

3. INDICADORES BIOLÓGICOS PARA EVALUAR LA SUSTENTABILIDAD DE LOS AGROECOSISTEMAS

2.3.3. COMUNIDADES MICROBIANAS - ÍNDICE DE PATOGENICIDAD DEL SUELO - Ejemplo para secuencias hortícolas con aliáceas.

Carolina Leoni, Maria de Vries

Introducción

La sustentabilidad de un sistema de producción puede ser evaluada por su mayor o menor susceptibilidad al desarrollo de epidemias. En particular, la habilidad del suelo para suprimir el desarrollo de enfermedades en los cultivos (“supresividad del suelo”), ha sido mencionada como una medida de la calidad del suelo y del sistema (van Bruggen y Semenov, 2000).

La capacidad de un suelo para favorecer el desarrollo de una enfermedad (“conductividad del suelo”) puede ser evaluado mediante la determinación de la densidad de inóculo del patógeno (número de propágulos del patógeno presentes en el suelo) o mediante el potencial para favorecer el desarrollo del patógeno y/o la infección del huésped (van Bruggen y Grünwald, 1996). Para medir el potencial de patogenicidad del suelo, se han desarrollado diversos bioensayos, que pueden considerar o no la presencia del huésped. Su valor radica en que consideran la globalidad de las comunidades y no solo la/las especie/s patogénica/s de interés, brindando una mejor estimación a la realidad. El potencial de patogenicidad del suelo, puede ser considerado un indicador biológico en la medida que discrimine manejos y/o situaciones productivas.

Los objetivos de este trabajo fueron ajustar un bioensayo para estimar el potencial patogénico del suelo para la podredumbre basal de la cebolla ocasionada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, y ver si dicho bioensayo es capaz de diferenciar manejos en sistemas de producción hortícola que incluyan cebolla como principal cultivo comercial.

Materiales y métodos

Se diseñó un bioensayo en base al desarrollado por Krueger *et al.* (1999) para evaluar variedades de cebolla por su resistencia / tolerancia a la podredumbre basal ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, y al propuesto por Skipp *et al.* (1997) para especies forrajeras, y se determinó el “Índice de patogenicidad” para las diferentes variables según la ecuación: $IP = 1 - (\text{variable "suelo natural"} / \text{variable "suelo desinfestado"})$ (Skipp *et al.*, 1997).

La muestra de suelo (2 kg aprox., compuesta por varias tomas de suelo a 0-10 cm de profundidad) se secó al aire y tamizó por una malla de 1 cm. El suelo seco se humedeció y dividió en dos: una mitad se desinfestó en microondas (1 kg de suelo humedecido y expuesto por 5 minutos a 1250 W) y la otra mitad se dejó “natural”. Macetas de 300cc se llenaron con el suelo (natural o desinfestado) y se sembraron con 30 semillas de cebolla cv. Pantanoso del Sauce – CRS previamente desinfestadas y lavadas para retirar el fungicida presente en la semilla. Las macetas se incubaron en cámara de crecimiento a 21°C y oscuridad por 7 días, seguidas de 14 días a 28°C y fotoperíodo de 12hs luz / 12 hs oscuridad. El día 7 se determinó el número de plantas emergidas, y el día 21 el nº de plántulas total y por clase (1 = plantín sano, 2 = plantín con 1 hoja verdadera y cotiledón, 3 =

plantín sin hoja verdadera, 4 = plantín no desarrollado, 5 = planta muerta o sin germinar) y el peso fresco de las mismas. Finalmente se estimó el peso seco de los plantines luego de 72 hs en estufa a 60°C.

Se calculó el índice de patogenicidad para las variables: emergencia, n° de plantines, desarrollo de los plantines, peso fresco de los plantines, peso seco de los plantines. El desarrollo de los plantines se define para cada muestra de acuerdo a la siguiente fórmula: $((N^{\circ} \text{ plantas en clase 1} * 5) + (N^{\circ} \text{ plantas en clase 2} * 4) + (N^{\circ} \text{ plantas en clase 3} * 3) + (N^{\circ} \text{ plantas en clase 4} * 2) + (N^{\circ} \text{ plantas en clase 5} * 1))$.

Calibración del bioensayo

Para ver si existe una relación entre el IP y los niveles de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* (*Foc*) presentes en el suelo, se inoculó un suelo sin historia de cebolla por más de 10 años, con una suspensión de conidios o con una suspensión de clamidosporas obtenidos a partir de un aislamiento de *Foc* marcado por sus resistencia al benomyl (*Foc* UR 17-8 B8). En la inoculación con conidios se definieron 8 niveles crecientes de inóculo, de 0 a $8,5 \times 10^7$ conidias / ml., mientras que para la inoculación con clamidosporas se definieron 4 (0 , $2,0 \times 10^2$, $2,0 \times 10^4$ y $3,3 \times 10^5$ clamidosporas/ ml). De cada suelo inoculado y posteriormente desinfectada o no, se tomó una muestra para determinar el nivel de *Foc*, mediante plaqueo de diluciones de suelo en medio Komada + benomyl (10 mg/lit). La relación entre los IP y los niveles de *Foc* en el suelo se determinaron mediante regresión lineal simple, previa transformación de las variables para cumplir con las exigencias de normalidad.

Complementariamente, en un experimento de microparcels inoculadas o no con *Foc* sobre el que se impusieron tres secuencias de cultivos con cebolla como cultivo principal, se tomaron muestras de suelos para determinar los IP y niveles de *Foc* en suelo al trasplante y cosecha de la cebolla en la temporada 2010. Los valores de IP obtenidos se graficaron junto con los valores de IP de la calibración y se estableció si se ubicaban dentro del intervalo de confianza (95%) de las ecuaciones de regresión ajustadas.

Uso del bioensayo como indicador del manejo del suelo

En el experimento de microparcels definido anteriormente se tomaron muestras de suelos para determinar los IP y niveles de *Foc* y *Fox* en suelo al trasplante y cosecha de la cebolla en las temporadas 2009, 2010 y 2011, y complementariamente se determinó el rendimiento y la severidad de podredumbre basal causada por *Fusarium*.

Los IP se emplearon para comparar tres secuencias de cultivos: A = cebolla-barbecho-cebolla, B = cebolla – abono verde (sudangras) – cebolla, C = cebolla – morrón – cebolla. Los datos se analizaron mediante ANOVA y cuando fueron significativos se realizó el contraste de medias para establecer las diferencias.

Por regresión lineal simple se evaluó la capacidad de los IP para estimar las poblaciones de *Foc* y *Fox* en el suelo y predecir la respuesta del cultivo (rendimiento y severidad de la podredumbre basal).

Resultados

Calibración del bioensayo

Los análisis de regresión realizados para los diferentes IP muestran que las variables emergencia, desarrollo, peso seco y peso fresco fueron significativas. Se observa que a medida que aumenta el nivel del patógeno (*Foc*) en el suelo, los índices de patogenicidad son mayores, salvo para el peso seco, que contrariamente a lo esperado disminuyó el IP con el aumento del inóculo en el suelo (Tabla 1).

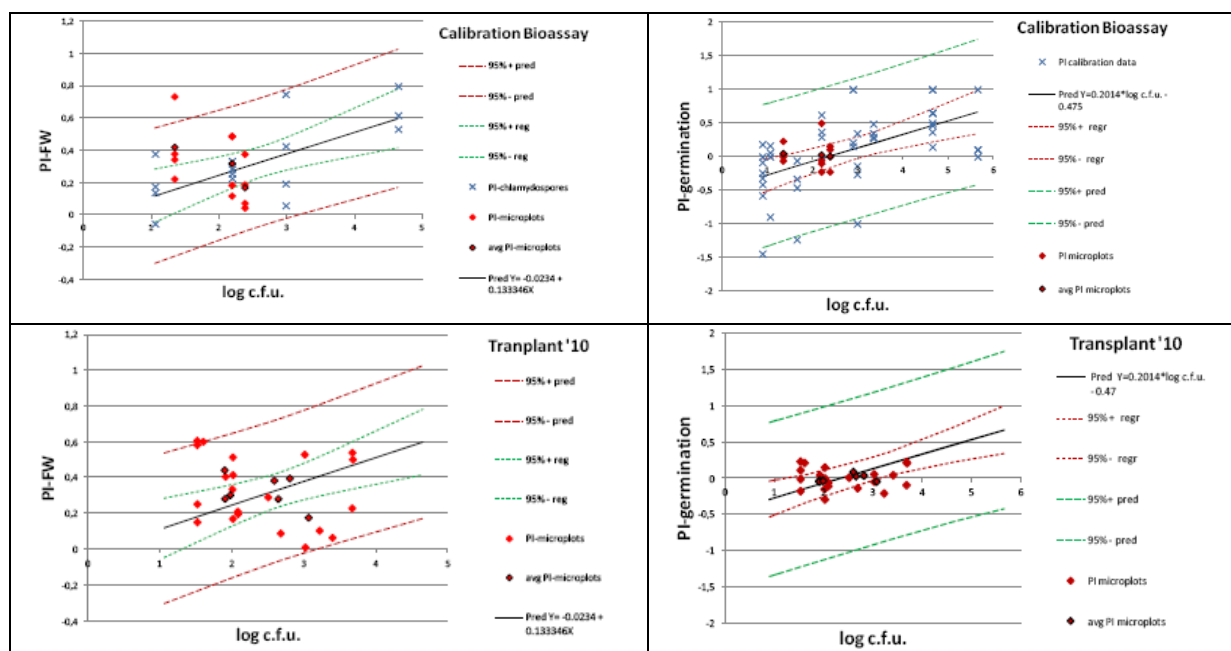
La inoculación con clamidosporas presentó un mejor ajuste que con microconidias (Tabla 1), si bien no hubo interacción significativa en el análisis de varianza realizado. Esto es esperable, pues las clamidosporas tienen un mayor potencial infectivo y capacidad de sobrevivencia en el suelo (Couteaudier y Alabouvette, 1990).

Tabla 1. Regresión lineal simple entre las variables inóculo (log *Foc*) y diferentes índices de patogenicidad (IP) determinados en el experimento de calibración del bioensayo.

IP-variable	Transformación IP ¹	Tipo de inóculo ²	F- test P-values	Ecuación de regresión
Emergencia	raíz cuadrada (IP)	Co	<0.001	y = -0.490 + 0.2033x
		Cl	0.083	y = -0.354 + 0.0921x
		Co + Cl	<0.001	y = -0.475 + 0.2014x
N° plantines	raíz cuadrada (IP)	Co	0.742	y = 0.1104 + 0.0063x
		Cl	0.164	y = 0.0370 + 0.0269x
		Co + Cl	0.647	y = 0.1079 + 0.0072x
Desarrollo	arcsine(IP/100)	Co	0.289	y = 0.2378 + 0.0343x
		Cl	0.014	y = 0.1010 + 0.0994x
		Co + Cl	0.130	y = 0.2446 + 0.0140x
Peso fresco	IP	Co	0.992	y = 0.3849 + 0.0002x
		Cl	0.003	y = -0.010 + 0.1348x
		Co + Cl	0.393	y = 0.3146 + 0.0178x
Peso seco	log(IP)	Co	0.782	y = -0.0551 – 0.0023x
		Cl	0.010	y = 0.0454 – 0.0390x
		Co + Cl	0.391	y = -0.0500 – 0.0066x

¹ Criterio de transformación de las variables dependientes IP, para cumplir con las exigencias de normalidad. ² Co= inoculación con microconidias de *Foc*, Cl= inoculación con clamidosporas de *Foc*.

Al analizar los valores de IP independientes de la temporada 2010, se observa que el 87,5% de los valores de IP-Peso fresco se ubicó dentro del intervalo de confianza de la regresión, y cuando se consideró el promedio de las repeticiones, el 97% de los mismos estuvo dentro de los límites. En el caso de IP-Emergencia, el 100% de los datos se ubicaron dentro del intervalo de confianza del 95% (Figura 1).



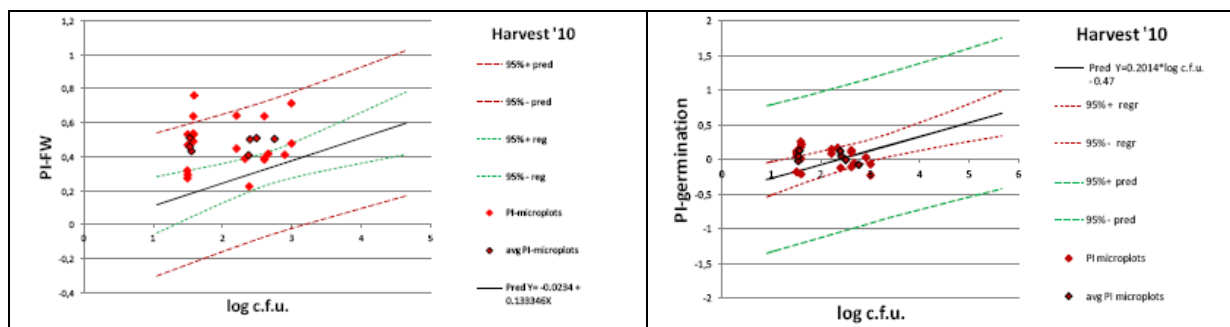


Figura 1. Ajuste de los valores de IP-peso fresco (PI-FW) e IP-emergencia (PI-germination) obtenidos para las muestras de suelo provenientes de las microparcelas, con los valores de la regresión del bioensayo de calibración.
 95% reg: intervalo de confianza de la regresión, 95% pred: intervalo de confianza de la predicción (considera varianza de los puntos + varianza del modelo)

El bioensayo como indicador del manejo del suelo

Al analizar las ecuaciones de regresión vemos el IP-emergencia es capaz de predecir la población de *Foc* en el suelo, tanto al trasplante como a cosecha (Tabla 2). El IP- peso fresco al trasplante ajustó significativamente con la población de *Fox* en el suelo, donde a mayor nivel de *Fox* en el suelo menor es el IP obtenido. Esta relación sugiere un efecto benéfico de la población de *Fox*, posiblemente debido a la competencia entre cepas patogénicas y no patogénicas (Alabouvette, 1999, Edel et al., 1997).

El IP-emergencia al trasplante también predijo la respuesta del cultivo a la enfermedad (severidad de la podredumbre basal) pero no así al rendimiento. La falta de ajuste de los diferentes IP con el rendimiento no sorprende, pues varios factores además de la fusariosis, inciden en la determinación del mismo, entre ellos la disponibilidad de agua y nutrientes en el suelo.

Tabla 2. Regresión lineal simple entre los índices de patogenicidad IP-emergencia e IP-peso fresco y las variables inóculo (log *Foc*, log *Fox*), rendimiento y severidad de la podredumbre basal de la cebolla. Análisis conjunto de las temporadas 2009, 2010 y 2011.

	Trasplante		Cosecha	
	IP-emergencia	IP- peso fresco	IP-emergencia	IP- peso fresco
log (<i>Foc</i>) trasplante	$y = 5.72 + 1.39x^1$ $p = 0.036$	$p = 0.566$	$y = 5.68 + 1.78x$ $p = 0.008$	$y = 4.94 + 2.08x$ $p = 0.076$
log (<i>Fox</i>) trasplante	$p = 0.264$	$y = 8.32 - 2.09x$ $p = 0.004$	$p = 0.551$	$p = 0.410$
log (<i>Foc</i>) cosecha	$p = 0.518$	$p = 0.833$	$p = 0.513$	$y = 3.90 + 2.44x$ $p = 0.016$
log (<i>Fox</i>) cosecha	$p = 0.813$	$p = 0.422$	$p = 0.206$	$p = 0.656$
Rendimiento	$p = 0.220$	$y = 52895 + 18800x$ $p = 0.031$	$p = 0.471$	$p = 0.492$
Severidad	$y = 1.15 + 1.19x$ $p < 0.0001$	$y = 1.24 - 0.77x$ $p = 0.044$	$y = 1.05 - 0.74x$ $p = 0.013$	$p = 0.346$

¹ y: IP-emergencia, IP-peso fresco; x: log (*Foc*) (c.f.u. / g suelo seco), log (*Fox*) (c.f.u. / g suelo seco), Rendimiento (kg/ha), Severidad de la podredumbre basal de cebolla (escala 0-5, donde 0=sin daño y 5=más de 50% del disco basal afectado).

Solamente los IP determinados al trasplante permitieron diferenciar entre manejos (Tabla 3), mientras que los IP determinados a cosecha no. Cuando se consideró cada año por separado, solamente en tres situaciones los IP discriminaron entre manejos: IP-N plantines en la cosecha 2009, IP-emergencia al trasplante 2011 y IP-peso seco al trasplante 2011 (datos no presentados). En todos los casos, el manejo mas intensivo (secuencia: cebolla – morrón) fue el que presentó mayores IP.

Tabla 3. Índices de patogenicidad al trasplante de la cebolla para tres intensidades de uso del suelo, determinadas en el experimento de microparcels con suelo inoculado artificialmente con *Foc*. Datos combinados de los tres años evaluados (2009, 2010, 2011).

	IP – emergencia Trasplante	IP- N plantas Trasplante	IP - peso fresco Trasplante	IP - peso seco Trasplante
Cebolla – Barbecho	0.161	0.219 b	0.353	0.450 b
Cebolla – Sudangras	0.173	0.328 ab	0.458	0.547 ab
Cebolla – Morrón	0.290	0.408 a	0.486	0.602 a
$Pr(>F)^1$	0.045	0.046	0.078	0.017

¹ ANOVA, los análisis se realizaron con los datos transformados. ² Igual letra en la columna no difiere significativamente según Duncan 5%, se presentan las medias por manejo sin transformación.

Discusión y conclusiones

El bioensayo ajustado en el presente trabajo permitió identificar en una primera instancia dos indicadores: IP-emergencia y IP-peso fresco (Tabla 1). El IP-emergencia del bioensayo estaría asociado al potencial de *Foc* de causar muerte de semillas y el IP-peso fresco al potencial de infección en plántula, dos de los síntomas del “damping off”. Si bien el cultivo de cebolla se maneja en base a trasplante de mudas y éstas escapan a esos daños, el IP-emergencia evaluado tanto al trasplante como a la cosecha se asoció al nivel podredumbre

basal de la cebolla, mostrándose como un estimador del potencial de daño en el cultivo si se dan la condiciones para el desarrollo de la enfermedad (Tabla 2).

El IP-emergencia también fue capaz de predecir la población de *Foc* en el suelo, tanto al trasplante como a cosecha (Tabla 2). Esto es importante pues aún no hay disponibles medios de cultivo ni técnicas moleculares capaces de cuantificar las poblaciones de *Foc* en suelo. Para poder utilizar esta herramienta como estimador de la población de *Foc* en el suelo, se debería realizar una calibración para diferentes tipos de suelos, semejante a la ajustada en este trabajo, pues variables ambientales como tipo de suelo y en particular para el caso de *Fusarium oxysporum* la presencia y tipo de arcilla así como el pH del suelo, inciden fuertemente en la dinámica de los microorganismos (Alabouvette, 1999).

Solamente los IP determinados al trasplante permitieron diferenciar entre manejos (Tabla 3). Esto se explica pues a cosecha se impone el efecto del cultivo, que en todos los casos fue cebolla, mientras que al trasplante se ve el efecto del manejo, ya sea barbecho, sudangrass o morrón. Los IP ordenaron los manejos por intensidad de uso del suelo, con valores de IP menores para las secuencias menos intensivas. De todos modos hay que considerar que *Foc* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en plantas no huésped (ver sección 3.2. de esta publicación) y las especies que se incluyen en la rotación imponen efectos diferentes a las comunidades microbianas del suelo, por tanto habría que evaluar la capacidad de los IP aquí definidos para discriminar manejos en un rango más amplio de situaciones productivas, con mas combinaciones de cultivos y tipos de suelo (Dhingra y Coelho Netto, 2001, Garbeva et al., 2004; Kaur y Singh, 2010).

El suelo es un sistema complejo donde coexisten varios procesos mediados por diversas comunidades (Havklicek, 2012). Si bien en el presente trabajo los IP determinados al trasplante no fueron muy “robustos” en su capacidad de separar intensidades de uso del suelo, igualmente podrían integrar el conjunto de indicadores biológicos, físicos y químicos que evalúen los sistemas de producción hortícola que incluyen aliáceas entre sus cultivos principales.

Bibliografía

- Alabouvette, C. 1999. Fusarium wilt suppressive soils: an example of disease-suppressive soils. *Australasian Plant Pathology* 28: 57-64.
- Couteaudier, Y.; Alabouvette, C. 1990. Survival and inoculum potential of conidia and chlamidospores of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini* in soil. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 551 – 556.
- Dhingra, O.D. and Coelho Netto, R.A. 2001. Reservoir and non-reservoir hosts of bean-wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. *Journal of Phytopathology* 149; 463 – 467
- Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Alabouvette, C. 1997. Populations of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations. *Phytopathology* 87: 693-697.
- Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42:243–70
- Havklicek, E. 2012. Soil biodiversity and bioindication: from complex thinking to simple acting. *European Journal of Soil Biology* (2012, article in press). doi: 10.1016/j.ejsobi.2012.01.009
- Krueger, S.K.; Weinman, A.A., Gabelman, W.H. 1989. Combining ability among inbred onions for resistance to *Fusarium* basal rot. *HortScience* 24 (6): 1021 – 1023.

- Skipp, R.A., Watson, R.N., Latch, G.C.M. 1997. Indicators of pathogen potential of pasture soils. En: International grassland congress, 18. Winnipeg & Saskatoon, Manitoba; Saskatchewan; Canada. ID N.1146. 1997. p. 13-14.
- van Bruggen, A.H.C., Grünwald, N.J. 1996. Test for risk assessment of root infection by plant pathogens. p 293 – 310. En: Doran, J.W., Jones, A.J. (Eds.). Methods for assessing soil quality. SSSA Special Publication 49.
- van Bruggen, A.H.C., Semenov, A.M. 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. Applied Soil Ecology 15:13–24

Palabras clave: bioensayo, índice de patogenicidad, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, *Allium* spp.