

NOTAS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LA UTILIDAD DE LOS ANÁLISIS PARA HONGOS FITOPATÓGENOS EN SUELOS Y SUSTRATOS PARA USOS AGRÍCOLAS.

J. Tello Marquina⁽¹⁾, D. Palmero⁽²⁾, M. de Cara⁽¹⁾, J.M. Vázquez Mundo⁽¹⁾, O. Montes Zavala⁽¹⁾, C. Ruiz Olmos⁽¹⁾, A. Moreno⁽¹⁾, C. García Rodríguez⁽¹⁾

¹ Universidad de Almería. Dto. de Producción Vegetal. Cañada de San Urbano s/n. 04120. Almería

² Universidad Politécnica de Madrid. EUIT. Agrícola. Ciudad Universitaria s/n. 28040 Madrid

Los resultados de un laboratorio de fitopatología suelen expresarse mediante boletines analíticos, que carecen de la parte final de un informe que se acoja al epígrafe de dictamen. Se asemejan así a los análisis clínicos para las personas, pero con una diferencia sustancial: en este caso la interpretación la hace el médico. Interpretación que equivale a un dictamen.

Es muy común que agricultores y técnicos pregunten al equipo de protección de cultivos de la universidad de Almería y Madrid por el significado de los análisis que se han realizado sobre las plantas enfermas, y que remitieron a otro laboratorio fitopatológico. En dichos boletines de análisis se aprecia, siempre, la ausencia de un dictamen que interprete los resultados y de las recomendaciones que se consideren oportunas normalmente, sin tener en cuenta que un técnico de campo o un agricultor desconocen la significación de un boletín de análisis fitopatológico de plantas, y, en consecuencia, se adoptan medidas innecesarias o ineficaces.

En este trabajo se tomarán como modelo los análisis de sustratos para semillero de

plantas hortícolas o para cultivos sin suelo (hidroponía) y de suelos cultivados.

Es común que quienes comercializan turba, fibra de coco, perlita, vermiculita, lana de roca o cualquier otro sustrato aseguren que sus productos están libres de patógenos para el cultivo. Esta afirmación parece más posible en los sustratos no orgánicos (perlita, vermiculita, etc.) pero debe tomarse con precaución para los orgánicos (fibra de coco, turba, o cualquier composta). Los archivos que recogen los análisis realizados en las universidades de Almería y Politécnica de Madrid, demuestran que dichas afirmaciones tienen más excepciones de las que serían deseables. Tanto para un tipo de sustrato como para otro. Estas excepciones tendrían importancia menor, si no hubiesen sido patógenos nuevos o de imposible erradicación los transmitidos en algunos casos.

Cuando se trata de un sustrato nuevo, de uno usado o de un suelo cultivado, es muy importante conocer la especie vegetal que se implantará. La cuestión es tan importante que orienta el análisis de la muestra, dando lugar a un resultado útil. Orientación que se

completa cuando se conoce el cultivo anterior.

Varias cuestiones previas deben ser consideradas. **La primera corresponde a la muestra a recoger en el campo o en el almacén.** ¿De 100 sacos de turba o de vermiculita o de cualquier otro tipo de envase para perlita, para fibra de coco y lana de roca, cuál es la muestra a recoger y cómo hacerlo?. La primera idea clara que debe tener el técnico de campo es que tanto para el suelo, como para cualquier sustrato (campo de cultivo o embarque de sacos con sustratos) la muestra se representa a sí misma. Es decir, no hay, hoy por hoy, un muestreo para microbios que represente al conjunto. **La consecuencia analítica inmediata de este hecho es que si los resultados muestran la presencia de uno a varios patógenos, sabemos que éstos están. Pero si dicha presencia es negativa, no puede garantizarse que el total del cual procede la muestra carezca de patógenos.**

La segunda cuestión se correspondería con la siguiente pregunta: **¿Qué tipo de análisis aplicar para conocer solamente los posibles hongos fitopatógenos?.** Existen numerosas técnicas para análisis de suelos y sustratos,

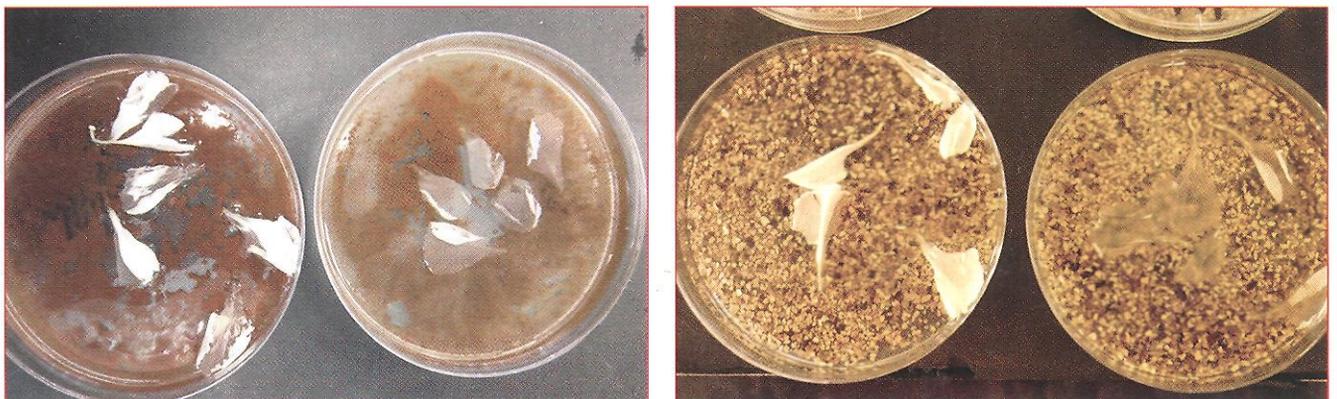


Foto 1a y 1b: Análisis de sustrato (vermiculita) y suelo utilizando trampas vegetales (pétalos inmaduros de clavel). Las placas de Petri a la izquierda de la imagen no han capturado ningún oomiceto. Las de la derecha han atrapado *Phytophthora* (obsérvese el aspecto translúcido de las trampas).

pero no son tantos, ni los medios microbiológicos generales ni los específicos, para abarcar a todos los patógenos edáficos. Esta limitación da una idea de la significación de uno de estos análisis. Además, muchos laboratorios de diagnóstico en sanidad vegetal no están preparados para realizarlos, puesto que no se trata sólo de aplicar una tecnología más o menos laboriosa y compleja. Se trata, especialmente, de que los técnicos estén preparados para interpretarlos: diferenciar las especies, las formas especializadas, las razas o patotipos, etc. Podría decirse que los análisis de la sanidad de un sustrato o un suelo cabe, por duración y complejidad, en el campo de los centros de investigación. Es cierto que las técnicas de análisis de ácidos nucleicos (Reacción en cadena de la polimerasa, PCR) han sido aplicados directamente al suelo, pero hasta donde sabemos su eficacia no ha permitido una transferencia a la rutina de un laboratorio de diagnóstico. Por supuesto, el costo de estos análisis no es barato.

Los párrafos anteriores parecen disuasorios: el costo y la complejidad no los hacen recomendables. Algunos ejemplos podrían servirnos para ajustar su valor y templar la opinión. Los sustratos orgánicos se producen, normalmente, lejos de los lugares de uso. Este hecho podría suponer la introducción de patógenos nuevos en una plantación concreta y en consecuencia en un país. O el más grave, de una introducción en un semillero, lo que posibilita la expansión en una amplia zona durante una sola campaña (ciclo de producción) con la distribución de las plantas. En otras ocasiones la introducción de nuevas enfermedades a través de los sustratos es

discreta y su apariencia es máxima al cabo de unos años. Podrían ponerse algunos ejemplos ilustrativos sobre casos como los señalados: difusión de *Clavibacter michiganensis* s. pp. *michiganensis* (bacteria causante del cancro bacteriano del tomate) vehiculada por semillas y semilleros; o la de algunas formas especializadas de *Fusarium oxysporum*, por ejemplo: *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, causante de la podredumbre del cuello y de las raíces del tomate. Ambos han sido capaces de extenderse en amplias zonas hortícolas europeas en un breve espacio de tiempo.

Las imperfecciones analíticas indicadas anteriormente, o los resultados positivos en lo que concierne a la presencia de patógenos, puede llevar a concluir que la mejor solución, sea o no necesaria, es desinfectar el sustrato o el suelo. Generalmente los fumigantes químicos (bromuro de metilo), ya retirado en la Unión Europea pero no en los países en desarrollo que deberán eliminarlos de los usos agrícolas en el 2015 (caso concreto para México); 1-3 dicloropropeno, en vías de retirada en la Unión Europea; cloropicrina; la mezcla de los dos anteriores; metam sodio y metam potasio; etc.) no esterilizan el sustrato, sólo lo desinfectan y su aplicación permite la supervivencia de microorganismos, entre ellos los patógenos de plantas. La aplicación de vapor de agua, que siendo más eficaz que los fumigantes químicos tampoco esteriliza y calcúlese el costo (elevado) para un invernadero y, no digamos para un campo al aire libre. En fin, todos ellos deben ser usados bajo, como mínimo, dos coordenadas: costo (económico, ambiental, etc.) y eficacia de su función.

Para ajustar si el costo de un análisis de

este tipo es elevado o no, podríamos poner un ejemplo (precios para Almería, España). Así, supóngase que el precio de un análisis tan completo como posible es de 500 (8.500 pesos). Pongamos que una enfermedad edáfica en el tomate nos merma un 10% la producción final comercial. Supóngase que el precio medio por kg a lo largo de la campaña es de 0,70 € (12 pesos). Si se supone una producción media comercial de 150.000 kg·ha⁻¹ (2.542.000 pesos), una sencilla multiplicación nos sitúa en unas pérdidas de 10.500 € (178.500 pesos) por hectárea y el costo de aplicación de un fumigante químico puede suponer unos 4.000 € ha⁻¹ (68.000 pesos). A partir de ahí se puede decidir si el diagnóstico nos permitirá hacer los tratamientos adecuados con la suficiente eficacia y, sobre todo, propiciará tomar las medidas de manejo para los cultivos posteriores. Pero, además, es posible con estos análisis emprender las medidas que la ley permite en la Unión Europea, a partir del *pasaporte fitosanitario*, para los semilleros y los reglamentos de producción de semillas y plantas de vivero que acoge, no tan extensamente como sería deseable, entablar los procedimientos legales para reclamar pérdidas y perjuicios si determinados patógenos están presentes.

Parece procedente explicar con ejemplos cómo deberían interpretarse los resultados analíticos de un sustrato, según el tipo de análisis aplicado. Los análisis que se presentan se practican, habitualmente, en el laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad Almería y del departamento de Producción Vegetal: Botánica y Protección Vegetal de la Universidad Politécnica de Madrid, dichas técnicas son:

NUESTRA EXPERIENCIA A SU SERVICIO

MÁS DE 40 AÑOS CUIDANDO DE SUS CULTIVOS

DAMOS RESPUESTA A TODAS LAS NECESIDADES DE SUS CULTIVOS:

- Amplio catálogo en abonos de todo tipo (NPK para fertirrigación y aplicación foliar, abonos complementarios, correctores, etc.)
- Acaricidas
- Fungicidas
- Herbicidas
- Hormonales
- Insecticidas
- Varios



LUQSA®
LERIDA UNION QUIMICA /SA
FERTILIZANTES Y PRODUCTOS FITOSANITARIOS



Afueras, s/n. 25173 Sudanel (Lleida)
Tel. 973 35 82 56 Fax. 973 25 80 19

E-mail: info@luqsa.com <http://www.luqsa.com>

- Análisis para oomicetos (*Pythium* y *Phytophthora*)
- Análisis para la microbiota fusárica (especies del género *Fusarium*)
- Análisis para la microbiota general (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Alternaria*, etc.)
- Análisis mediante fitopatometría.

1.- Análisis para oomicetos

Especialmente eficiente para *Pythium* y *Phytophthora* (como hongos productores de enfermedades en el suelo). La técnica es aceptablemente simple y se utilizan "trampas vegetales" para la captura de los posibles patógenos. La duración analítica es de un máximo de 6 días.

Los resultados no se cuantifican, se dan simplemente como presencia o ausencia.

La interpretación es relativamente sencilla: *Pythium* es un agente patógeno de plántulas. Sin embargo, desde hace tiempo se ha venido demostrando cómo algunas especies pueden enfermar y matar a plantas adultas de pimiento, judía y pepino por poner algunos casos.

Phytophthora suele enfermar, según las especies, a plantas en plena producción, y es raro que se manifieste en un semillero, pero es evidente que el cepellón puede llevar al hongo al terreno de cultivo con ausencia de síntomas en las plantas.

El dictamen de este tipo de análisis sería:



- a) Si hay presencia de *Pythium* y se trata de un semillero. Tratar la base de las plantas con un fungicida para oomicetos.
- b) Si hay presencia de *Phytophthora* y se trata de semilleros, la recomendación más ajustada sería destruir las plantas y no llevarlas al terreno de asiento.
- c) Si la presencia de *Phytophthora* o *Pythium* ocurre en un cultivo fuera del suelo (hidropónico), manejar el agua de riego para evitar escorrentías. En el caso del suelo seguir la misma regla. Para cultivos futuros de la misma especie, desinfectar el suelo antes de plantar y manejar el agua de riego correctamente. Evitar cualquier tratamiento fungicida, su eficacia es mínima.

2.- Análisis para la microbiota fusárica

Conocidas son las especies de *Fusarium* que causan graves enfermedades en los cultivos. En esta ocasión, y por simplificar la exposición, se tomará como ejemplo una de las especies más comunes en hortalizas: *Fusarium oxysporum*.

El análisis es laborioso, desde tamizar la muestra por un tamiz de 200 µm de luz, hasta

la preparación del medio selectivo conformado por tres suspensiones diferentes, una de sales y azúcares, una segunda de hierro ferroso quelado y otra a base de antifúngicos y antibacterianos. Los resultados se expresan como se indican en el cuadro 1.

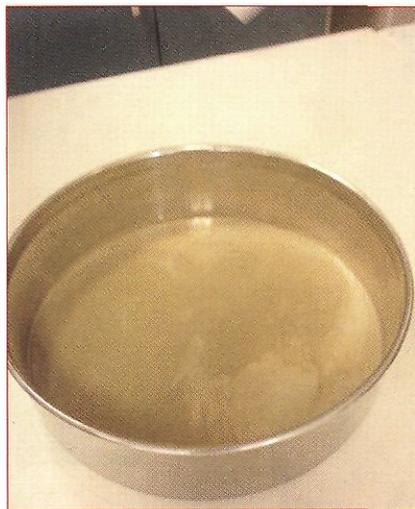
Estos resultados son insuficientes para elaborar un dictamen sobre si las especies de *Fusarium* pueden o no iniciar una enfermedad en un cultivo. Debe tenerse en cuenta que el análisis sólo mide la capacidad de estos hongos para vivir y multiplicarse en la materia orgánica muerta (medio selectivo de análisis), es decir, su capacidad saprofitaria.

Puede comprobarse que algunas medias están seguidas por desviaciones típicas mayores que la propia media, lo cual indica grandes diferencias en el número de colonias por repetición. Es frecuente.

Este tipo de análisis puede tener utilidad para evaluar la actividad de un fumigante, de un fungicida o de cualquier otro procedimiento utilizado para desinfectar. Poco más. De ninguna manera autoriza a sugerir que existe riesgo de fusariosis en tal o cual cultivo, como ocurre normalmente entre los técnicos agrícolas.

Código de Muestra	Especies aisladas			
	F. oxysporum	F. solani	F. equiseti	F. proliferatum
Fibra de coco 1	125 ± 92	17 ± 31	110 ± 70	25 ± 29
Turba negra 1	122 ± 33	12 ± 17	-	-

Cuadro 1: Microbiota fusárica aislada de dos sustratos diferentes. Los resultados se expresan como el número medio de colonias por gramo de sustrato en 16 repeticiones, seguida de su desviación típica.



Fotos 2a, 2b y 2c: Análisis selectivo de suelo para hongos del género *Fusarium*. La 2a muestra el inicio del proceso de tamizado por un cedazo de 200 micras de luz. La foto 2b muestra el suelo listo para ser analizado. La foto 2c muestra el resultado final del análisis. En este caso se aprecian las colonias blancas de *Fusarium solani* que han crecido significativamente más que otros hongos (colonias pequeñas).

¿Cómo podría relacionarse este tipo de análisis con el riesgo de enfermedad en una plantación dada?

Las informaciones técnicas y científicas nos dirigen a deducir que cualquiera de las cuatro especies de *Fusarium* aisladas son capaces de producir enfermedades en diferentes cultivos y es cierto. Pero las preguntas para ajustar la información a nuestro análisis son varias y necesarias tomando para tal fin la especie *Fusarium oxysporum*.

- ¿Todos los aislados de *Fusarium oxysporum* son patógenos de plantas? No, es la respuesta más acorde con la realidad. El planteamiento de esta respuesta es igualmente válido para las otras especies de *Fusarium* reflejadas en el Cuadro 1. Esto significaría que se pueden inocular todas las colonias de *F. oxysporum* sobre una o varias especies vegetales y no mostrar ningún poder patógeno.

- Todavía queda otra cuestión para que el análisis presentado en el Cuadro 1 tuviese una interpretación más correcta. ¿Cuántas colonias de *F. oxysporum* deberán ser inoculadas? Téngase en cuenta que en cualquiera de las dos muestras del Cuadro 1 pueden aislarse de 50 a 100 colonias. En otros casos este número puede llegar a más de 5.000. Hay que tener presente que las inoculaciones deben hacerse en cámaras de ambiente controlado, con iluminación, temperatura y humedad adecuadas y, además, utilizar un sustrato desinfectado en autoclave, macetas y semillas desinfectadas y un sinfín de detalles más. Que cada aislado debe tener, al menos, 3 repeticiones y, que

la duración del periodo de inoculación dura como mínimo 30 días, sin contar el tiempo transcurrido desde la siembra hasta el estado fenológico adecuado para inocular. A partir de estas premisas puede entenderse la limitación del análisis y su costo para unos resultados del tipo: si hay plantas enfermas el patógeno está presente, pero si no aparecen plantas con síntomas no se podrá asegurar su ausencia.

- ¿Cómo se procedería al estudio de la patogenicidad de *F. oxysporum* aparecido en los análisis? Esta cuestión es compleja y de difícil resolución, necesitando el lector interesado una información previa sobre la patogenicidad de *F. oxysporum*.

Este hongo, que es un saprofito muy generalizado en todos los ambientes del planeta, es capaz de especializarse produciendo enfermedad en una sola especie vegetal. Conformando así lo que se conoce como **forma especializada**. Se conocen más de 100 de estas especialidades. La forma científica de expresarlas: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (enferma al tomate y sólo al tomate), *F. oxysporum* f. sp. *melonis* (enferma al melón), *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (enferma a la sandía), y así sucesivamente. Si las cosas son así, ¿sobre qué especies vegetales deben inocularse los aislados de *F. oxysporum* del análisis del Cuadro 1? Pregunta de imposible respuesta puesto que el trabajo tendería a hacerse gigante. Existe una posibilidad de resolución más rápida. Preguntar a quien envió la muestra, qué especie o especies vegetales va a cultivar en el suelo o en sustratos y cual fue el último cultivo y proceder a inocular sobre dichas

especies. La respuesta sería válida, puesto que dada la especificidad de estos hongos si hubiese otra forma especializada que no parasita, por su propia especialización, a las especies que se van a sembrar o plantar no habría enfermedad. Sin embargo, desde el estricto punto de vista científico la cuestión quedaría sin resolver.

En el caso de haber obtenido un resultado positivo, es decir haber detectado la forma especializada, el análisis no habrá concluido. Debería procederse a determinar la **raza fisiológica o patotipo** de dicha forma especializada. Es oportuno recordar que una raza está relacionada con los genes de resistencia presentes en las variedades cultivadas. Quizás un ejemplo pueda aclarar la trascendencia de una raza. El tomate es enfermado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, y del patógeno se han descrito 3 razas, que se relacionan directamente con los correspondientes genes de resistencia en la planta. A un agricultor le importa conocer, además de la forma especializada, las razas o patotipos que tiene en su suelo, para de esa manera poder elegir en el mercado variedades con genes de resistencia a dichos patotipos. Si esto es así, sería necesario proceder a inocular en condiciones controladas las variedades de tomate diferenciadoras de los patotipos para determinar si está presente la raza 0, la raza 1 o la raza 2 de manera individualizada o la mezcla de ellas.

Esta situación de análisis demanda, como mínimo, una duración de 90 días.



Fotos 3a, 3b y 3c: La foto 3a muestra la expresión de síntomas en la parte aérea ocasionados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (obsérvese la intensa clorosis de las hojas). La foto 3b muestra los síntomas radiculares de las plantas que aparecen en la foto anterior (obsérvese en este caso la intensa podredumbre de la raíz principal). La foto 3c muestra las podredumbres en el sistema radical secundario. La expresión de síntomas se obtuvo mediante la técnica de fitopatometría de suelos al cabo de 45 días.

El dictamen que se obtendría de este tipo de análisis, en el supuesto de estar el suelo o el sustrato contaminado por una forma especializada, sería siguiendo el ejemplo del tomate:

Presencia de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, raza 1.

Posibilidades de control:

- Desinfección del suelo o del sustrato antes de plantar.
- Usar variedades con genes de resistencia a la raza 1.
- Injertar las plantas de tomate sobre patrones resistentes a *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.

Pueden utilizarse cualquiera de las recomendaciones individualizadamente o combinar entre ellas.

3.- Análisis para microbiota general de suelos o sustratos.

Este tipo de análisis tiene una utilidad pequeña desde el punto de vista de los patógenos del suelo y de su diagnóstico.

Una de las utilidades se desprende inmediatamente del Cuadro 2, donde el efecto del desinfectante del suelo puede ser evaluado con cierto rigor. La mayoría de los hongos que aparecen son saprofitos de los suelos agrícolas y cumplen un papel extraordinariamente beneficioso para descomponer la materia orgánica muerta, obsérvese a tal efecto el considerable aumento de la microbiota bacteriana, que estaría actuando — y esto es lo más común — como saprofito. El único patógeno cierto en el análisis es *Botrytis cinerea* que causa

la podredumbre gris en numerosas especies vegetales cultivadas. En lo concerniente a las especies de *Fusarium* debería procederse a seguir un protocolo de inoculaciones como en el apartado para análisis de la microbiota fusárica. Tal vez, habría de considerarse la presencia de *Dreschlera* como posible patógeno de césped y de maíz, entre otros.

No es común que en este tipo de análisis se presenten hongos como *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia solani* y otros patógenos de suelo.

El dictamen en este caso se ceñirá a:

- El efecto del fumigante químico ha sido parcial, como es habitual.
- La desaparición de *Botrytis cinerea* después de desinfectar no garantiza la ausencia de enfermedad en el cultivo. Deberá preverse la aplicación al follaje de fungicidas adecuados cuando las condiciones ambientales lo indiquen.

4.- Análisis mediante la técnica del fitopatómetro.

Los tres tipos de análisis presentados anteriormente son complejos y muy largos. Ello no supondría un defecto si los resultados fuesen completos para informarnos sobre el potencial de patógenos existentes en un suelo agrícola. Sin embargo, no ocurre así. Algunos patógenos no pueden ser detectados mediante las técnicas analíticas consideradas anteriormente. Se trata de aquellos microbios conocidos por ser **parásitos obligados**, es decir, que necesitan células vivas de su

hospedador para poder desarrollarse. Y en suelos agrícolas hay algunos causantes de enfermedades muy graves, tal es el caso del hongo *Olpidium bornovanus* que transmite el virus de las manchas necróticas del melón (Melon Necrotic Spot Virus, MNSV), conocido en España como virus del cribado del melón. Ocasiona la enfermedad denominada colapso del melón y de la sandía. Presente en México, Centroamérica y España, entre otros países.

En estas situaciones la técnica denominada fitopatometría de suelos (semejante a la de las plantas trampa), se ha puesto a punto en el laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad de Almería. La técnica ha permitido detectar otros patógenos de manera relativamente sencilla, tal es el caso de formas especializadas de *Fusarium oxysporum*, evitando toda la complejidad explicada anteriormente. *Pythium aphanidermatum* y *Pythium deliense* patógenos del melón y de la sandía y *Pythium myriotylum* patógeno del pimiento. En pocas palabras, la técnica permite hacerse una idea bastante exacta sobre los patógenos que hay en la muestra de suelo o sustrato, en un periodo que oscila entre 20 y 60 días. Permite predecir el nivel de enfermedad que puede haber a lo largo del desarrollo del cultivo.

El dictamen en este caso, acogería a aquellos hongos que se han mostrado directamente patógenos sobre un cultivo y permitiría predecir el riesgo de enfermedad y, por supuesto, dar las recomendaciones más adecuadas.

UNA REFLEXIÓN FINAL

La complejidad analítica de un suelo o un sustrato muestra cuál es la validez de los análisis que se hacen en cualquier laboratorio. Y con esa intención han sido escritas las notas precedentes.

La utilidad de este tipo de análisis también es clara: 1) evitar la introducción y difusión de nuevos patógenos en un cultivo, sea a escala de agricultor, de zona o de país; 2) conocer la eficacia de los tratamientos de desinfección a suelos y sustratos; 3) normalmente los patógenos edáficos no tienen tratamiento eficaz durante el cultivo, por lo que no podría hacerse recomendación alguna al respecto. Sin embargo, los análisis permiten predecir el riesgo para el siguiente cultivo y, consecuentemente adoptar las medidas más adecuadas en cada caso. Otros valores menores podrían ser enumerados, pero los indicados nos parecen suficientes. ■

Hongos aislados	Antes de desinfectar	Después de desinfectar
<i>Aspergillus sp.</i>	35x10 ³	7x10 ³
<i>Alternaria sp.</i>	7x10 ³	-
<i>Acremonium sp.</i>	2x10 ³	5x10 ³
<i>Botrytis cinerea</i>	1x10 ³	-
<i>Cladosporium sp.</i>	150x10 ³	70x10 ³
<i>Dreschlera sp.</i>	2x10 ³	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	5x10 ³	1x10 ³
<i>F. solani</i>	2x10 ³	-
<i>Phoma sp.</i>	2x10 ³	-
<i>Rhizopus sp.</i>	2x10 ³	25 x10 ³
Bacterias	105x10 ³	725 x10 ³

Cuadro 2: Microbiota fungica de un suelo agrícola antes y después de desinfectar con bromuro de metilo. Se expresa en unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco