del simple uso de enmiendas orgánicas tanto en las características de los materiales que se utilizan como biofumigantes como en los métodos de aplicación resultando una técnica de bajo coste y fácil aplicación (Bello *et al.* 2003). La efectividad de la biofumigación es similar a la de otros pesticidas convencionales, pero al mismo tiempo mejora las características tanto del suelo como de la planta. Cuando se emplea biofumigación se hace necesario el diseño de metodologías de manejo para cada situación. El coste de la biofumigación puede resultar muy económico cuando se emplean estiércoles animales, abonos verdes o mucho más cuando se utilizan los propios restos de cultivo, recomendando el uso de recursos locales como biofumigantes por el bajo coste del transporte, principal factor que puede ser limitante de la técnica. Los problemas que pueden aparecer relacionados con la fertilidad del suelo y la nutrición de las plantas, como el caso de un déficit en nitrógeno, pueden solucionarse con una fertilización adecuada (Bello & López-Pérez, 2002). Bello *et al.* (2003) afirma que el mayor problema en el uso de enmiendas orgánicas es la heterogeneidad en la composición de las materias utilizadas, siendo necesario su

total conocimiento evitando la acumulación de compuestos que podrían resultar perjudiciales, así como el aumento del nivel de inoculo de algunos patógenos. La acción de los microorganismos sobre la materia orgánica durante su descomposición produce una gran cantidad de productos químicos entre los que se encuentran amonio, nitratos, ácido sulfhídrico y un gran número de sustancias volátiles y ácidos orgánicos.

Los restos de cosechas son a menudo portadores de insectos, ácaros y diversos agentes de naturaleza fúngica, bacteriana o vírica. De siempre han sido considerados como un peligro y se ha desaconsejado su presencia en campo. Poco se conoce de la mayoría de ellos, sobre su permanencia viable, pero el abandono de los cultivos afectados en el campo o dejarlos sobre el suelo se ha considerado con acierto que supone un alto riesgo de contaminación para cultivos posteriores. Sin embargo si este material vegetal infectado es sometido a un proceso de compostaje se ha comprobado que el riesgo desaparece (Aparicio *et al.* 1995). Para biofumigación se pueden incorporar al suelo estos restos de cosecha produciéndose su descomposición en el interior del mismo y por lo tanto el citado proceso de compostaje tiene lugar dentro del suelo. Las prácticas de biofumigación empleando dichos restos permiten su eliminación y, por otra parte, el efecto de las sustancias volátiles que se desprenden en su descomposición y que son liberan al suelo favoreciendo el control de los citados agentes fitopatógenos en función de determinados parámetros siendo los más importantes la temperatura, los microorganismos implicados, las plantas empleadas y las características del suelo. Por otra parte con la utilización de los restos de cosecha se consigue eliminar el acumulo de los mismos con el grave problema de impacto ambiental que estos constituyen al amontonarse en las inmediaciones de los campos de cultivo. Ante esta posibilidad y conocedores de que los restos de cosecha pueden ser portadores de diferentes enfermedades este artículo presenta los estudios preliminares de esta técnica empleando material vegetal infectado con un agente patógeno de reconocida estabilidad e importancia y que ha planteado importantes problemas económicos y de gestión de los residuos vegetales.



**Figura 1:** Sintomatología de ToMV en tomate: A) Planta de tomate que presenta mosaico verde claro-verde oscuro del follaje con distorsión de las hojas jóvenes y abullonado. B) Mosaico amarillo sobre fondo rojo en frutos de tomate.

Este trabajo aborda el estudio preliminar de la influencia de la biofumigación/biosolarización sobre uno de los virus más estables, de fácil transmisión mecánica y de gran permanencia en el suelo como es el virus del mosaico del tomate (*Tomato mosaic virus*, ToMV) (Fig. 1).

El ToMV ha sido uno de los virus que más ha afectado al cultivo del tomate hasta la aparición de variedades resistentes, resistencia que ha hecho olvidar a los productores de esta hortícola los problemas que esta entidad viral ha causado durante años en el cultivo. Aún hoy en día sigue siendo uno de los virus más importantes debido a sus continuas apariciones y produciendo grandes pérdidas en este cultivo al que afecta tanto en las variedades autóctonas, al no poseer genes de resistencia, como a los tomates tipo "cherry" cuyo cultivo y comercialización se ha incrementado en los últimos años y últimamente el riesgo de superación de la resistencia en las variedades comerciales debido a la detección de una nueva cepa del virus (Tm-2<sup>2</sup>) (Aramburu & Galipienso 2005), amenaza de nuevo el futuro sanitario de esta hortícola. El material infectado con este virus puede permanecer infectivo durante largos periodos de tiempo incluso varios años en caso de hojas secas.

Los restos de cultivo abandonados en el campo y en el invernadero constituyen una de las principales fuentes de contaminación para el cultivo siguiente. Esta situación se hace todavía más patente, si cabe, cuando se utilizan mangas de fibra de coco, ya que las raíces acumuladas en las mangas originadas por las plantas del cultivo del año anterior, sirven de foco de infección a las nuevas plántulas trasplantadas, impidiendo al productor su reciclado y obligándole a su eliminación y cambio anual con el correspondiente perjuicio económico que esto significa.

En el presente trabajo se ha abordado el estudio del efecto de la biofumigación y biosolarización en condiciones controladas, empleando restos de material vegetal infectado por ToMV, para conseguir su eliminación.

## Materiales y Métodos

### Biofumigación y biosolarización para el control de ToMV en macetas en condiciones controladas

Se seleccionó como ya hemos indicado previamente para realizar este estudio uno de los virus más estables que existe en el mundo vegetal, el ToMV (*Tomato mosaic virus*), virus que es capaz de sobrevivir en material vegetal seco durante largos periodos de tiempo, incluso años. Además de esta propiedad hay que citar su fácil transmisión mecánica siendo éste uno de los virus de permanencia en suelo a tener en cuenta. El objetivo de esta selección era demostrar que si era posible conseguir su eliminación mediante la aplicación de las técnicas de biofumigación y/o biosolarización con un virus de las características de estabilidad del citado, con ma-

por facilidad se podría aplicar a otras entidades fitopatógenas. El aislado seleccionado fue el 6176 procedente de Almería, de planta de tomate. Este estudio se ha realizado en macetas y en condiciones absolutamente controladas como paso previo a su aplicación en campo, teniendo en cuenta que el suelo como ente complejo requerirá un estudio profundo según las características del mismo previo a la implantación de esta posible desinfección de forma rutinaria.

Se consideró biofumigación al tratamiento con temperatura de 25 °C y biosolarización a 45 °C, aunque con el convencimiento de que la utilización de solarización en combinación con biofumigación puede alcanzar temperaturas muy superiores a los 45 °C cuando esta biosolarización se realice en campo en los meses de julio y agosto.

### 1. Obtención de material vegetal libre de virus para los ensayos de biofumigación y biosolarización

Se prepararon semilleros para la obtención de plantas sanas para su utilización posterior tanto como testigo negativo, como en la multiplicación del virus en condiciones controladas y para el posterior trasplante sobre el sustrato sujeto a los tratamientos de biofumigación y biosolarización. Para ello se emplearon semillas de la variedad Marmande termotratadas y una vez pre-germinadas se transplantaron a bandejas de alvéolos que contenían sustrato (turba rubia) y arena de sílice (tamaño 3) situándose en un Fitotrón con una temperatura de 25 °C/20 °C, 60 % humedad relativa (HR) y 16 horas de luz. En estas condiciones las plantas sanas a los 14 días ya habían alcanzado el tamaño adecuado para su trasplante (3-4 hojas verdaderas) y/o para la inoculación con ToMV. Las plantas que fueron posteriormente utilizadas como testigos sanos permanecieron aproximadamente un mes en estas condiciones de aislamiento hasta obtener una cantidad de masa vegetal suficiente para su troceado y posterior mezclado con el sustrato estéril. Antes de su troceado e incorporación al sustrato, estas plantas de tomate, fueron analizadas para su buen estado fitosanitario frente al ToMV mediante la técnica serológica DAS-ELISA con el antisuero comercial de ToMV (Loewe Biochemica Sauerlach, Germany nº 07047S/500).

### 2. Obtención de material vegetal infectado con ToMV para los ensayos de biofumigación y biosolarización

Para la obtención de material vegetal infectado con ToMV se realizó una transmisión mecánica artificial a plantas de tomate, de las anteriormente obtenidas, con un estado de desarrollo de 3-4 hojas verdaderas. Para obtener suficiente material vegetal infectado para los ensayos propuestos se inocularon un total de 60 plantas sanas crecidas en condiciones de aislamiento como se ha descrito anteriormente. El inóculo para realizar dicha inoculación se preparó a partir de material infectado y homogeneizado con tampón de inoculación (tampón fosfato Na/K, pH: 7,2 0,01M + Bisulfito sódico 0,5 % +

EDTA 0,5 %) (1g/4ml). Las plantas fueron espolvoreadas previamente con un abrasivo (Carborundum de 600 mesh) frotando suavemente la lámina foliar de las plantas a inocular. Posteriormente las plantas se lavaron con agua destilada. Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero bajo las condiciones anteriormente descritas.

Transcurridos 15 días de la inoculación mecánica artificial, se confirmó la presencia del virus en las plantas mediante diagnóstico serológico, empleando la técnica DAS-ELISA (apartado 1).

### 3. Ensayo de biofumigación y biosolarización para el control de ToMV en macetas

Para estudiar la influencia de la biofumigación y/o biosolarización en la eliminación del ToMV en material infectado se procedió de la forma que a continuación se describe, estableciendo tratamientos desde 0 hasta 7 semanas. Estos ensayos se repitieron en tres ocasiones. Se emplearon macetas de 15 cm de diámetro que se prepararon con 500g de sustrato por maceta a partir de una mezcla de turba rubia y arena gruesa en una proporción de 3 a 1, todo ello previamente autoclavado a 120 °C durante una hora. El material vegetal infectado con



**Figura 2:** A) material vegetal infectado con ToMV, troceado y mezclado con el sustrato. B) macetas con material vegetal enterrado y embolsadas (derecha) y no embolsadas (izquierda).

el virus fue troceado y posteriormente mezclado con el sustrato en tres proporciones diferentes 5, 10 y 15 g por cada 500 g de sustrato (3, 6 y 9 t por ha aproximadamente) (Fig.2A). También se prepararon, como testigos negativos y con las mismas dosis, mezclas con material vegetal de tomate sano y sólo sustrato. Se establecieron un total de siete lotes que coincidían con las siete semanas de duración total de los tratamientos para las dos temperaturas estudiadas. La mitad de las macetas fueron introducidas en bolsas de plástico de forma individual y se cerraron herméticamente para someterlas al proceso de biofumigación, evitando la salida de los gases generados en el proceso de descomposición del material vegetal, denominándolas "Embolsadas" (E). La otra mitad de las macetas se dejaron abiertas, denominándolas como "No Embolsadas" (NE) (Fig. 2B).

Una vez preparadas, las macetas fueron introducidas en estufas acondicionadas con las temperaturas de 25 y 45 °C. Semanalmente se sacaban las macetas correspondientes a cada lote y en ellas se transplantaban plantas de tomate sanas en un estado de 3-4 hojas verdaderas



**Figura 3:** Transplante de plántulas de tomate sano en estado de 3-4 hojas verdaderas a cada uno de los lotes.

(Fig. 3). Una vez realizado el transplante se colocaban en el invernadero en condiciones de aislamiento sanitario.

Aunque se es consciente de que a temperaturas más elevadas el periodo de tratamiento será menor, en este trabajo se pretende establecer el período de tiempo necesario para eliminar la infección de ToMV. Se realizó un seguimiento del ensayo mediante la observación de síntomas y determinando la presencia o ausencia del virus realizando el análisis de todas las plantas empleando la técnica serológica DAS-ELISA (apartado 1). Las plantas se analizaron al mes de su transplante ya que transcurrido este período éstas habían tenido tiempo suficiente para que se hubiera producido su infección en el caso de que en la mezcla del suelo con material vegetal infectado no se hubiera eliminado el virus con los respectivos tratamientos. El análisis de estas plantas se repitió al mes siguiente para comprobar los resultados obtenidos en el primer análisis y evitar dar como negativas aquellas plantas cuya carga viral fuera baja y no detectable mediante la técnica serológica empleada.

#### 4. Análisis estadístico del ensayo de biofumigación y biosolarización para el control de ToMV en macetas

Los datos obtenidos sobre el control de la infección

del virus ToMV, se analizaron, mediante un modelo de regresión logística múltiple con variable dependiente dicotómica presencia/ausencia, considerándose 7 factores (3 dosis de 5, 10 y 15 g de material vegetal sano; 3 dosis de 5, 10 y 15 g de material vegetal infectado y 1 bandeja de testigo negativo sin material vegetal), macetas Embolsados y No Embolsados, 2 tratamientos a diferente temperatura de 25 y 45 °C, 4 repeticiones (4 macetas) y 8 lotes o semanas (lote 0 hasta el lote7). Se consideró "lote 0" o "semana 0" al grupo de macetas no sometidas a ningún tratamiento de temperaturas y se consideró "lote 7" o "semana 7" al grupo de macetas sometidas a 7 semanas de tratamiento de temperaturas. Los datos fueron analizados mediante el procedimiento *Logistic* del programa SAS versión 9.1 (SAS Institute) y el programa Excel 2003 mediante tablas y gráficos dinámicos (Pérez 2001, 2002).

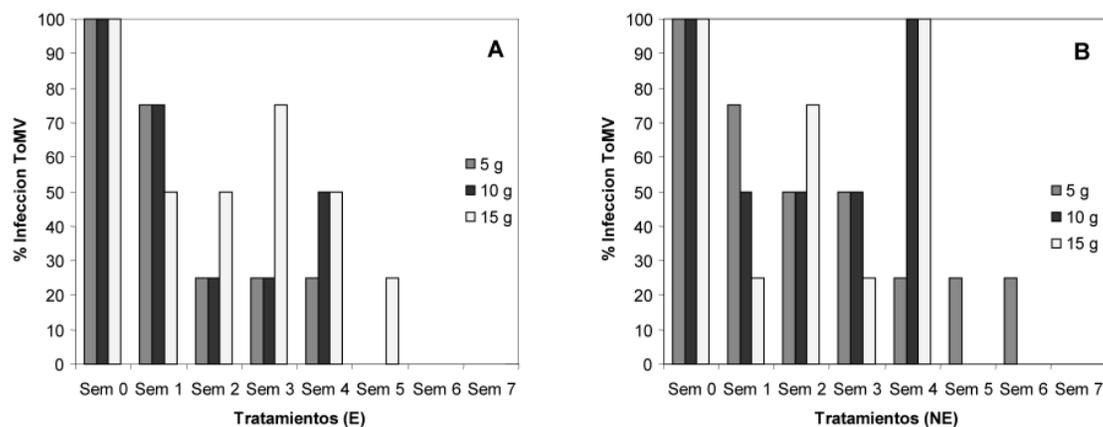
#### Biosolarización para el control de ToMV en mangas de fibra de coco en condiciones controladas

Para llevar a cabo este ensayo en condiciones controladas se trasladaron hasta los invernaderos de la Universidad Politécnica de Valencia del departamento de Ecosistemas Agroforestales un total de 12 mangas de fibra de coco (100 x 18 x 16 cm, Pelemix Spain), procedentes de invernaderos localizados en Monserrat (Valencia) que tenían un año de uso en producción de tomate valenciano, cultivo éste que presentó una alta infección del virus del mosaico del tomate.

Antes de iniciar el experimento se comprobó la presencia de ToMV en las raíces del cultivo anterior que quedaron en el sustrato de las mangas, mediante la técnica serológica DAS-ELISA (apartado 1). Posteriormente las mangas se humedecieron hasta alcanzar la capacidad de campo y se dividieron en 3 grupos. El grupo nº 1 estaba constituido por 4 mangas que permanecieron en el invernadero en condiciones de aislamiento sin ningún tipo de tratamiento y se consideraron como testigos positivos; el grupo nº 2 estaba constituido por 4 man-



**Figura 4:** A) en segundo plano de esta imagen se encuentran las mangas de fibra de coco que permanecieron en el invernadero en condiciones de aislamiento sin ningún tipo de tratamiento (testigos positivos) y en primer plano de la imagen se encuentran las mangas de fibra de coco tratadas y embolsadas para evitar la salida de gases. B) mangas de fibra de coco transplantadas cada una de ellas con cinco plántulas de tomate sano en invernadero.



**Figura 5:** Control del ToMV a 25°C: A) macetas embolsadas (E) y B) macetas no embolsadas (NE).

gas que se envolvieron en plásticos evitando la salida de gases y el grupo nº 3 por otras 4 mangas que se dejaron abiertas (Fig. 4A). Las mangas correspondientes a los grupos 2 y 3 se trasladaron a estufa donde se sometieron a una temperatura de 45 °C durante un tiempo de 5 semanas, período éste que fue tomado como referencia de los ensayos anteriormente descritos. Transcurrido este tiempo, las mangas de fibra de coco termotratadas fueron trasladadas a invernadero donde se llevó a cabo el transplante de cinco plántulas de tomate sano por cada manga incluyendo las de los testigos (Fig. 4B).

Las plantas de tomate utilizadas en este ensayo fueron obtenidas a partir de semillas var. Marmande, termotratadas y el semillero obtenido en condiciones de aislamiento según se ha descrito anteriormente para asegurar su estado fitosanitario. El tiempo de permanencia de estas plantas en las mangas fue de un mes, tiempo suficiente para que el ToMV hubiera infectado las plantas de tomate a través de las raíces.

Transcurridos este período se comprobó la presencia o ausencia del virus mediante análisis utilizando técnica serológica DAS-ELISA (apartado 1).

#### 1. Análisis estadístico del ensayo de biosolarización en el control de ToMV en mangas de fibra de coco

Los datos generados en el ensayo se analizaron mediante una regresión logística simple con el procedimiento de modelos lineales generalizados *Generalized Linear Models (Proc Genmod)* con distribución binomial, donde la variable explicativa es dicotómica presencia/ausencia del virus, se considera la variable independiente tratamiento: con y sin bolsa, y un testigo (sin tratamiento). Estos análisis fueron procesados mediante el programa de análisis estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute) incluido la transformación logit (link logit).

### Resultados y discusión

#### Biofumigación en el control de ToMV en macetas en condiciones controladas

Los resultados obtenidos tras someter las macetas con material infectado a 25 °C durante periodos de

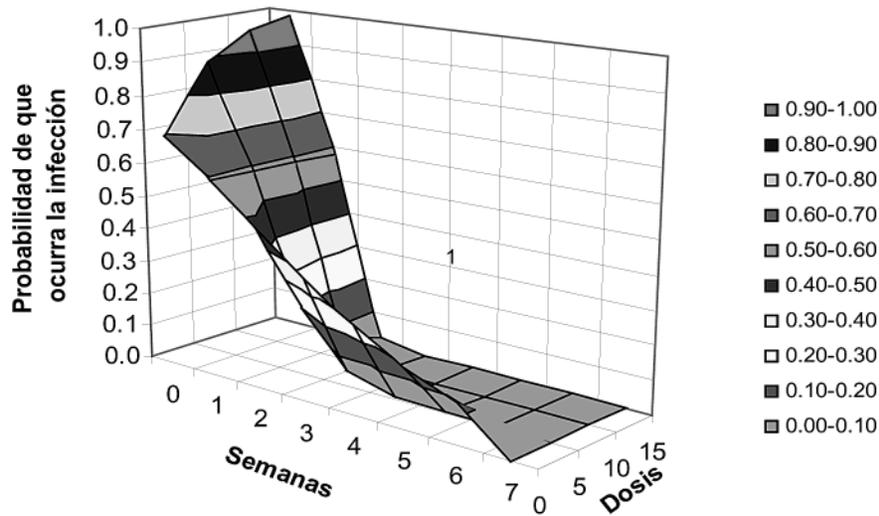
tiempo establecidas entre 0 y 7 semanas, y a su vez repetidos en tres ocasiones, resultaron ser coincidentes. Estos resultados quedan recogidos en la figura 5.

A 25 °C la biofumigación hace posible que porcentaje de infección con ToMV disminuya a medida que transcurren las semanas de tratamiento. En la semana 0 (sin tratamiento a 25 °C) el porcentaje de infección es del 100% para las tres dosis ensayadas, eliminándose por completo después de la semana 6 en el ensayo con macetas embolsadas y después de la semana 7 en el ensayo con macetas no embolsadas.

En cuanto a la dosis de material infectado empleada en el ensayo de biofumigación, parece ser que la infección con la dosis de 5 g disminuye progresivamente a medida que pasan las semanas de tratamiento, eliminándose por completo después de la semana 4 en el ensayo con macetas embolsadas y después de la semana 6 en el ensayo con macetas no embolsadas. En cambio, con las dosis de 10 y 15 g la infección tanto en macetas embolsadas como no embolsadas tiende a disminuir en las primeras semanas de tratamiento para aumentar en semanas posteriores, eliminándose por completo después de las semanas 4 y 5 en el ensayo de macetas embolsadas con dosis de 10 y 15 g respectivamente (Fig. 5A) y después de la semana 4 en el ensayo de macetas no embolsadas para estas dos dosis (Fig. 5B).

El aumento de la infección detectado en la semana 3 en el ensayo con macetas embolsadas y en las semanas 2 y 4 en el ensayo con macetas no embolsadas, es un comportamiento anómalo para el que no encontramos una explicación lógica salvo que en el momento del transplante a las macetas del tratamiento las condiciones ambientales fueran mejores que en tratamientos anteriores para el desarrollo del ToMV, teniendo en cuenta que el ensayo se realiza en invernadero y depende de la climatología o bien que hubiera tenido lugar una contaminación en el ensayo, hecho este factible dado el alto poder infectivo de este virus y su fácil transmisión mecánica.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, se consigue eliminar la infección por ToMV en macetas y condiciones controladas a 25 °C después de la



**Figura 6:** Probabilidad de que ocurra la infección por ToMV en función de la dosis y el número de semanas de tratamiento a 25°C.

semana 5 y 6 en macetas embolsadas y no embolsadas respectivamente. En el ensayo con macetas embolsadas se observa que la infección por ToMV se consigue eliminar antes cuanto menores sean las dosis empleadas, al contrario de lo que sucede en el ensayo con macetas no embolsadas.

La utilización de esta técnica de biofumigación en condiciones de campo, sería similar al ensayo de macetas no embolsadas lo que implicaría que la biofumigación debería realizarse durante un periodo entre 6 y 8 semanas, dependiendo del tipo de suelo para la eliminación del ToMV.

1. Resultados del análisis estadístico del ensayo de biofumigación en el control de ToMV en macetas en condiciones controladas

Los resultados obtenidos al analizar los datos del ensayo de biofumigación se ajustaron al método de *maximum likelihood estimates* mediante el test de Wald que determina los parámetros individuales con un nivel significativo del 95 %, observando que para las variables semanas y dosis existía una diferencia significativa de  $P < 0,0001$ . En cambio para los tratamientos de embolsado y no embolsado no existió diferencia significativa entre ellos ya que el valor de  $P$  fue 0,3925 ( $> 0,05$ ). Los "odds ratio" obtenidos en este análisis para la variable semanas fue de 0,504 y para las dosis de 1,203; valores estos que están indicando que existe una mayor riesgo de infección según las dosis empleadas que la duración del tratamiento.

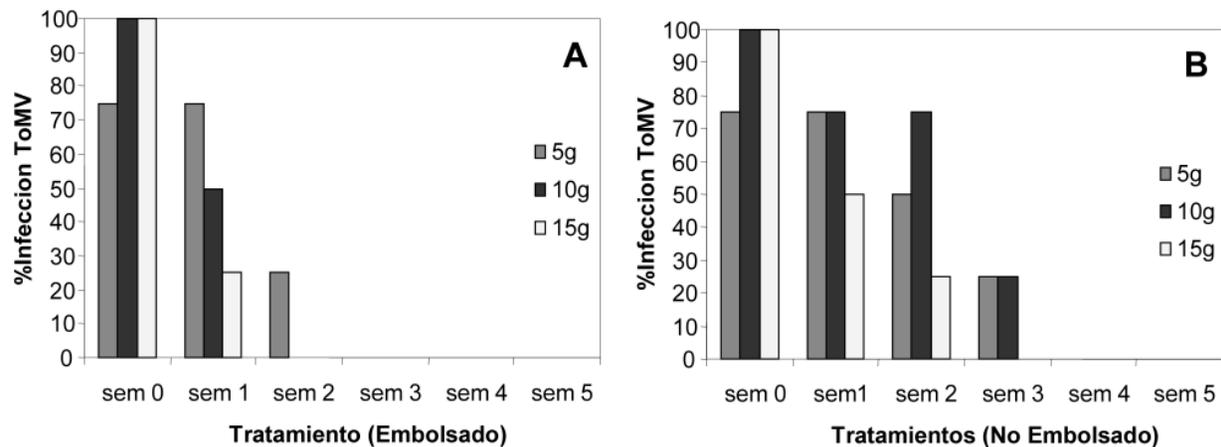
Como se puede observar en la compleja figura 6, en la semana 0 del ensayo de biofumigación la probabilidad de que ocurra la infección del ToMV es del 0,90-1,00 para las dosis de 10 y 15 g, en cambio para la dosis de 5 g esta probabilidad baja hasta valores del 0,7-0,8. El gráfico revela que la probabilidad de que ocurra la infección por ToMV va disminuyendo a medida que se aumentan las semanas de tratamiento para las tres dosis, resaltan-

do que para las dosis de 10 y 15 g la probabilidad ya es nula a partir de la semana 3, pero para la dosis de 5 g en esta semana de tratamiento aún persiste una probabilidad del 0,30-0,40. En las semanas 4, 5 y 6 la probabilidad es del 0,10-0,20 para alcanzar valores de infección del 0,00-0,10 en la semana 7. Existiendo una probabilidad casi nula a partir de la semana 6 de tratamiento, pudiendo afirmar que la infección por el ToMV queda controlada a partir de esta semana.

#### **Biosolarización en el control de ToMV en macetas en condiciones controladas**

Los resultados obtenidos tras someter las macetas con material infectado con ToMV a 45 °C durante periodos de tiempo establecidos entre 0 y 7 semanas, y a su vez repetidos en tres ocasiones, resultaron ser coincidentes. Estos resultados quedan recogidos en la figura 7, donde se puede observar que la biosolarización tiene efectos sobre el control del virus, ya que a medida que transcurren las semanas de tratamiento a 45°C el porcentaje de infección disminuye respecto a la semana 0. La infección se elimina por completo después de la semana 2 en el ensayo con macetas embolsadas y después de la semana 3 en el ensayo con macetas no embolsadas.

En cuanto a las dosis empleadas y como se muestra en la figura 7A del ensayo con macetas embolsadas, el porcentaje de infección en la semana 1 de tratamiento se mantiene estable para la dosis ensayada de 5 g, sin embargo disminuye un 50 % para dosis de 10 g y en un 75 % para dosis de 15 g. En la semana 2 de tratamiento se observa que el porcentaje de infección para dosis de 10 y 15 g ya es nulo, sin embargo cuando la dosis es 5g, la infección disminuye en un 50% respecto a la semana 0 y 1 de tratamiento, pero no se llega a eliminarse por completo hasta la semana 3. Hecho este que atribuimos a que no hay cantidad suficiente de materia orgánica para que se produzca la desinfección, pero sí para que



**Figura 7:** Control del ToMV a 45°C: A) macetas embolsadas (E) y B) macetas no embolsadas (NE).

se mantenga la infección, debiendo esperar en este caso una semana mas para que quede libre el sustrato del virus y se controle la infección.

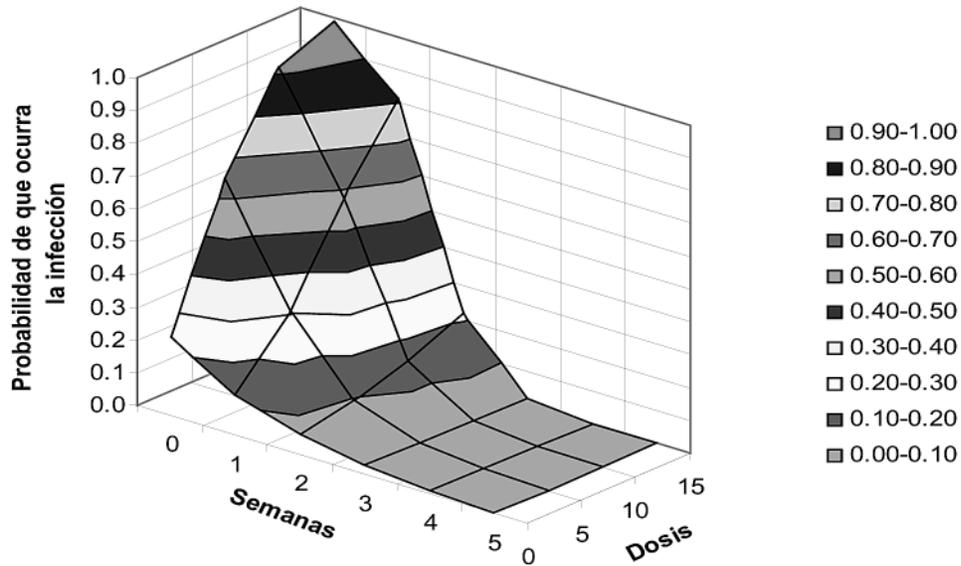
La biosolarización a 45 °C en macetas no embolsadas (Fig. 7B) y para la dosis de 5 g se observa que el porcentaje de infección va disminuyendo a medida que transcurren las semanas de tratamiento, eliminándose por completo después de la semana 3. Para esta dosis de 5g en la semana 0 y 1 de tratamiento existe un porcentaje de infección del 75 %, en la semana 2 este porcentaje disminuye un 25 %, persistiendo una infección del 50 %, para la semana 3 el porcentaje de infección vuelve a disminuir en un 25 % con relación a la semana 2, persistiendo todavía un infección del 25 %; desapareciendo a partir de esta semana como ya se ha señalado anteriormente. Para la dosis de 10 g se observa que ya en la semana 1 de tratamiento el porcentaje de infección ya ha disminuido en un 25 % con respecto a la semana 0 (100 % de infección), porcentaje de infección que permanece constante hasta la semana 2 de tratamiento, pero que desciende bruscamente en un 50 % en la semana 3 con respecto a las semanas 1 y 2 hasta alcanzar niveles de infección del 25 %, para desaparecer por completo después de la semana 3 al igual que sucede con la dosis de 5 g. En cambio para la dosis de 15 g, es después de la semana 2 de tratamiento cuando se observa la desaparición por completo de la infección, resaltando que el porcentaje de infección disminuye en un 50 % ya en la semana 1 con respecto a la semana 0, seguido de un descenso de un 25 % en la semana 2 con respecto a la semana 1.

En este trabajo se consigue eliminar la infección del ToMV en macetas y condiciones controladas a 45 °C después de la semana 2 y 3 para macetas embolsadas y no embolsadas respectivamente. De acuerdo con los datos y en este caso de utilizar como técnica la biosolarización, el plazo de eliminación de la entidad viral del suelo se acorta a 2-3 semanas, es decir a la mitad con respecto a la biofumigación. Por razones de seguridad y para evitar posibles escapes del virus ToMV, consideraríamos aceptar para su aplicación práctica, sin riesgo,

cuatro semanas de tratamiento para las tres dosis estudiadas.

Los efectos de los tratamientos relacionados con la biodescomposición están considerados como la acción de las sustancias volátiles procedentes de la descomposición de los restos vegetales sobre los patógenos. En trabajos realizados por otros grupos de investigación, se ha demostrado la eliminación del ToMV durante el compostaje de restos vegetales donde se alcanzan más altas temperaturas pero no hay trabajos previos de la realización de este compostaje en el propio suelo. Se sugiere que la producción de sustancias tóxicas para el patógeno, originadas durante la rápida descomposición de los restos vegetales, sea responsable de la eliminación de los virus. Asimismo la fermentación de la materia orgánica provoca una modificación de la atmósfera del suelo incrementando el CO<sub>2</sub> y disminuyendo el O<sub>2</sub>, dando lugar al fenómeno de anaerobiosis, consiguiendo de 90-100 % de reducción de patógenos. Sin embargo, Bello *et al.* (2003) afirman que la solarización en campo es eficaz cuando se combina con biofumigación (Biosolarización) durante 30 a 45 días a una temperatura ambiental superior a los 40 °C durante los meses de julio y agosto, que es cuando la temperatura del suelo alcanza incluso temperaturas superiores a los 50 °C, resultados estos que no habían sido confrontados para el caso del ToMV.

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con otros similares desarrollados por otros grupos de investigación en este trabajo sí se consigue controlar la infección del ToMV en macetas y condiciones controladas a 25 y 45 °C después de varias semanas de tratamiento tanto en ensayos con macetas embolsadas como no embolsadas. El embolsado de las macetas muestra una mayor efectividad del tratamiento tanto a 25 como a 45 °C, resultado lógico ya que evita la dispersión de los gases que se generan en el proceso de compostaje "in situ" que tiene lugar en las macetas. De forma menos eficiente, también se produce la desaparición del virus en las no embolsadas aunque tarda mas debido a que parte de dichos gases son liberados al exterior.



**Figura 8:** Probabilidad de que ocurra la infección por ToMV en función de la dosis y el número de semanas de tratamiento a 45°C.

1. Resultados del análisis estadístico del ensayo de biosolarización en el control de ToMV en macetas en condiciones controladas

Los resultados obtenidos al analizar los datos del ensayo de biosolarización se ajustaron al método de *maximum likelihood estimates* mediante el test de Wald que determina los parámetros individuales con un nivel significativo del 95 %, se obtuvo que para las variables semanas y dosis con una diferencia significativa de  $P < 0.0001$ . En cambio en los tratamientos de embolsado y no embolsado no se encontró diferencia significativa entre ellos ya que el valor de  $P$  fue 0,6121 ( $> 0,05$ ). Los "odds ratio" obtenidos en este análisis para la variable semanas fueron de 0,171 y para las dosis de 1,235; valores estos que están indicando que existe un mayor riesgo de infección según las dosis empleadas que la duración del tratamiento.

Como se observa en la figura 8, la semana 0 del ensayo de biosolarización la probabilidad de que ocurra la infección del ToMV es del 0,90-1,00 para la dosis de 15 g, del 0,80-0,90 para la dosis de 10 g y del 0,70-0,80 para la dosis de 5 g; observándose que sin someter las macetas a ningún tipo de tratamiento térmico (semana 0), la probabilidad de que se presente la infección disminuye a medida que se emplean dosis de menor cantidad.

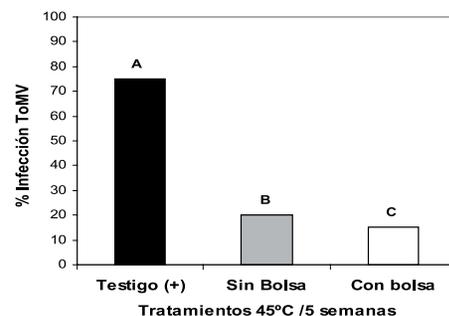
Al igual que sucede en el tratamiento de biofumigación, la probabilidad de que ocurra la infección por ToMV va disminuyendo a medida que transcurren las semanas de tratamiento para las tres dosis. Para las dosis de 10 y 15 g la probabilidad que se produzca la infección es del 0,00-0,01 después de la semana 2 de tratamiento, pero para la dosis de 5 g estos valores de probabilidad se alcanzan a partir de la semana 3, pudiendo asegurar que la infección por el ToMV queda controlada a partir de esta semana.

Los resultados del análisis de regresión logística múltiple para los ensayos de biofumigación y biosola-

rización muestran que existen diferencias significativas entre el número de semanas de tratamiento al que son sometidas las macetas y también para las dosis de material infectado empleadas en estos ensayos; pero no existen diferencias significativas entre el tratamiento de embolsado y no embolsado de las macetas. Este resultado difiere del obtenido en los apartados I en el caso de biofumigación y II en el caso de biosolarización, en los que se presentan los resultados expresados en porcentajes de infección y donde se pueden observar claras diferencias entre los tratamientos de embolsado y no embolsado, además de entre número de semanas de tratamiento y dosis empleadas. Esta contradicción aparente en los resultados obtenidos y los datos aportados por la estadística podría ser debido al bajo número de plantas empleadas en los ensayos (4 repeticiones por tratamiento) debido a las limitaciones de espacio y medios disponibles.

**Biosolarización para el control de ToMV en mangas de fibra de coco en condiciones controladas.**

La figura 9 muestra que los tratamientos de biosolarización sobre las mangas de fibra de coco en el control de ToMV tuvieron un efecto considerable en la disminu-



**Figura 9:** Control del ToMV en mangas de fibra de coco infectadas



**Figura 10.** Plantas de tomate crecidas en mangas de fibra de coco nuevas (derecha) y crecidas en mangas de un año, infectadas con ToMV y biosolarizadas (izquierda).

ción de la infección, sin embargo en la biosolarización de las mangas durante 5 semanas no se consiguió el control total de la infección por ToMV. Este descenso en el porcentaje de infección comparado con el obtenido en las mangas de fibra de coco no sometidas a ningún tipo de tratamiento (75 % de infección) fue del orden del 55 % por alcanzar un porcentaje de infección del 20 % en las mangas no embolsadas y un descenso del orden del 60 % por alcanzar porcentajes de infección del 15 % en el caso de las embolsadas (Fig. 9).

En función de estos resultados, la infección por ToMV no se llega a controlar totalmente, esto podría ser debido a que la fibra de coco es un sustrato inerte, lo que hace que la solarización no sea efectiva en la eliminación de fitopatógeno o bien que la concentración de raíces infectadas sea tan alta que resulta insuficiente el periodo ensayado. Periodos más largos de permanencia a 45 °C podrían dar mejores resultados en cuanto al control del virus.

En este ensayo se observó que las plantas de tomate variedad Marmande crecidas en mangas de fibra de coco no sometidas a ningún tipo de tratamiento (testigo positivo) presentaron una coloración verde oscura, un menor desarrollo y poco vigor; en cambio las plantas

crecidas en mangas embolsadas y no embolsadas sometidas a tratamiento térmico (45 °C) durante 5 semanas presentaron una coloración normal, mayor vigor y un desarrollo exuberante en comparación a las no tratadas. Este diferente comportamiento podría ser debido a que la materia orgánica que se aporta en forma de raíces a las mangas de fibra de coco en el primer año de cultivo mejoró considerablemente el desarrollo de la planta de tomate en su segundo año de uso y disminuir considerablemente el riesgo de la infección con ToMV. Las raíces de las mangas que constituyeron el testigo positivo, al no estar sometidas al proceso de biosolarización, no se descompusieron tanto como las biosolarizadas y por ello estas últimas ofrecieron un desarrollo y vigor mucho mayor además de la incidencia del virus sobre la planta desde un estadio temprano. Asimismo se observó un adelanto en la floración de las plantas de tomate crecidas en las mangas biosolarizadas. Este hecho podría ser un factor importante a tener en cuenta para planificaciones futuras relacionadas con la comercialización de los frutos.

Este mismo estudio se realizó en un invernadero de la zona de Monserrat en condiciones reales de campo obteniéndose resultados similares (datos no incluidos en

este trabajo). Las plantas crecidas sobre mangas de un año e infectadas con ToMV y biosolarizadas presentaban mayor vigor y un adelanto en la producción, siendo ésta mayor que en las no tratadas e incluso que en las mangas compradas en el año de uso (Fig. 10). Las nuevas mangas también presentaron infección por ToMV en un periodo corto de tiempo.

1. Resultados del análisis estadístico del ensayo de biosolarización en el control de ToMV mangas de fibra de coco

Las mangas de fibra de coco que fueron sometido a biosolarización por 5 semanas en el control de ToMV fueron analizados con una regresión logística simple, cuyos resultados tienen una distribución binomial, en el que los tratamientos, testigo (positivo), sin bolsa y con bolsa (Fig. 9). Se observaron diferencias estadísticas entre ellos al  $P < 0,001$  de significancia.

### Conclusiones

La biofumigación puede llegar a controlar ToMV en tratamientos superiores a 6 semanas.

La biosolarización es más eficiente en el control de ToMV en suelo ya que tan sólo 4 semanas de tratamiento son suficientes para controlar dicha infección.

La biosolarización de mangas de fibra de coco durante 5 semanas resulta insuficiente para el control total del ToMV, debiéndose probar periodos de tratamiento más prolongados.

Se observa un mejor desarrollo de las plantas crecidas en mangas biosolarizadas y un adelanto en su floración y producción, a pesar de presentar síntomas de su infección por ToMV.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado dentro del proyecto de investigación AGL2002-04040-C05-05 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

### Referencias

- Aparicio V, Rodríguez MD, Gómez V, Sáenz E, Belda JE, Casado E, Lastres J. 1995. Plagas y enfermedades de los principales cultivos hortícola de la provincia de Almería: Control nacional. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca.
- Aramburu J, Galipienso L. 2005. First report in Spain of a variant of Tomato mosaic virus (ToMV) overcoming the Tm-2<sup>2</sup> resistance gene in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Pathology 54: 566.
- Bello A, López JA, Sanz R, Escuer M, Herrero J. 2000. Biofumigation and organic amendments. En Methyl Bromide Alternatives for North African and Southern European Countries 26-29 May 1998, Rome. UNEP, pp. 113-141
- Bello A, López-Pérez JA. 2002. El bromuro de metilo como fumigante del suelo y sus alternativas en España. Phytoma 138: 112-114.
- Bello A, López-Pérez JA, García-Álvarez A, Díaz-Viruliche L. 2003. Biofumigación y control de los patógenos de las plantas. En Biofumigación en agricultura extensiva de regadío (Bello A, López-Pérez JA, García-Álvarez A, eds.). España: Fundación Ruralcaja Alicante: Mundi-Prensa, pp. 343-362.
- Bello A, Díaz-Rojo MA. 2004. Situación del Bromuro de metilo como fumigante del suelo en el año 2005. Usos críticos y alternativas en España. Phytoma 161: 20-25.
- Müller M, Reinhold M, Lange M, Zeise U, Jurgens, Hallier E. 1999. Photometric determination of human serum bromide levels – a convenient biomonitoring for methyl bromide exposure. In Proceedings of the International Symposium on Health Aspects of Environmental and Occupational Exposure, 28 September-1 October 1998 (Leng G, Hadnagy W, eds.). Dusseldorf, Germany, Toxicology Letters, pp. 155 – 159.
- Pérez C. 2001. El sistema estadístico SAS. Prentice Hall. España.
- Pérez C. 2002. Estadística aplicada a través de Excel. Pearson Educación. España.
- Rodríguez-Kábana R. 1997. "Alternatives to methyl bromide soil fumigation". In Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries, 9-12 April 1997 Arona, Tenerife, pp. 17-33.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT® 9.1 User' Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Stepleton JJ. 2000. Solarization in various agricultural production systems. Crop Protection 19: 837-841.
- Thomas W. 1997. Impacto ambiental de bromuro de metilo. En Alternativas al Bromuro de Metilo en Agricultura (Bello A, González JA, Pérez Parra J, Tello J, eds.). Junta Andalucía, Sevilla, España, pp. 13-18.