Universitat de Girona
Escola Politècnica Superior

Treball final de grau

Estudi: Grau en Enginyeria Agroalimentària

Títol: Determinació de l'eficàcia de diferents matèries d'origen biològic utilitzades en tècniques de biofumigació pel control de nematodes del sòl.

Document: Memòria

Alumne: Pau Serarols Vinyes-Miralpeix

Tutor: Isidre Llorente Cabratosa
Departament: Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària
Àrea: Producció Vegetal

Convocatòria: Juny 2016

ÍNDEX

RESUM 4
AGRAÏMENTS 5
1.INTRODUCCIÓ 6
1.1 ANTECEDENTS 6
1.2 BIOFUMIGACIÓ 7
1.3 TIPUS DE BIOFUMIGACIÓ SEGONS L'ORIGEN DE LA MATÈRIA ORGÀNICA 8
1.4 AGENT DE BIOCONTROL *Trichoderma sp.* 9
1.4.1 *Trichoderma harzianum T-22* 9
1.5 NEMATODES 9
1.5.1 CLASSIFICACIÓ DELS NEMATODES FITOPATÒGENS 10
1.5.1.1 Endoparàsits migratoris 10
1.5.1.2 Endoparàsits sedentaris 10
1.5.1.3 Ectoparàsits 11
1.6 GÈNERE PRATYLENCHUS 11
1.7 MÈTODES DE MOSTREIG DE NEMATODES DEL SÒL 12
1.7.1 DISSENY DEL MOSTREIG 12
1.8 MÈTODES PER L'EXTRACCIÓ DELS NEMATODES 13
2.OBJECTIU 14
3. MATERIAL I MÈTODES 15
3.1 ASSAJOS EN CONDICIONS NATURALS 15
3.1.1 Descripció 15
3.1.2 Mètode d'extracció dels nematodes 17
3.1.3 Tractament de les dades 19
3.2 ASSAJOS EN CONDICIONS CONTROLADES 20
3.2.1 Obtenció del sòl 20
3.2.2 Tractaments realitzats 20
3.2.3 Tractament de les dades 22
4.RESULTATS 23
4.1 ASSAJOS EN CONDICIONS NATURALS 23
4.1.1 DADES CLIMÀTIQUES 23
4.2.2 EVOLUCIÓ DE LA DINÀMICA POBLACIONAL 24
4.2.3 EFECTE DELS TRACTAMENTS EN LA POBLACIÓ DE NEMATODES DEL SÒL 25

4.3 ASSAJOS EN CONDICIONS SEMI-CONTROLADES.....30
5.DISCUSSIÓ 33
5.1 ASSAJOS EN CONDICIONS CONTROLADES.....33
5.2 ASSAJOS EN CONDICIONS SEMI-CONTROLADES.....34
6.CONCLUSIONS 35
7.BIBLIOGRAFIA.....36

RESUM

La biofumigació és una tècnica biològica utilitzada pel control dels patògens del sòl i es basa en l'aplicació de matèria orgànica fresca com fems o restes de planta de la família de les crucíferes. El mecanisme d'acció consisteix en l'alliberació de substàncies volàtils com per exemple isotiocianats (ITC's) com a conseqüència de la degradació de la matèria orgànica aportada. Aquests isotiocianats tenen un clar efecte nematicida.

La llista de productes fitosanitaris permesos per el control dels agents nocius del sòl està cada vegada més restringida i és per aquest motiu que alternatives no químiques com la biofumigació van agafant força. Aquestes tècniques són permeses per la normativa de Producció Agrària Ecològica i Producció integrada.

En aquest treball es van dur a terme dos tipus d'assajos diferents. El primer va ser l'avaluació de l'efectivitat de diferents tractaments (enterrat i trinxat de crucíferes, farina de crucíferes, *Trichoderma sp.* i control químic) en el control de nematodes del sòl en una replantació de joves pomeres a l'estació experimental IRTA Mas Badia. El segon va ser l'avaluació de l'eficàcia de diferents matèries d'origen biològic en el control de nematodes en sòls altament colonitzats i en condicions semi-controlades en hivernacle.

En la finca experimental de l'IRTA Mas Badia es van realitzar els tractaments des de novembre de 2015 fins al mes de març de 2016, prèviament a l'inici d'aquest treball. Es van agafar mostres del camp de les diferents repeticions del tractaments durant els mesos d'abril-maig i es va determinar la concentració de nematodes migradors utilitzant la tècnica de l'embut de Baermann.

Els assajos realitzats sota condicions semi- controlades van consistir en posar 600 cm3 de sòl amb població elevada de nematodes i realitzar els tractaments. Passat un període de 30 dies es va determinar el nivell poblacional amb el mètode de l'embut de Baermann.

Dels assajos realitzats en la finca experimental es va determinar que la realització de biofumigació basada en l'enterrament de crucíferes al sòl no va mostrar cap efecte significatiu en el control de les poblacions de nematodes del sòl ni tampoc l'aplicació de farina de crucíferes o de *Trichoderma* sp. comparat amb el control observat en el sòl tractat amb el nematicida dazomet . Tot i això es va observar una certa tendència en els tractaments basats en l'aplicació del fong *Trichoderma* sp. a millorar el control de nematodes al llarg del temps.

En els assajos realitzats en condicions semi-controlades es pot concloure que de tots els tractaments assajats només la saturació del sòl amb aigua va ser molt eficaç en el control de la població dels nematodes. Les aplicacions de farina de crucíferes van presentar un control de la població de nematodes mitjà.

AGRAÏMENTS

Després d'haver acabat aquest treball m'agradaria donar les gràcies a tots aquells que m'han ajudat en el procés.

En primer lloc vull agrair al tutor d'aquest treball, Dr. Isidre Llorente, la seva orientació i ajuda tècnica constant durant el transcurs d'aquest treball. Agrair-te totes les facilitats i coneixements que m'has transmès així com el bon tracte rebut.

Donar les gràcies al departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària per facilitar-me l'ús del material de laboratori i de les instal·lacions.

Agrair també a l'estació experimental IRTA Mas Badia per donar-me la oportunitat de realitzar mostrejos en les seves parcel·les experimentals en els assajos de replantació de pomera així com la utilització del seu material.

També vull agrair especialment l'ajuda dels meus companys de classe, i en especial la d'en Pere, sempre disposat a donar-me un cop de mà quan ho he necessitat. Moltes gràcies de tot cor.

Per últim, vull agrair molt especialment el suport a totes les persones que m'han estat al costat durant la realització d'aquest treball: la família i els amics.

Aquest treball s'ha finançat en el marc del projecte MPCUdG2016/085 (Universitat de Girona).

1.INTRODUCCIÓ

1.1 ANTECEDENTS

En l'actualitat, els consumidors de productes vegetals exigeixen cada vegada més una agricultura que sigui respectuosa amb el medi ambient i la salut dels ciutadans. Aquest fet està provocant un canvi d'enfocament de la producció agrària cap a nous models de gestió dels cultius, en especial en l'apartat de maneig de plagues i malalties (MBTOC, 2007).

En el control dels agents nocius del sòl s'han produït en els darrers anys canvis importants. Per la desinfecció i control dels agents patògens del sòls s'utilitzaven productes que tenien com a matèria activa bromur de metil o Bromometà. Es duien a terme aplicacions massives degut a la seva gran efectivitat (Figura 1). Aquest compost organobromat té efectes clarament biocides i per tant era l'alternativa més eficaç per el control d'agents nocius del sòl. El bromur de metil, però, és altament tòxic i contribueix a la destrucció de la capa d'ozó de manera que és fortament contrari a les actuals directrius de conservació i preservació del medi ambient. Un 87% del total del producte aplicat és difós per l'atmosfera en tan sols 7 dies i, a l'arribar a l'estratosfera es foto-oxida alliberant àtoms de brom que són els responsables de la reducció total de l'ozó (OHR *et al.* 1996).

És per aquest motiu que l'any 2005 es va prohibir el seu ús a l'estat espanyol. Per aquest motiu és necessari utilitzar alternatives químiques o mètodes biològics com per exemple la biofumigació.

En sistemes de producció agrària ecològica (PAE) l'ús de productes químics de síntesi per la desinfecció dels sòls està totalment prohibit. En producció integrada (PI) la possibilitat d'utilitzar productes químics varia en funció de la norma tècnica de cada cultiu. És per això que la biofumigació esdevé com una alternativa molt eficaç per el control de les poblacions nocives de microorganismes del sòl. Un bon control és fonamental per evitar que es produeixin minves en la producció.

Figura 1. Aplicació massiva de bromur de metil. ***Font:*** *(Coyne, Nicol, & Claudius-Cole, 2009)*

1.2 BIOFUMIGACIÓ

La biofumigació és una tècnica que s'utilitza per el control de patògens del sòl. Aquesta tècnica consisteix en grans aportacions de matèria orgànica fresca al sòl juntament amb grans aportacions d'aigua per tal de garantir condicions d'anaerobiosi. Les matèries aportades solen ser plantes de la família de les crucíferes així com fems animals. Si aquesta tècnica s'efectua correctament es poden aconseguir resultats semblants als mètodes químics, molt restringits darrerament. (Bello *et al.,* 2008a, 2010b)

Les aportacions de matèria orgànica juguen un paper molt important ja que, a part de l'efecte biocida vinculat a la seva descomposició, actuen com a corrector del sòl: fomenten una bona estructura mitjançant la unió amb les partícules d'argila del sòl i activen els microorganismes antagonistes dels patògens del sòl (Igelmo, 2014).

La biofumigació es fonamenta en l'acció biocida de les substàncies volàtils produïdes en la biodescomposició de la matèria orgànica fresca (Bello *et al.,* 2008).

El procés té un total de tres etapes (Figura 2).

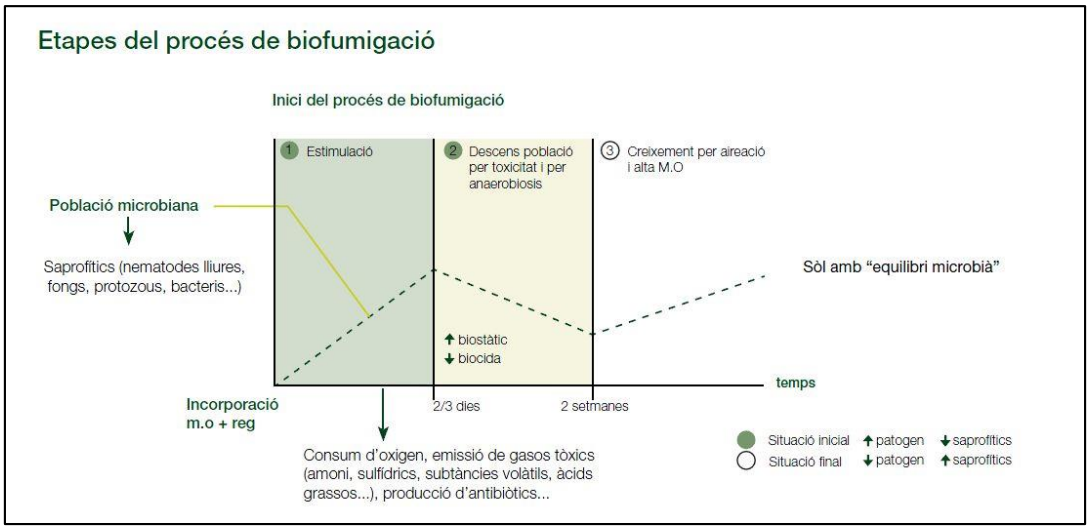

Figura 2. Etapes del procés de biofumigació. ***Font:*** *(Igelmo, 2014)*

A continuació es descriuen les etapes del procés de biofumigació:

- **1a etapa:** L'efecte biocida de les substàncies volàtils com els isotiocianats (ITCs) i d'altres com l'amoni sobre les poblacions de patògens només es dóna en aquesta etapa, que té una duració d'uns 2-3 dies (Bello *et al.,* 2008). La població de fongs saprofítics, que són aquells que s'alimenten de residus procedents d'altres organismes, es veu afavorida per l'increment de matèria orgànica del sòl. En aquesta fase el contingut d'oxigen va disminuint constantment degut al consum que en fan les creixents poblacions de microorganismes. Garantir condicions totals d'anaerobiosi són fonamentals per el correcte desenvolupament de la tècnica. Aquesta primera etapa és la més important ja que és on s'assoleix el màxim de població microbiana, el màxim contingut de substàncies volàtils nocives pels patògens i el mínim contingut d'oxigen.

- **2a etapa:** Un cop passats els efectes nocius immediats de les substàncies generades anteriorment s'inicia aquesta etapa que es caracteritza per la "normalització" de la situació. Hi ha una disminució general de les poblacions de microorganismes presents en el sòl degut a les pobres condicions generades en la primera etapa. Amb l'aplicació de matèria orgànica s'afavoreix la supervivència de fongs saprofítics amb poder fungistàtic, és a dir, que provoquen el desplaçament dels fongs patògens per competència.

  A causa de la pèrdua d'aigua progressiva, el segellat del sòl disminueix, augmentant el contingut en oxigen i permetent l'alliberació de les substàncies biocides generades en la primera etapa.

- **3a etapa:** Les dues primeres etapes tenen una durada de 2 setmanes. Un cop aquestes han acabat els microorganismes del sòl s'estabilitzen en funció de la situació deixada en les etapes anteriors, és a dir, predominen les colònies de microorganismes saprofítics i antagonistes sobre les de patògens. Un cop s'ha arribat aquest punt es considera la tècnica finalitzada, podent implantar nous cultius lliures d'agents patògens a partir dels 2-3 dies següents.

1.3 TIPUS DE BIOFUMIGACIÓ SEGONS L'ORIGEN DE LA MATÈRIA ORGÀNICA

Existeixen dos mètodes principals per dur a terme un procés de biofumigació. Aquests mètodes varien en funció de l'origen de la matèria orgànica utilitzada:

- **Biofumigació amb fems o altres restes orgàniques:** consisteix en la utilització de matèria orgànica d'origen animal com per exemple fems (ovella, cabra, vaca i gallina) o altres restes orgàniques (indústries forestals i paper, indústries de peix i marisc, subproductes agrícoles,...). En el cas d'utilitzar fems, la seva aplicació ha de ser ràpida ja que és quan aquest material orgànic té més poder biofumigant. Les dosis aplicades són de l'ordre de 25-50 tn/ha, depenent del tipus de fem utilitzat i de l'afectació produïda pels patògens del sòl a controlar (Bello *et al.,* 2008).

- **Biofumigació amb crucíferes:** Aquesta alternativa consisteix en utilitzar plantes de la família de les crucíferes com a font de matèria orgànica per la biofumigació. Gran part de les plantes d'aquesta família són aptes per ser utilitzades en tècniques de biofumigació. És tracta d'una alternativa barata i que no presenta gaires dificultats en el maneig.

  Les crucíferes contenen uns compostos anomenats glucosinolats (Kjaer, 1976, a Bello *et al.,* 2008) que quan s'hidrolitzen per acció de l'enzim mirosinasa donen lloc als isotiocianats. Aquests isotiocianats resultants de la hidròlisi són biocides molt eficaços contra nematodes, bacteris, fongs, insectes i la germinació de llavors (Bello *et al.,* 2008). L'eficàcia de les crucíferes depèn de diversos factors però principalment: l'espècie utilitzada, la correcte incorporació al sòl, l'activitat enzimàtica de la mirosinasa i les pèrdues per volatilització (Brown i Morra, 1997, a Bello *et al.,* 2008).

1.4 AGENT DE BIOCONTROL *Trichoderma sp.*

Trichoderma sp. és un fong que pertany a la divisió dels ascomicets. És un fong molt comú en els sòls que també pot trobar-se en material vegetal en descomposició i fems. *Trichoderma sp.* és utilitzat en agricultura com agent de control biològic gràcies a les seves propietats com a biopesticida, biofertilitzant i bioestimulant. Aquest fong té facilitat per colonitzar les arrels de les plantes i desenvolupa mecanismes per atacar i parasitar altres fongs.

Aquest fong produeix tres tipus de propàguls: hifes, clamidòspores i espores (Papavizas, 1985). Les espores són els propàguls més viables utilitzats en programes de biocontrol (Matroudi, 1985).

1.4.1 *Trichoderma harzianum T-22*

En aquest treball s'utilitza la soca de *Trichoderma: harzianum T-22*. Es tracta d'un promotor del creixement que actua també com fungicida biològic preventiu per el control de malalties radiculars d'un gran nombre d'espècies vegetals. Quan aquest fong és aplicat al sòl té la capacitat de desenvolupar-se ràpidament donant protecció a les arrels davant certs patògens.

Aquesta soca de *T. harzianum* protegeix les arrels de forma preventiva i promou el creixement de pels absorbents i arrels adventícies així com l'absorció d'aigua per part del cultiu. També allibera compostos d'índole hormonal i sideròfors (Ferro) que permeten incrementar la disponibilitat de macro i micronutrients per la planta.

El mecanisme d'acció nematicida d'aquest fong consisteix en la digestió completa dels nematodes. Els nutrients provinents dels nematodes són utilitzats per formar noves estructures fúngiques (hifes, espores, ...) (Yedidia & Benhamou, 1999).

1.5 NEMATODES

Els nematodes pertanyen al regne Animàlia i fílum nematoda. Els nematodes són vermiformes, és a dir, tenen una morfologia similar als cucs, però en són molt diferents taxonòmicament. Existeixen milers d'espècies de nematodes. N'hi ha que viuen en aigües dolces, salades o simplement a terra, però diversos centenars d' aquestes espècies s'alimenten de plantes vives (Agrios, 2002). El control i tractament d'aquestes espècies fitopatògenes són l'objecte d'aquest treball.

Els nematodes fitopatògens tenen una llança o estilet a la punta que els permet alimentar-se dels organismes vius (Figura 3). Els nematodes utilitzen l'estilet per injectar enzims dins les cèl·lules i teixits vegetals i així extreure'n el seu contingut. Per fer-ho realitzen vàries punxades.

Degut a aquestes punxades esdevenen una important amenaça per la disseminació de gran varietat de malalties a les plantes de tot el món. Les pèrdues anuals a tot el món causades per nematodes fitopatògens són de l'ordre del 14%. Aquesta xifra es tradueix en un total de més de 70 billons € (Agrios, 2002).

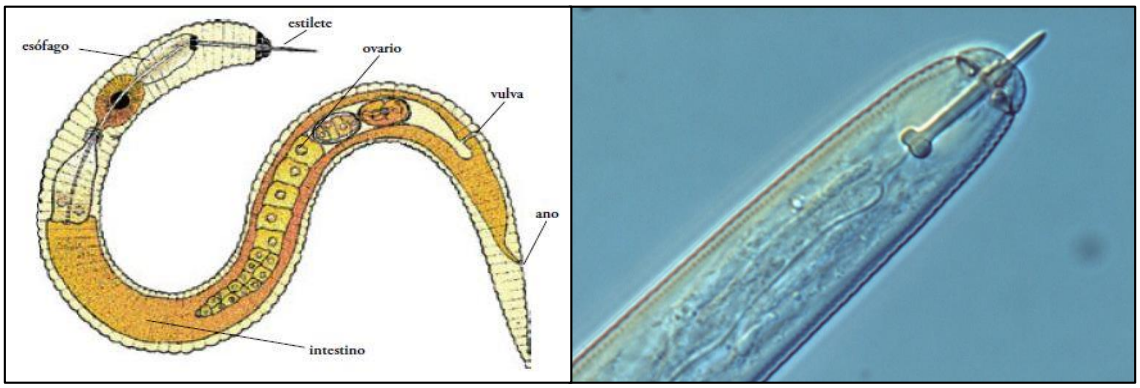

Figura 3. Estructura d'un nematode fitopatogen. Detall de l'estilet. ***Font:*** *(Coyne, Nicol, & Claudius-Cole, 2009)*

Els nematodes fitopatògens poden classificar-se segons el seu hàbitat i mobilitat en tres grans grups:

- Endoparàsits migratoris
- Endoparàsits sedentaris
- Ectoparàsits

1.5.1.1 Endoparàsits migratoris

Aquest tipus de nematodes són mòbils en tots els estadis del seu cicle de vida, excepte l'ou. Els nematodes perforen el teixit vegetal i es desplacen de cèl·lula en cèl·lula, o poden abandonar-les per buscar nous llocs on alimentar-se. Mentre s'alimenten normalment dipositen els ous en el teixit cortical de la planta, que és la regió situada entre la part superficial de l'arrel i els tubs vasculars. Els ous també poden dipositar-los en les zones de sòl properes a l'arrel. Les cèl·lules afectades per els nematodes alliberen toxines que provoquen la mort de les cèl·lules veïnes provocant lesions necròtiques dels teixits. Les ferides provocades per aquets microorganismes són una entrada directe per altres agents patògens del sòl com per exemple fongs o bacteris. Els principals gèneres de nematodes endoparàsits migratoris són: *Pratylenchus, Radopholus, Hirschmanniella* (Coyne, Nicol, & Claudius-Cole, 2009).

1.5.1.2 Endoparàsits sedentaris

Els nematodes ectoparàsits juvenils de segon estadi recent sortits dels ous són els que normalment colonitzen els teixits de la planta, donant lloc al que s'anomena estadi infectiu. Aquests es mouen a través de les partícules del sòl per localitzar les arrels de la planta hoste. S'alimenten del teixit de la zona radicular. En aquest mateix teixit s'allotja la femella i és aquí on viu la resta del seu cicle de vida. A mesura que aquesta es va desenvolupant el seu cos s'infla i adopta formes esfèriques de diferent tipus. Les femelles solen produir una gran quantitat d'ous, que poden romandre dins el seu cos o bé acumular-se en masses d'ous adherides al seu cos.

Els mascles mantenen una morfologia vermiforme durant tot el cicle de vida. S'alimenten dels teixits de les arrels i fecunden les femelles abans de migrar cap al sòl, on moren.

Els principals gèneres de nematodes endoparàsits sedentaris són *Meloidogyne, Nacobbus, Heterodera* y *Globodera* (Coyne, Nicol, & Claudius-Cole, 2009).

1.5.1.3 Ectoparàsits

Els nematodes ectoparàsits s'alimenten sobre la superfície de la planta externament, normalment de pels radicals o teixits corticals. Normalment es distribueixen en grans densitats poblacionals però no sempre esdevenen un problema significatiu. Si la planta pateix estrès de caràcter biòtic o abiòtic (atacs fúngics o poca disponibilitat d'aigua) aquest tipus de nematodes poden representar un problema greu. Alguns nematodes ectoparàsits actuen com a vectors transmissors de virus de plantes.

Alguns dels gèneres de nematodes ectoparàsits són *Criconemoides, Helicotylenchus, Longidorus i Trichodorus* (Coyne, Nicol, & Claudius-Cole, 2009).

1.6 GÈNERE PRATYLENCHUS

Els anàlisis de dinàmica poblacional i la determinació de l'eficàcia dels diferents productes biofumigants d'aquest treball es faran en base a aquests nematodes. *Pratylenchus spp.* és un gènere de nematodes destructiu per moltes plantes. Es tracta d'un gènere de nematodes endoparàsits migratoris. Aquests es mouen lliurement entre les arrels i el sòl. Un símptoma característic dels atacs és l'aparició de lesions estretes i allargades a la superfície de les arrels. Aquests nematodes reben també el nom de nematodes lesionadors (Dropking, 1989).

El cicle de vida d'aquest gènere de nematodes té una durada de 5 setmanes, depenent de la temperatura i l'estat de l'hoste. Els ous són depositats als teixits de les arrels i eclosionen quan el nematode esta en el segon estadi juvenil. Dins l'ou el nematode duu a terme la primera muda. Després d'eclosionar tenen 3 mudes més fins a convertir-se en adults mascle o femella. Totes aquestes mudes són infectives per les arrels. El nematode ataca la superfície de l'arrel causant una disminució del sistema radicular i lesions en les arrels afectades. Els teixits corticals envaïts es col·lapsen i finalment es desintegren. Els nematodes abandonen les zones lesionades al descompondre's les arrels (Guharay, 2000).

Els nematodes d'aquest gènere són elongats amb una longitud que pot variar entre 340-800 µm. Tenen una morfologia vermiforme. *Pratylenchus spp.* es caracteritza per tenir el cap pla, una forta armadura cefàlica i un estilet curt i gruixut, de 14-20 µm de longitud (Figura 4). Els mascles tenen una mida inferior a la de les femelles (Dropking, 1989).

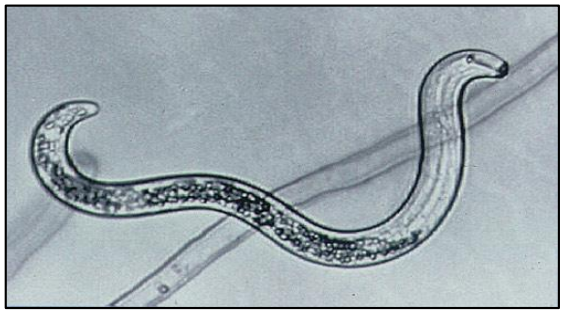

Figura 4. Nematode del gènere Pratylenchus. ***Font:*** *(Díaz, 2001)*

1.7 MÈTODES DE MOSTREIG DE NEMATODES DEL SÒL

El moment i mètode de mostreig és clau per obtenir mostres representatives per analitzar. Per extreure les mostres de sòl s'utilitzarà una barrina de mitja canya.

Hi ha un seguit de característiques del sòl que s'han de tenir en compte a l'hora de realitzar el mostreig:

- La distribució en agregats dels nematodes deguda al sistema radicular de la planta
- El comportament estacional del nematode.
- Tipus de cultiu i historial d'aquest
- Les àrees plantades amb diferents varietats
- Humitat del sòl
- Compactació del sòl
- Tipus de sòl
- Temperatura i canvis estacionals

Les recomanacions del número de mostres a obtenir en una superfície de 0,5 hectàrees és de com a mínim 10 mostres i com a màxim 50 (Coyne, Nicol, & Claudius-Cole, 2009).

1.7.1 DISSENY DEL MOSTREIG

Els nematodes no solen estar distribuïts de forma uniforme en el camp, de manera que en els focus principals és on hi ha la major concentració. Les mostres s'han de prendre de vàries zones, amb l'objectiu de que aquestes siguin representatives. S'han de recollir mostres per separat de les zones on el creixement de les plantes sigui pobre així com de les zones on el creixement sigui relativament correcte, per així poder efectuar comparacions. Si es mostregen diferents parcel·les, s'ha de seguir la mateixa metodologia en totes.

El procediment de mostreig pot ser a l'atzar o sistemàtic (Figura 5). El mostreig a l'atzar no s'adequa a la distribució natural dels nematodes i només és representatiu si l'àrea de mostreig és petita. El mostreig sistemàtic esdevé un procediment més estructurat per obtenir les mostres ja que així es té en compte les diferents zones del camp en funció de l'afectació i la distribució dels nematodes (Coyne, Nicol, & Claudius-Cole, 2009).

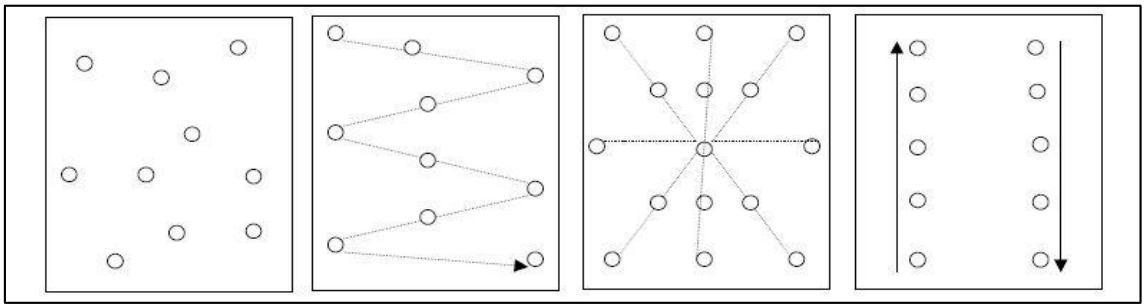

Figura 5. Diferents dissenys de mostreig. El primer a l'atzar, la resta sistemàtics.

1.8 MÈTODES PER L'EXTRACCIÓ DELS NEMATODES

- **Mètode de l'embut de Baermann:** Aquest mètode consisteix en utilitzar un embut de mida gran, de 12 a 15 centímetres de diàmetre, al qual s'hi connecta un tub de goma. Aquest tub de goma es tenca per la part de sota mitjançant una pinça. L'embut es col·loca sobre un suport i s'omple amb aigua. La mostra de sòl, col·locada prèviament dins un vas de precipitats estèril, es cobreix amb una malla filtrant subjectada per una goma de plàstic. El vas de precipitats s'inverteix dins l'embut, de manera que l'aigua posada prèviament a l'embut toca la superfície del sòl. Després d'aquesta operació es deixa reposar de 24-48 hores. Els nematodes vius es mouen activament i migren a través del filtre cap a l'aigua i arriben fins el final del tub de goma tancat amb la pinça. Més del 90% dels nematodes vius es recuperen en els primers 5-8 mil·lilitres d'aigua extrets del tub de goma (Agrios, 2002).

- **Tamisatge:** Aquest mètode es basa en realitzar filtracions successives disminuint progressivament la mida dels porus dels sedassos per tal de capturar els nematodes. Es tracta d'agafar una petita mostra de sòl, de l'ordre de 300 cm^3, i barrejar-la amb un cert volum d'aigua, dins una galleda. Es tracta que la dissolució sigui líquida. Aquesta dissolució es fa passar a través d'una malla de 20 forats per polzada quadrada, amb l'objectiu de filtrar els residus de grans dimensions. El següent pas és repetir la operació amb un sedàs de 60 forats per polzada quadrada. Un cop realitzada aquesta operació s'agafa un sedàs molt més fi, de 300 forats per polzada quadrada, i es torna a realitzar la mateixa operació. En aquest cas els nematodes quedaran recol·lectats al fons de la galleda. Per una millor concentració dels nematodes, es posarà la barreja final a l'embut de Baermann (Agrios, 2002).

- **Centrifugació:** Aquest mètode és el més interessant ja que la recol·lecció dels nematodes es realitza en funció de la seva densitat, i no de la seva mobilitat, a diferència dels dos mètodes esmentats anteriorment. Es basa en posar la mostra, prèviament filtrada, en tubs d'assaig dins una centrifugadora. La velocitat és de 3000 RPM durant 4 minuts. Els nematodes i altres residus queden al fons dels tubs d'assaig. Es buida mig tub d'assaig i s'emplena el mig tub restant amb una solució de sucre. Es tapen el tubs i es sacsegen fins que quedin les partícules en suspensió. Els tubs d'assaig es centrifuguen una altra vegada a 3000 RPM durant 1-2 minuts. La solució resultant es passa per un sedàs amb l'objectiu de rentar-la dels sucres. Els nematodes nets queden recollits en un recipient i estan preparats per la seva observació i recompte (Agrios, 2002).

2.OBJECTIU

L'objectiu d'aquest treball és determinar i avaluar l'efecte de diferents mètodes de biofumigació pel control de nematodes del sòl en dos tipus d'assajos diferents (condicions de camp i condicions semi-controlades). Per fer-ho els objectius parcials han estat els següents:

- Determinació de l'eficàcia de diferents substàncies d'origen biològic basades en crucíferes i en el fong *Trichoderma spp.* pel control de nematodes de sòl migratoris en assajos en un camp de replantació de pomera.

- Determinació de l'eficàcia de diferents substàncies d'origen biològic basades en crucíferes i en el fong *Trichoderma spp.* pel control de nematodes de sòl migratoris en assajos en condicions semi-controlades

3. MATERIAL I MÈTODES

En aquest treball es varen realitzar dos tipus d'assajos:

- Assajos en condicions naturals
- Assajos en condicions semi-controlades

3.1 ASSAJOS EN CONDICIONS NATURALS

3.1.1 Descripció

Aquest projecte s'inclou dins un treball molt més ampli desenvolupat per l'Estació Experimental Mas Badia per tal de determinar les condicions òptimes de replantació de pomera tant des d'un punt de vista sanitari com d'altres paràmetres productius. El disseny de mètodes i productes i l'aplicació d'aquests estava ja realitzat quan es va començar aquest Treball Final de Grau (TFG). El camp experimental utilitzat estava localitzat a la Tallada d'Empordà (Baix Empordà) a pocs metres de l'Estació Experimental Mas Badia i en el sòl hi havia hagut nivells poblacionals molt alts de nematodes del gènere *Pratylenchus spp*.

En el camp experimental s'hi va fer una replantació amb fruiters joves (Figura 6). Es van plantar pomeres de la varietat *Jeromine*. El marc de plantació d'aquestes pomeres va ser de 3,5 x 1 m. Aquesta replantació es va dur a terme l'any 2016. Les arrels d'aquesta espècie, un cop els arbres siguin adults, exploraran una fondària mitja d'uns 90-100 centímetres si bé en els estadis inicials la major densitat radicular i, per tant, la zona principal d'acció dels nematodes es trobarà a una profunditat de 30-50 centímetres (FAO, 1998). El sòl d'aquestes parcel·les té una textura franc-arenosa amb bona capacitat drenant. En aquest assaig es van fer proves, entre altres, de diferents matèries amb caràcter biofumigant.

Figura 6. Parcel·les experimentals de l'estació IRTA Mas Badia.

En el disseny experimental seguit en aquest TFG hi havia un total de tres parcel·les (Figura 7) que inicialment van rebre els següents tractaments:

- **Biofumigació:** En el sòl d'aquesta parcel·la prèviament s'hi van enterrar crucíferes. El mes de novembre de 2015 es van sembrar dues espècies diferents de crucíferes: Naps *(Brassica Rapa)* i Mostassa *(Brassica Campestris).* El dia 01/02/2016 aquestes plantes van ser trinxades i enterrades. Uns dies després d'aquestes operacions aquestes parcel·les van rebre la resta de tractaments.

- **Químic:** En aquesta parcel·la es van fer aplicacions del producte fitosanitari *Basamid*. Aquest producte és elaborat per Certis Europe i té com a matèria activa Dazomet al 98%. L'aplicació d'aquest producte es va fer el dia 10/02/2016 amb una dosi de 50 grams/m^2. Es tracta d'un producte autoritzat per la normativa Europea i que actua contra insectes, fongs, nematodes i herbes. Aquest tractament es va realitzar com a referència de control químic.

- **Control:** Aquesta parcel·la no va rebre cap tractament. Corresponia al control no tractat.

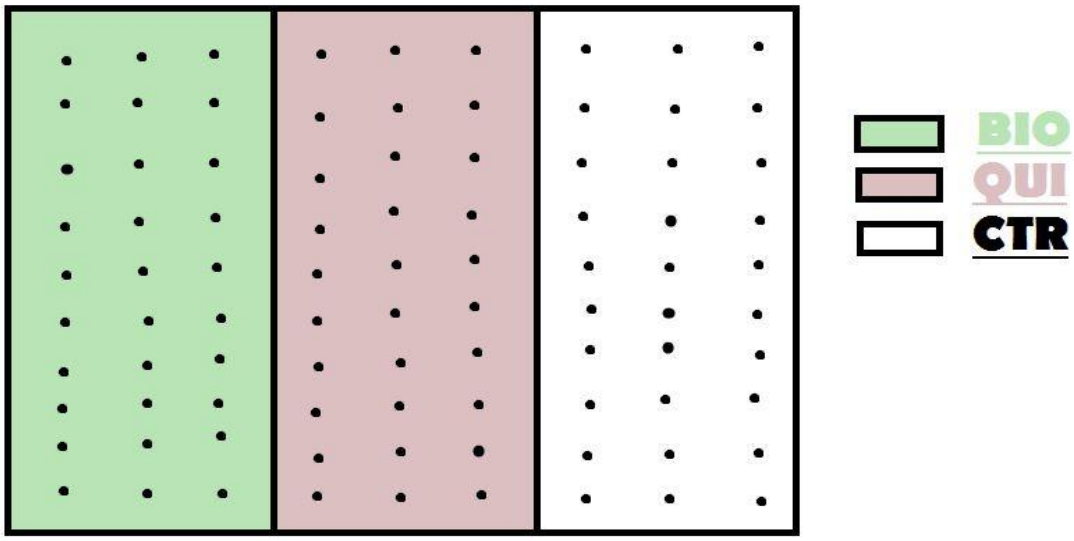

Figura 7. Croquis de la distribució de les parcel·les. Cada filera té uns 56 arbres aproximadament. D'esquerra a dreta: tractament amb biofumigació (BIO), químic (QUI) i control no tractat (CTR).

Posteriorment, a cadascuna de les parcel·les es van aplicar sis tractaments diferents en les corresponents subparcel·les. Per aquest treball només es van tenir en tres d'aquests tractaments, amb les seves corresponents repeticions. Aquests van ser:

- Testimoni no tractat

- Tractament amb *Trichoderma harzianum* T-22 (concentració $1 \cdot 10^9$ espores/gram). Aplicació el 29/03/2016 amb una dosi de 30 kg/ha.

- Tractament amb farina de crucíferes: Aplicació el 18/03/2016 amb una dosi de 2,14 kg/arbre.

Totes les parcel·les tenien una instal·lació de reg per degoteig amb un cabal de 4 litres per hora i arbre. La coberta vegetal que apareixia entre fileres era segada periòdicament i tractada amb herbicida.

3.1.2 Mètode d'extracció dels nematodes

La metodologia emprada en aquest tipus d'assaig va començar amb el mostreig a camp. Per tal de recollir mostres representatives es va efectuar un mostreig de tipus sistemàtic, és a dir, es van agafar mostres de les diferents repeticions en el punt central de cada sub-parcel·la. Amb una barrina de mitja canya es van extreure les mostres de sòl a una profunditat d'entre 20 i 30 centímetres. Aquestes mostres, amb un pes aproximat de 120 grams, van ser introduïdes dins envasos estèrils amb molta cura evitant excessos de temperatura que poguessin malmetre les poblacions de nematodes. Es va agafar una mostra per cada repetició i tractament amb un total de tres repeticions per tractament i sub-parcel·la. Posteriorment es portaven les mostres al laboratori de Patologia Vegetal de la Universitat de Girona. Es van realitzar un total de quatres mostrejos en les següents dates: 08/04/2016; 22/04/2016; 06/05/2016; 19/05/2016.

Un cop al laboratori es van preparar les mostres seguint el mètode de l'embut de Baermann descrit anteriorment (apartat 3). Els pots estèrils plens de terra es van destapar i es van cobrir amb paper i malla filtrant. Per altre banda es van preparar els diferents embuts i es van posar en un suport de fusta. Després d'aquesta operació es van introduir els vasos ja preparats dins els embuts. Es van tancar els tubs de cada embut amb una pinça i es va procedir a emplenar-los amb aigua destil·lada. Al posar els vasos en contacte amb l'aigua es crea un flux que els nematodes segueixen, quedant col·leccionats a la part inferior. Un cop es van tenir les mostres preparades es van deixar un període de 48 hores per tal de que els nematodes migradors caiguessin per gravetat al fons del tub (Figura 8).

Figura 8. Mètode de l'embut Baermann.

Passades 48 hores, mitjançant pinces de Mohr s'obstruia el tub per la part superior per impedir que es buides tota l'aigua i posteriorment es treia la pinça inferior, per tal d'obtenir les fraccions d'aigua plenes de nematodes. El volum aproximat era d'uns 15 mL. Aquestes mostres d'aigua van ser posades dins tubs per centrífuga (Figura 9).

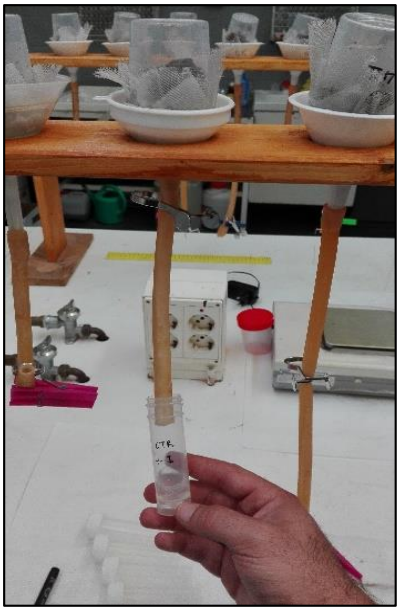

Figura 9. Extracció de l'aigua amb nematodes.

Els vasos estèrils, un cop realitzades les extraccions, es van deixar dins l'estufa 48 hores a 50º. Posteriorment es van pesar. Aquesta operació es va dur a terme per tal de treballar amb pesos secs del sòl, ja que la humitat no és sempre la mateixa i això produiria cert error en els resultats.

Un cop obtingudes totes les mostres es van posar dins una centrífuga a una velocitat de 4000 RPM durant 10 minuts. La finalitat d'aquesta operació era accelerar el procés de sedimentació dels nematodes presents en la mostra. Si aquest procés es duu a terme correctament tots els nematodes queden recollits en el fons dels tubs de centrífuga.

Les mostres obtingudes directament per el mètode de l'embut Baermann van ser dipositades dins uns tubs amb forma cònica en la seva part inferior. Aquesta morfologia dels tubs permet acumular tots els sediments, inclòs nematodes, a la punta del con després d'haver passat per la màquina centrifugadora. Aquesta forma cònica té un volum exacte d'1 mil·lilitre (Figura 10).

Es va procedir a fer el recompte dels nematodes en el microscopi. Primerament es va començar realitzant 3 observacions de 20 µL de cada mostra tot i que posteriorment es va considerar innecessari ja que la primera gota que s'observava del fons del tub contenia pràcticament la totalitat de nematodes existents en la mostra.

Per aquest motiu i amb la finalitat d'agilitzar el procés de recompte de nematodes es va calcular un coeficient corrector per tal d'ajustar la relació del número de nematodes que s'observaven en la primera gota respecte el contingut total de nematodes que hi havia dins el tub de centrífuga. Per calcular aquest coeficient es van agafar diferents mostres i es van realitzar tres observacions de cadascuna determinant quin nombre de nematodes es veia en cada repetició. Amb els resultats d'aquestes observacions es va poder determinar el percentatge de nematodes respecte el total que s'observava en la primera gota (Taula 1).

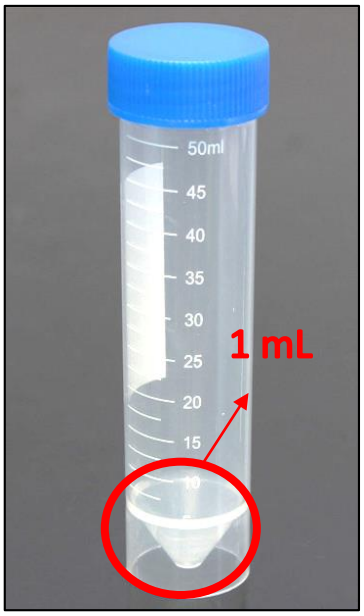

Figura 10. Tub de centrífuga. ***Font: Nirco.com***

Taula 1. Nº de nematodes observats en cada repetició. Determinació del coeficient.

MOSTRA (nº nematodes/20 µl)			Coeficient[z]
1era	2ona	3era	(%)
99	5	1	94
120	7	0	94
91	0	0	100
69	4	0	95
138	8	1	94
123	2	0	98
79	4	2	93
		MITJANA	**96**

[z]. coeficient=$\left[1-\left(\frac{\sum_1^2 ni}{\sum_1^3 ni}\right)\right]$x100, sent n_i *el nombre de nematodes observats en la mostra i (1 a 3) observada seguint l'ordre de mostreig.*

El valor del coeficient obtingut fou del 96%. Això significava que en la primera observació d'una mostra es trobaven el 96% del total de nematodes de la mostra.

A partir d'aquestes dades es va quantificar la població de nematodes agafant una mostra de 20 µl de la part final del tub i corregint aquest valor amb el coeficient obtingut.

Els resultats que es van obtenir van ser nematodes/ml. Coneixent el pes sec del sòl de la mostra (g), la concentració de nematodes (nematodes/ml) i assumint que tots els nematodes del sòl estaven en el volum d'aigua mostrejat es va determinar el nombre de nematodes/g de sòl en pes sec.

3.1.3 Tractament de les dades

Per analitzar les dades es va utilitzar el programa estadístic R v.3.3.0 (R Core Team,2016).

Es va utilitzar la variable nematodes/g de sòl en pes sec. El disseny estadístic plantejat en l'assaig portat a terme per l'Estació Experimental Mas Badia (IRTA) va ser de parcel·les dividides o Split-plot amb un tractament principal (biofumigació, químic o no tractat) i tractaments secundaris en sub-parcel·les (aplicació de *Trichoderma* sp., farina de crucíferes, no tractat). En aquest TFG no es van avaluar els mateixos tractaments en les 3 parcel·les, ja que en el químic només es va mostrejar el control no tractat. Per aquest motiu primerament es va determinar l'efecte del tractament principal (biofumigació i no control) mitjançant una Anàlisi de la Variància (ANOVA) amb model Split-plot. El tractament químic no es va incloure. Posteriorment, i en funció del resultat obtingut en l'ANOVA amb un model Split-plot, on es va veure que l'efecte del tractament principal (o bloc) no era significatiu(P=0.05) es va realitzar una ANOVA amb tots els tractaments amb un disseny aleatoritzat. En aquest darrer anàlisi ja es va poder incloure els resultats del tractament químic. En els casos que el model era significatiu (P<0.05) es va realitzar la prova de diferència significativa mínima de Fisher protegida (P=0.05).

Prèviament a realitzar les ANOVA es va determinar l'homogeneïtat de les variàncies mitjançant la prova de Bartlett i la normalitat dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk. Per tal de complir

aquests supòsits es va haver de transformar les variables en $\log_{10}$(nematodes/g de sòl). Aquest anàlisi de les dades es va realitzar separadament per cada mostreig realitzat.

3.2 ASSAJOS EN CONDICIONS CONTROLADES

En aquest tipus d'assaig les proves van ser realitzades en sòls amb nematodes dins petites safates d'alumini. L'assaig es va dur a terme dins un hivernacle. L'assaig es va iniciar el 15/04/2016 i va finalitzar el 24/05/2016.

3.2.1 Obtenció del sòl

El primer pas per dur a terme aquest experiment va ser l'obtenció de sòl altament colonitzat per nematodes. Aquest sòl es va obtenir d'un assaig experimental de replantació de pomera de l'estació IRTA Mas Badia. Es va agafar sòl de diferents parcel·les testimoni de l'assaig que no havien estat tractades. El dia 08/04/2016 es van realitzar les extraccions de sòl i es van portar al laboratori de Patologia Vegetal de la UdG. Aquest sòl es va posar en safates d'alumini. Aquestes safates eren de 18,7 x 10 x 4,5 cm i amb un volum de 673 cm^3 (Figura 11).

Figura 11. Safata d'alumini. Volum = 673 cm^3. ***Font:*** *fontmarti.com*

3.2.2 Tractaments realitzats

En aquest assaig es va avaluar l'efecte de 6 tractaments diferents:

- Enterrament de *Brassica Napus* (Colza)
- Granulat de farina de crucíferes
- *Trichoderma harzianum T-22* gränul (Tricho G)
- *Trichoderma harzianum T-22* pols (Tricho P)
- Aplicació H_2O
- Control no tractat

De cada tractament es van efectuar 3 repeticions, el que es va traduir en un total de 18 safates (Figura 12).

Figura 12. Safates classificades i etiquetades segons tractament. ***D'esquerra a dreta****: H_2O, Control, Colza, Tricho G, Tricho P, Farina crucífera.* ***Font:*** *propi.*

A la Taula 2 es pot observar les dosis que es van aplicar de cada substància. Aquestes dosis van ser calculades a partir de les recomanacions cada proveïdor en el cas de *Trichoderma harzianum T-22* gränul, *Trichoderma harzianum T-22* pols i farina granulada. Un cop es van realitzar totes les aplicacions es va afegir un volum de 50 mL d'aigua a cada safata excepte les tractades amb aigua i el control no tractat.

Taula 2. Dosis de substància i volum d'aigua aplicat

TRACTAMENT	DOSI (grams/safata)	AIGUA (mL)
Brassica napus (Colza)	16	50
Granulat farina crucífera	40	50
Trichoderma Gränul	0,6	50
Trichoderma Pols	0,06	50
Aigua	-	100
Control no tractat	-	-

Les safates es van cobrir amb film transparent per tal d'evitar el dessecament del sòl. Les safates es van deixar madurar a l'hivernacle de Patologia Vegetal situat el Campus de Montilivi (UdG). Cada setmana les mostres van ser revisades i remullades per tal d'evitar que quedessin seques.

L'assaig es va iniciar el dia 15/04/2016 i va finalitzar el 26/05/2016. Posteriorment, es va procedir a realitzar les extraccions de nematodes per tal de determinar l'eficàcia de cada tractament. De cada safata es van agafar diferents submostres de terra de diferents llocs fins arribar a uns 120 grams de pes fresc aproximadament. Aquestes porcions van ser homogeneïtzades amb l'objectiu

d'aconseguir una sola mostra final. Aquesta operació es va dur a terme per tal de garantir una representativitat més alta de cada mostra.

Per efectuar les extraccions de nematodes es va seguir el mètode de l'embut de Baermann, explicat anteriorment a l'apartat 3 (Mètodes per l'extracció dels nematodes).

3.2.3 Tractament de les dades

Per analitzar les dades es va utilitzar el programa estadístic R v.3.3.0 (R Core Team,2016).

Es va utilitzar la variable nematodes/g de sòl en pes sec. Prèviament a realitzar les ANOVA es va determinar l'homogeneïtat de les variàncies mitjançant la prova de Bartlett i la normalitat dels residus amb la prova de Shapiro-Wilk. Per tal de complir aquests supòsits es va haver de transformar les variables en $\log_{10}$(nematodes/g de sòl). Per determinar l'efecte dels tractaments en la població de nematodes va realitzar una ANOVA amb un disseny aleatoritzat.. En els casos que el model era significatiu (P<0.05) es va realitzar la prova de separació de mitjanes utilitzant la prova de diferència significativa mínima de Fisher protegida (P=0.05).

4.RESULTATS

4.1 ASSAJOS EN CONDICIONS NATURALS

Els mostrejos dels assajos en condicions naturals es van dur a terme els dies:

- 08/04/2016
- 22/04/2016
- 06/05/2016
- 19/05/2016

4.1.1 DADES CLIMÀTIQUES

A l'eix principal de la Figura 13 es pot observar la precipitació acumulada de cada dia en litres/m^2 del període abril-maig. A l'eix secundari hi figura la temperatura mitjana en ºC d'aquest mateix període. S'utilitzen dades de l'estació meteorològica de la Tallada d'Empordà.

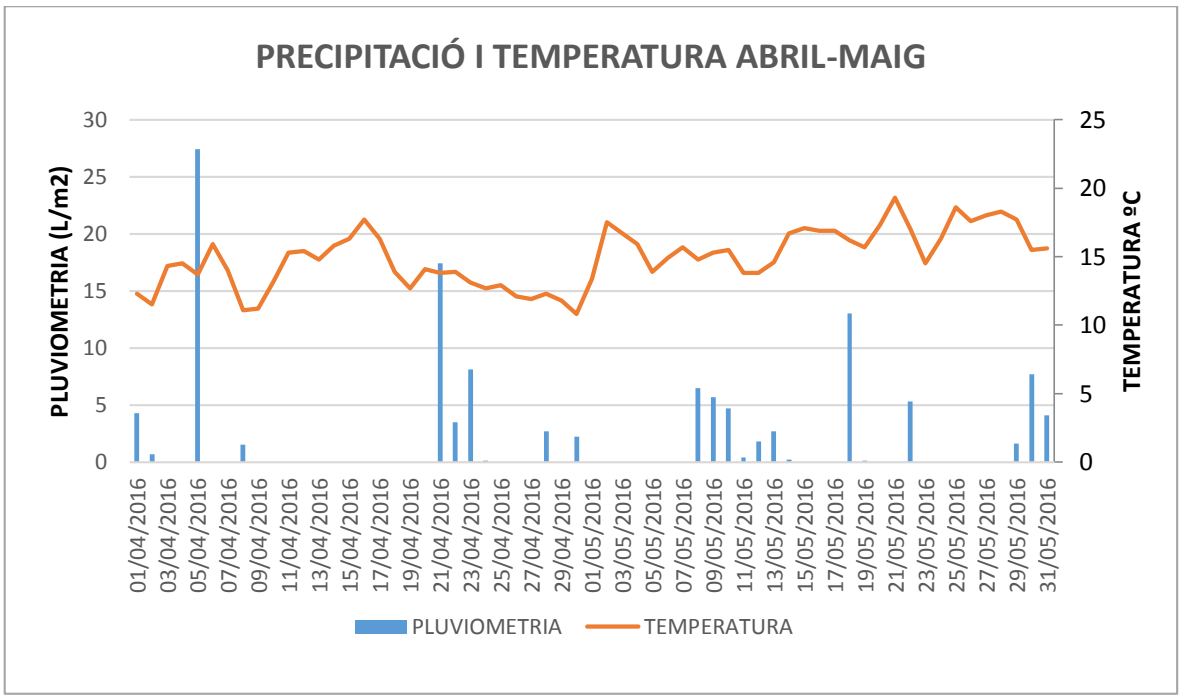

Figura 13. Pluviometria i temperatura del període abril-maig a la Tallada d'Empordà.

4.2.2 EVOLUCIÓ DE LA DINÀMICA POBLACIONAL

A la Figura 14 s'observa la evolució de les poblacions de nematodes del sòl. Els nivells poblacionals del primer mostreig són més elevats, i coincideixen amb una pluviometria de quasi 30 litres/m^2 dos dies abans del mostreig. Hi ha una gran variabilitat la primera data de mostreig (no representat), que desapareix en els altres mostrejos. S'observa que a la parcel·la no tractada amb un posterior tractament de farina de crucíferes el nivell de nematodes és notablement més alt que en la resta dels tractaments. El nivell poblacional de nematodes observats en control químic és el més baix.

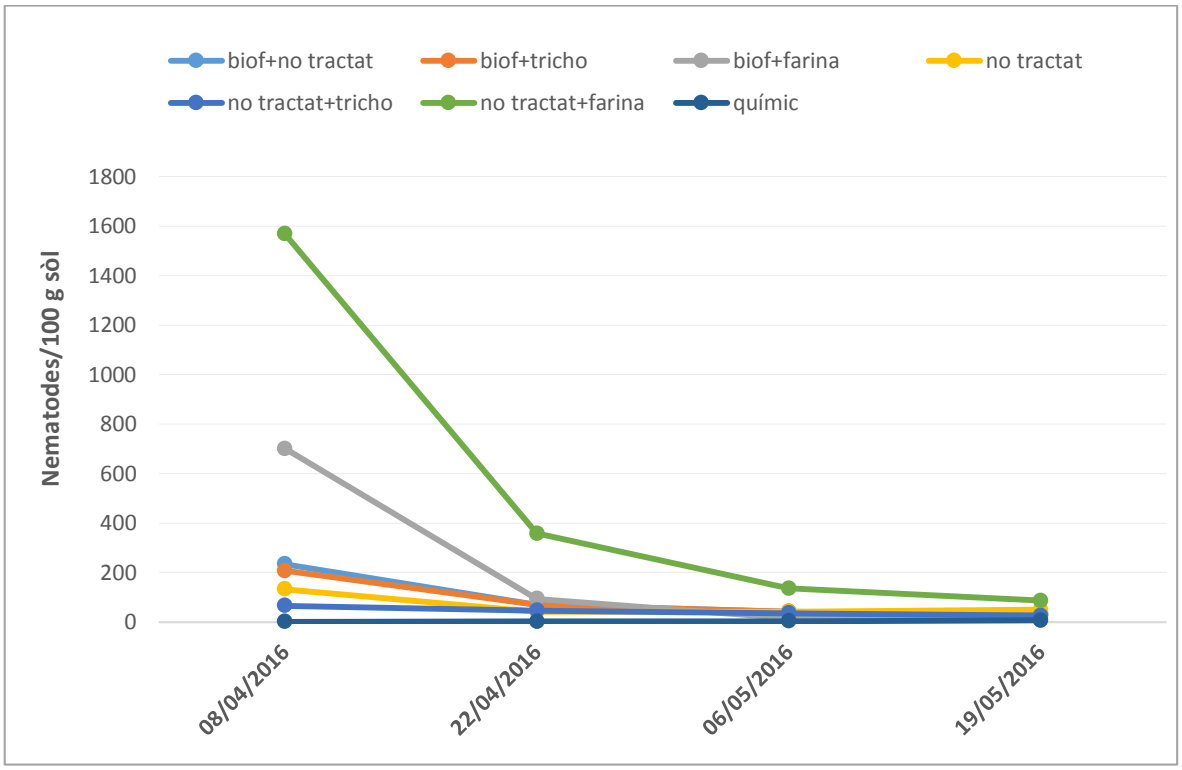

Figura 14. Evolució de la dinàmica poblacional dels nematodes del sòl per cada data de mostreig i tractament (biof: biofumigació; tricho :Trichoderma sp.; farina: farina de crucíferes; químic: dazomet).

Després de realitzat el test de Barlett i Shapiro-Wilk, es va observar que les variables no eren homogènies. Per tal de que normalitat es compleixi i les variables siguin homogènies es van transformar els resultats en $\log_{10}$ (Figura 15). En aquesta figura s'observa com en la primera data de mostreig el nombre de nematodes observat en sòl amb tractament químic és més baix que en la resta de tractaments. Aquest tractament, a mesura que es van succeint els mostrejos, perd efectivitat, acostant-se cada vegada més als nivells poblacionals que tenen els altres tractaments. La tendència dels altres tractaments va clarament a la baixa, factor que indica una possible efectivitat d'aquests. Si s'observa el control no tractat segueix una dinàmica bastant estable en el temps si bé en l'últim mostreig, en comparació amb el segon, els nivells poblacionals tendeixen a augmentar.

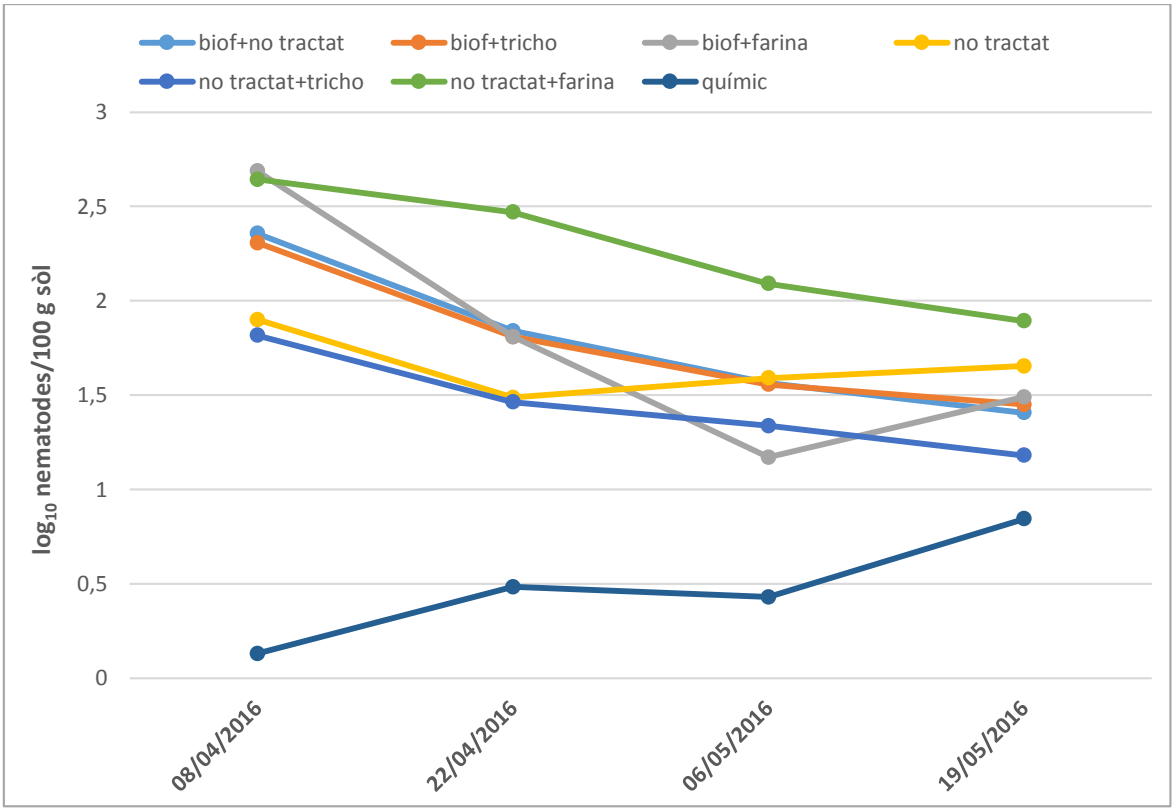

Figura 15. Evolució de la dinàmica poblacional de nematodes del sòl [log_{10} (nematodes/100 g sòl)] per cada data de mostreig i tractament (biof: biofumigació; tricho: Trichoderma sp.; farina: farina de crucíferes; químic: dazomet).

4.2.3 EFECTE DELS TRACTAMENTS EN LA POBLACIÓ DE NEMATODES DEL SÒL

Es mostren els resultats obtinguts en l'ANOVA amb un disseny Split-plot de l'efecte dels diferents tractaments en la població de nematodes (Taules 3, 4, 5 i 6). Els tractaments principals van ser biofumigació o no tractat i els secundaris aplicacions de *Trichoderma* sp, farina de crucíferes o no tractat. Per les quatre dates de mostreig es va determinar que en general l'efecte dels tractaments principals i secundaris així com la seva interacció no va ser significativa.

Taula 3. Efecte dels diferents tractaments realitzats en la població de nematodes del sòl [log_{10} (nematodes/100 g sòl)]. Es presenten els resultats de l'ANOVA amb un disseny Split-plot de les dades del mostreig del 8 d'abril del 2016.

Model[Y]	g.ll.[Z]	Suma quadrats	Mitjana quadrats	Valor de F	P > F
Rep	2	0,06790	0,03395	0,1984	0,8344
A	1	0,49005	0,49005	2,8638	0,2327
B	2	1,31293	0,65647	2,4465	0,1482
A*B	2	0,18573	0,09287	0,3461	0,7175

[Y]. Rep: repetició
A: Tractament principal (biofumigació, no tractat).
B: Tractament secundari (no tractat, *Trichoderma sp*, farina de crucíferes).
[Z]. Graus de llibertat.

Taula 4. Efecte dels diferents tractaments realitzats en la població de nematodes del sòl [log_{10} (nematodes/100 g sòl)]. Es presenten els resultats de l'ANOVA amb un disseny Split-plot de les dades del mostreig del 22 d'abril del 2016.

Model[Y]	g.ll.[Z]	Suma quadrats	Mitjana quadrats	Valor de F	P > F
Rep	2	0,26563	0,13282	3,7082	0,2124
A	1	0,00080	0,00080	0,0223	0,8949
B	2	0,96253	0,48127	2,6945	0,1275
A*B	2	1,02013	0,51007	2,8558	0,1159

[Y]. Rep: repetició
A: Tractament principal (biofumigació, no tractat).
B: Tractament secundari (no tractat, *Trichoderma sp*, farina de crucíferes).
[z]. Graus de llibertat.

Taula 5. Efecte dels diferents tractaments realitzats en la població de nematodes del sòl [log_{10} (nematodes/100 g sòl)]. Es presenten els resultats de l'ANOVA amb un disseny Split-plot de les dades del mostreig del 6 de maig del 2016.

Model[Y]	g.ll.[Z]	Suma quadrats	Mitjana quadrats	Valor de F	P > F
Rep	2	0,51868	0,25934	4,9236	0,16882
A	1	0,26402	0,26402	5,0126	0,15454
B	2	0,10671	0,05336	0,6489	0,54807
A*B	2	1,07924	0,53962	6,5630	0,02056

[Y]. Rep: repetició
A: Tractament principal (biofumigació, no tractat).
B: Tractament secundari (no tractat, Trichoderma sp, farina de crucíferes).
[z]. Graus de llibertat.

Taula 6. Efecte dels diferents tractaments realitzats en la població de nematodes del sòl [log_{10} (nematodes/100 g sòl)]. Es presenten els resultats de l'ANOVA amb un disseny Split-plot de les dades del mostreig del 19 de maig del 2016.

Model[Y]	g.ll.[Z]	Suma quadrats	Mitjana quadrats	Valor de F	P > F
Rep	2	0,03308	0,016539	0,1339	0,8819
A	1	0,07220	0,07220	0,5845	0,5244
B	2	0,42848	0,214239	1,5198	0,2758
A*B	2	0,37243	0,186217	1,3210	0,3193

[Y]. Rep: repetició
A: Tractament principal (biofumigació, no tractat).
B: Tractament secundari (no tractat, *Trichoderma sp*, farina de crucíferes).
[z]. Graus de llibertat.

L'efecte del tractament principal (biofumigació o no tractat) no va ser significatiu això va permetre analitzar les dades utilitzant la combinació dels tractaments principals i secundaris incloent-hi el control químic.

En la primera data de mostreig l'efecte del diferents tractaments va ser significatiu (Taula 7), sent més efectiu en el control dels nematodes el tractament químic (Figura 16) que va diferir de la resta de tractaments. Els tractaments no van mostrar una control de la població de nematodes significativament diferent del control no tractat.

Taula 7. Efecte dels diferents tractaments realitzats en la població de nematodes del sòl [$\log_{10}$ (nematodes/100 g sòl)]. Es presenten els resultats de l'ANOVA de les dades del mostreig del 8 d'abril del 2016.

	g.ll.[z]	Suma quadrats	Mitjana quadrats	Valor de F	Probabilitat > F
Tractaments	6	13,93000	2,3217	12,23	<0,001
Residuals	14	2,658	0,1899		

[z]. Graus de llibertat.

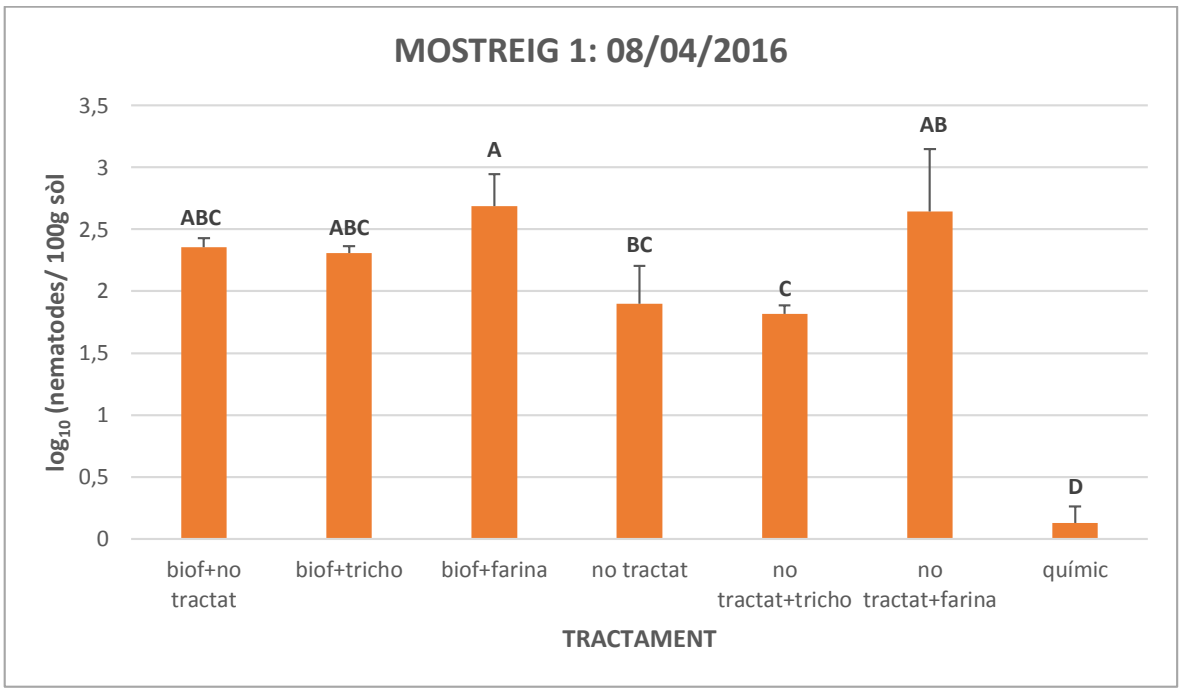

Figura 16. Efecte dels diferents tractaments (biof: biofumigació; tricho: *Trichoderma sp.*; farina: farina de crucíferes; químic: dazomet) en la població de nematodes del sòl. Es presenten les dades del mostreig del 8 d'abril del 2016. Els intervals representats en la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Les mitjanes amb la mateixa lletra no difereixen significativament segons la prova de Fisher (P=0.05).

En el segon mostreig l'efecte del diferents tractaments va ser significatiu (Taula 8), sent més efectiu en el control dels nematodes el tractament químic (Figura 17) que va diferir de la resta de tractaments. La resta de tractaments no van mostrar una control de la població de nematodes significativament diferent del control no tractat.

Taula 8. Efecte dels diferents tractaments realitzats en la població de nematodes del sòl [$\log_{10}$ (nematodes/100 g sòl)]. Es presenten els resultats de l'ANOVA de les dades del mostreig del 22 d'abril del 2016.

	g.ll.[z]	Suma quadrats	Mitjana quadrats	Valor de F	Probabilitat > F
Tractaments	6	6,532	1,0887	8,35	<0,001
Residuals	14	1,825	0,1304		

[z]. Graus de llibertat.

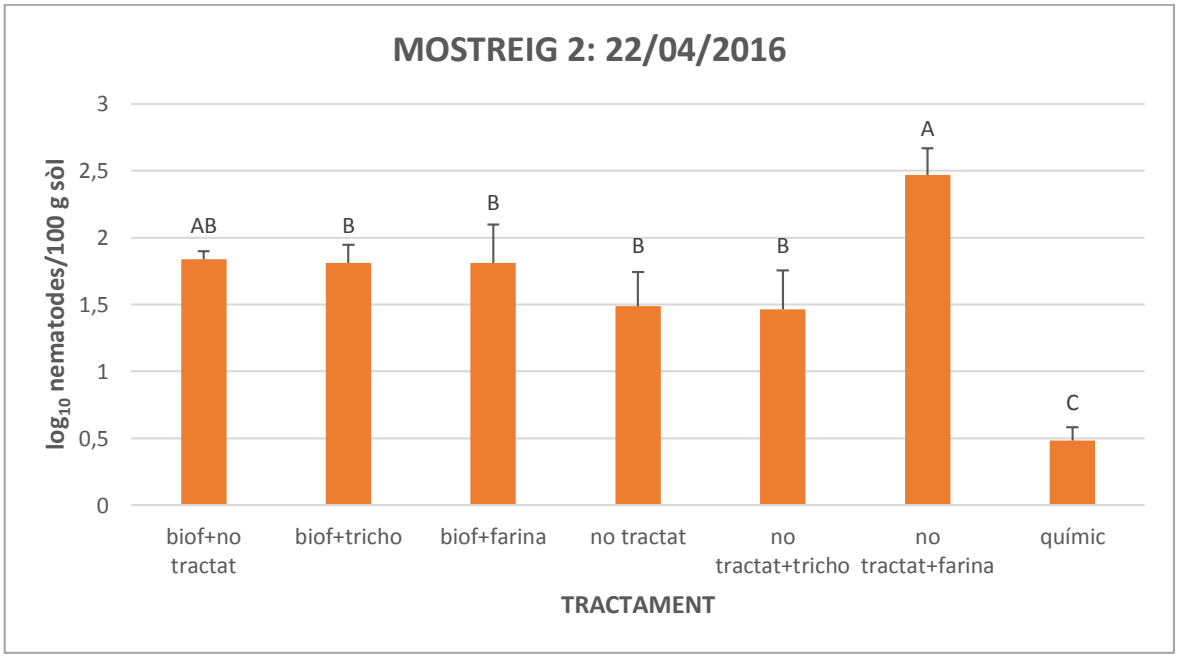

Figura 17. Efecte dels diferents tractaments (biof: biofumigació; tricho: *Trichoderma sp.*; farina: farina de crucíferes; químic: dazomet) en la població de nematodes del sòl. Es presenten les dades del mostreig del 22 d'abril del 2016. Els intervals representats en la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Les mitjanes amb la mateixa lletra no difereixen significativament segons la prova de Fisher (P=0.05).

En el tercer mostreig l'efecte del diferents tractaments va ser significatiu (Taula 9), sent més efectiu en el control dels nematodes el tractament químic (Figura 18) que va diferir de la resta de tractaments. La tendència general, excepte en el control químic, és la disminució del valor de les mitjanes ($\log_{10}$ nematodes/100 g sòl) si bé aquests tractaments no van mostrar una control de la població de nematodes significativament diferent del control no tractat.

Taula 9. Efecte dels diferents tractaments realitzats en la població de nematodes del sòl [$\log_{10}$ (nematodes/100 g sòl)]. Es presenten els resultats de l'ANOVA de les dades del mostreig del 6 de maig del 2016.

	g.ll.[z]	Suma quadrats	Mitjana quadrats	Valor de F	Probabilitat > F
Tractaments	6	4,682	0,7803	6,303	0,00221
Residuals	14	1,733	0,1238		

[z]. Graus de llibertat.

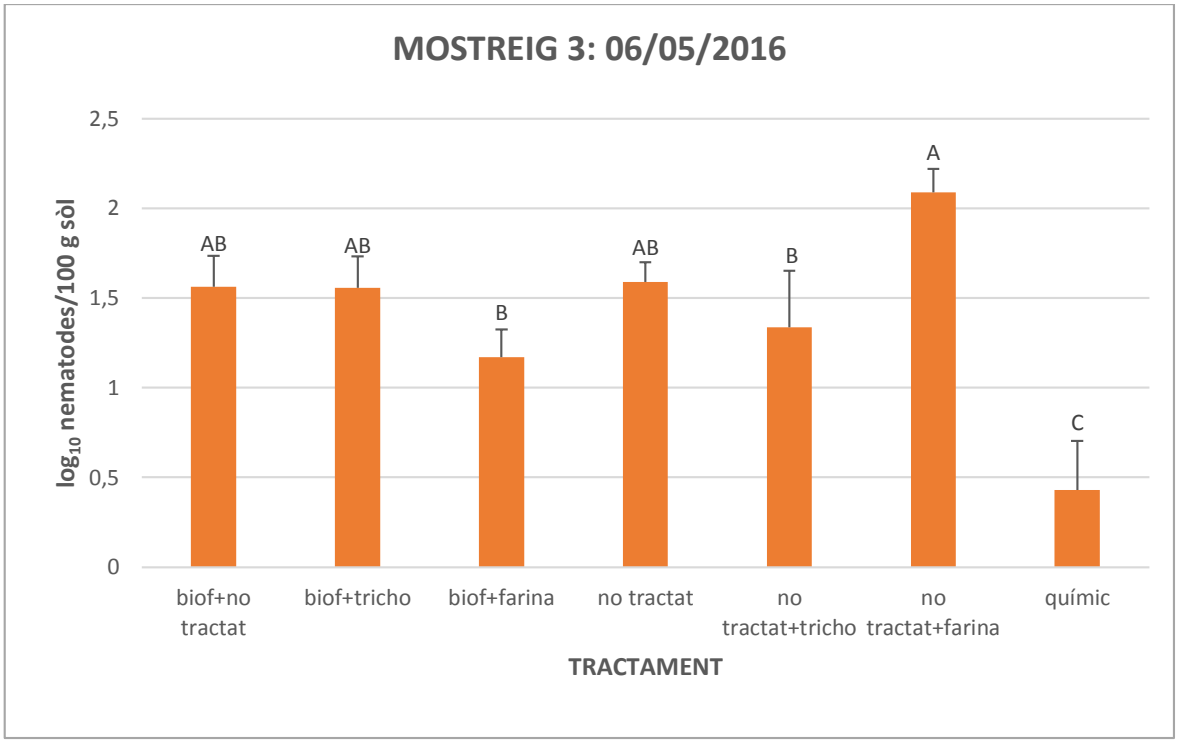

Figura 18. Efecte dels diferents tractaments (biof: biofumigació; tricho: *Trichoderma sp.*; farina: farina de crucíferes; químic: dazomet) en la població de nematodes del sòl. Es presenten les dades del mostreig del 6 de maig del 2016. Els intervals representats en la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Les mitjanes amb la mateixa lletra no difereixen significativament segons la prova de Fisher (*P*=0.05).

En el darrer mostreig l'efecte del diferents tractaments va ser significatiu (Taula 10), sent més efectiu en el control dels nematodes el tractament químic (Figura 19) que va diferir de la resta de tractaments. En aquest mostreig els tractaments biofumigació+no tractat i no tractat+*trichoderma* no van resultar significativament diferents del tractament químic, motiu que indica la seva possible efectivitat en el control dels nematodes del sòl. Les mitjanes dels nivells poblacionals (log_{10}nematodes/100 g sòl) són notablement més baixes en aquest mostreig, i tendeixen a acostar-se a mesura que avança el temps.

Taula 10. Efecte dels diferents tractaments realitzats en la població de nematodes del sòl [log_{10} (nematodes/100 g sòl)]. Es presenten els resultats de l'ANOVA de les dades del mostreig del 19 de maig del 2016.

	g.ll.[z]	Suma quadrats	Mitjana quadrats	Valor de F	Probabilitat > F
Tractaments	6	2,024	0,3373	3,148	0,0361
Residuals	14	1,500	0,1071		

[z]. Graus de llibertat.

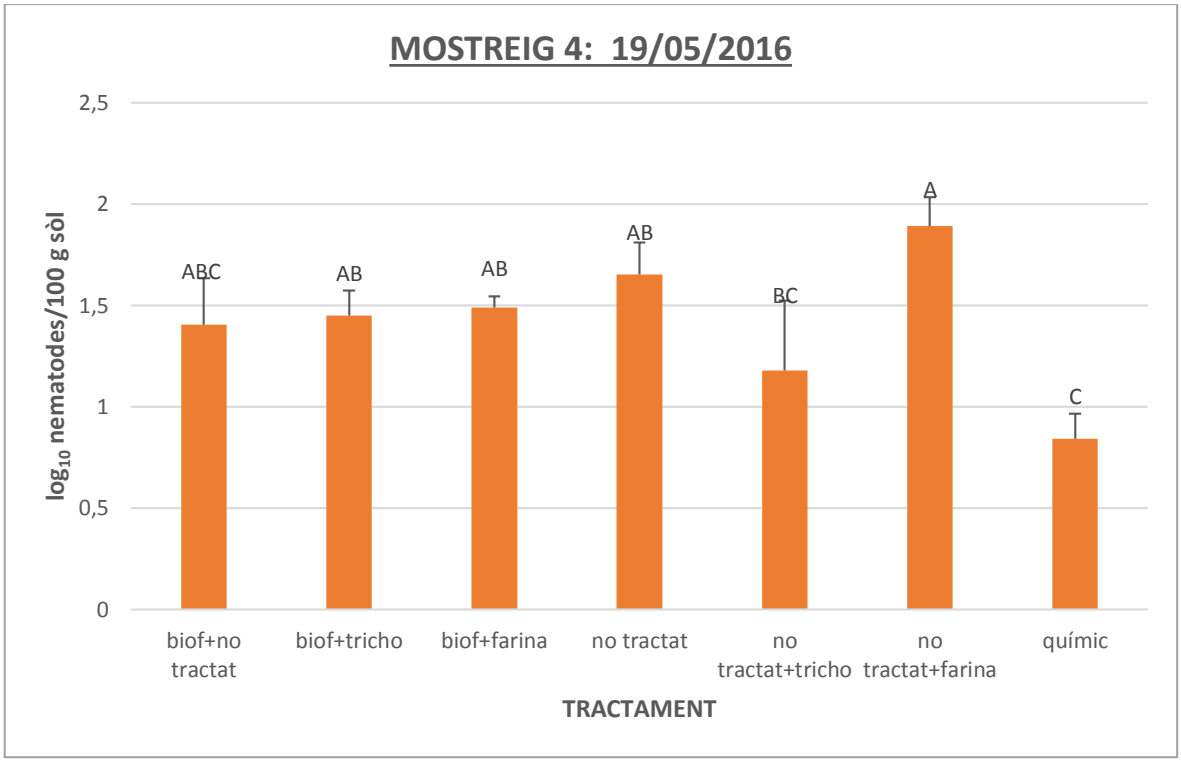

Figura 19. Efecte dels diferents tractaments (biof: biofumigació; tricho: *Trichoderma sp.*; farina: farina de crucíferes; químic: dazomet) en la població de nematodes del sòl. Es presenten les dades del mostreig del 19 de maig del 2016. Els intervals representats en la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Les mitjanes amb la mateixa lletra no difereixen significativament segons la prova de Fisher (*P*=0.05).

4.3 ASSAJOS EN CONDICIONS SEMI-CONTROLADES

Els gràfics amb els resultats obtinguts dels assajos en condicions semi-controlades presenten una gran variabilitat de valors. En el següent gràfic (Figura 20) es representa la concentració de nematodes en funció dels diferents tractaments realitzats. Es determina que les safates control no tractades tenen una concentració mitjana de l'ordre de 150 nematodes/100 g sòl. Les safates a les quals es va realitzar un tractament de biofumigació amb colza van presentar una variabilitat molt gran en els seus resultats amb uns nivells poblacionals de nematodes molt superiors al control (750 nematodes/100 g sòl). Els altres tractaments (T*richoderma sp.* gränul, *Trichoderma* sp. pols i farina de crucíferes) tenien una concentració mitjana de nematodes inferior a la safata control. El més efectiu dels tractaments va ser la saturació del sòl amb aigua juntament amb un bon segellament de les safates que garantia condicions anòxiques anomenat (tractament H_2O), on la presència de nematodes era pràcticament nul·la.

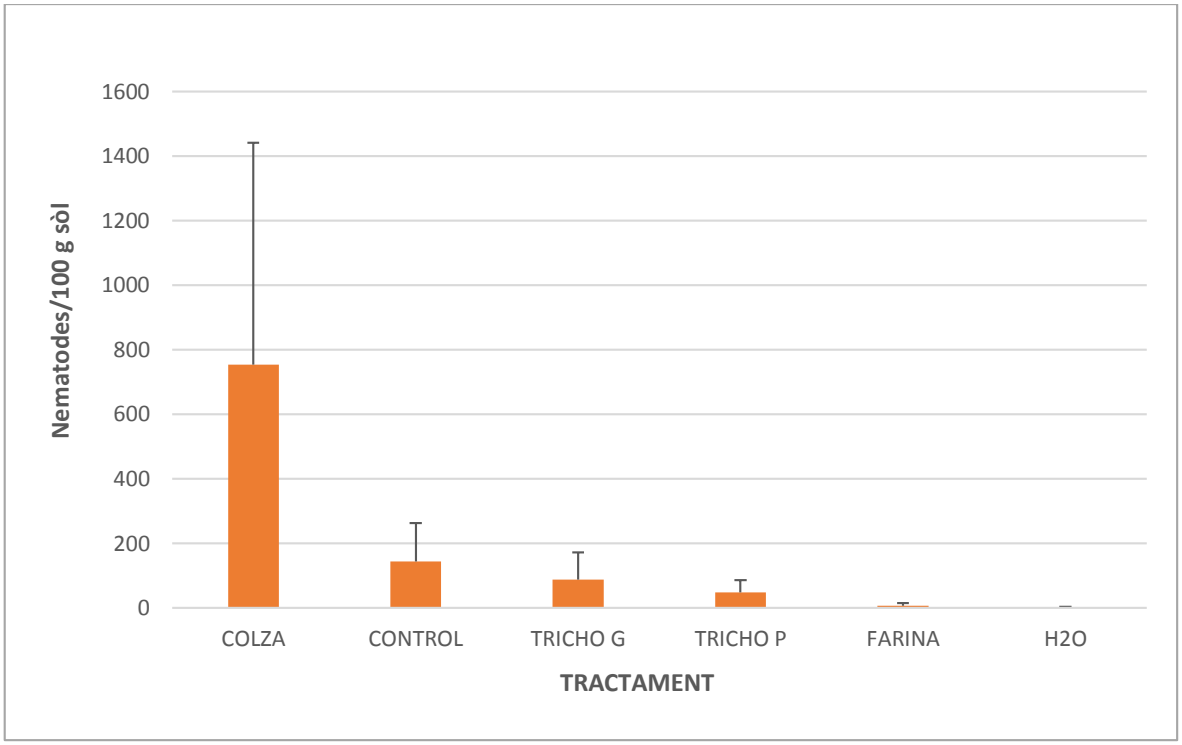

Figura 20. Efecte dels diferents tractaments (TRICHO G :*Trichoderma* gràNuls; TRICHO P: *Trichoderma* pols; FARINA: farina de crucíferes; H_2O: aigua) en la població de nematodes del sòl. Es presenten les dades del mostreig realitzat. Els intervals representats en la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana.

Els resultats obtinguts no complien els requisits d'homogeneïtat de variàncies i normalitat de residus per ser analitzats amb una ANOVA i per això es va efectuar una transformació en $\log_{10}$ (nematodes/100 g sòl). L'efecte dels tractaments aplicats va ser significatiu en la mida poblacional dels nematodes (P<0.05)(Taula 11). Es va determinar que el tractament H_2O va ser el més eficaç de tots i significativament diferent del control no tractat (Figura 21). La resta de tractaments, excepte la colza, si bé van controlar relativament les poblacions de nematodes aquest efecte no va ser significativament diferent respecte el control no tractat. L'aplicació de farina de crucíferes va presentar un control de nematodes intermig, no diferent ni del control no tractat ni de la saturació del sòl amb aigua.

Taula 11. Efecte dels diferents tractaments realitzats en la població de nematodes en els assajos en condicions semi-controlades [$\log_{10}$(nematodes/100 g sòl)]. Es presenten els resultats de l'ANOVA.

	g.ll.[z]	Suma quadrats	Mitjana quadrats	Valor de F	Probabilitat > F
Tractaments	5	10,46	2,091	5,652	0,00661
Residuals	12	4,44	0,370		

[z]. Graus de llibertat.

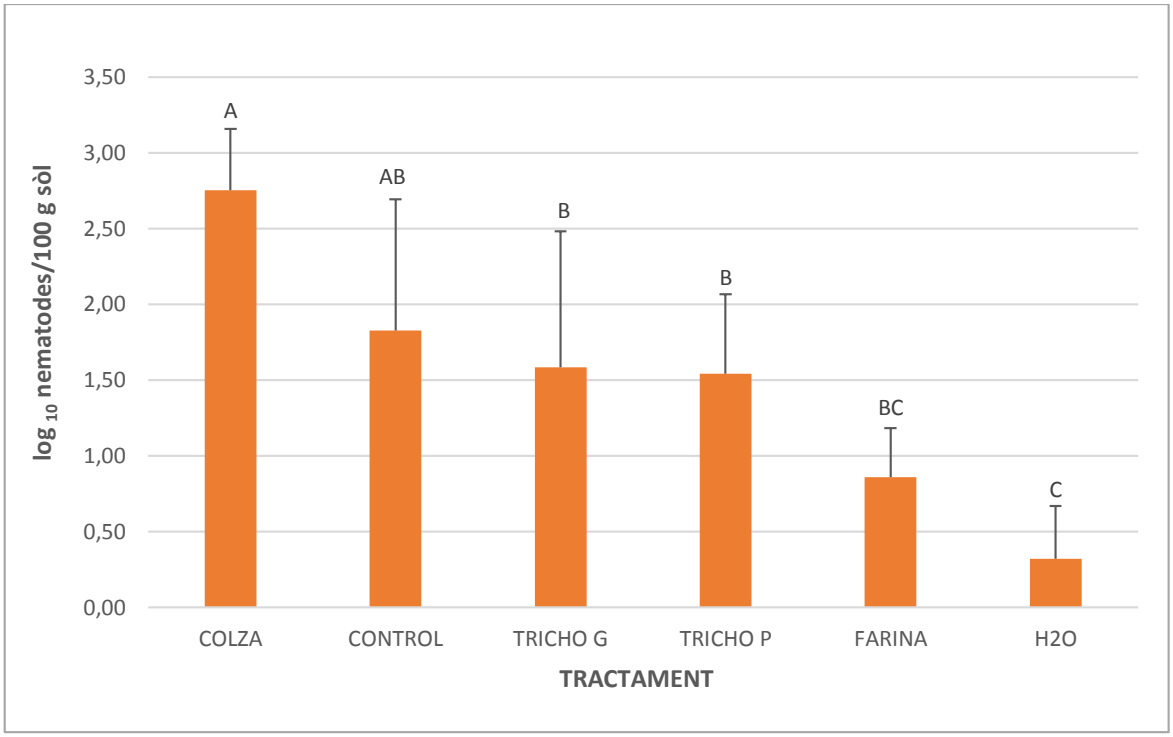

Figura 21. Efecte dels diferents tractaments (TRICHO G :*Trichoderma* gràNuls; TRICHO P: *Trichoderma* pols; FARINA: farina de crucíferes; H_2O: aigua) en la població de nematodes del sòl. Es presenten les dades linealitzades en [log_{10} (nematodes/100 g sòl)]. Els intervals representats en la part superior de les barres corresponen a l'error estàndard de la mitjana. Les mitjanes amb la mateixa lletra no difereixen significativament segons la prova de Fisher (*P*=0.05).

5.DISCUSSIÓ

5.1 ASSAJOS EN CONDICIONS CONTROLADES

Aquest treball forma part d'un assaig més gran en l'espai i el temps i dissenyat amb un altre objectiu més global, com és la millora del problemes de replantació en pomera, factor que pot condicionar en els resultats.

El primer mostreig, en el qual s'han determinat valors mitjans de nematodes notablement més elevats que la resta de mostrejos, coincideix amb una pluviometria de gairebé 30 l/m^2 el dia anterior. Quan el sòl és molt moll és possible que hi hagi més activitat dels nematodes degut a un contingut superior d'humitat. Quan es preparen els embuts seguint el mètode de Baermann, al ja tenir la mostra de sòl amb una humitat elevada, ràpidament es produeix un flux d'aigua que afavoreix el moviment dels nematodes migratoris.

S'han determinat nematodes en totes les parcel·les i en cada mostreig en aquesta replantació de pomeres, motiu que indica que l'activitat nematològica en el sòls d'aquesta finca experimental de l'IRTA a Mas Badia és constant.

Els tractaments principals han resultat no ser significatius de cares al control de les poblacions de nematodes del sòl, si bé els tractaments secundaris en la majoria dels casos sí que ho han estat. És per aquest motiu que segons els resultats obtinguts en aquest treball es determina que la biofumigació com a tractament previ no té un efecte clar en el control de les poblacions de nematodes del sòl i, per tant, es podria descartar com a tractament inicial abans de dur a terme els tractaments secundaris.

En el primer mostreig el control químic era clarament el més eficaç que la resta de tractaments, amb uns valors pràcticament nuls de nematodes en 100 g de sòl. Els altres tractaments eren poc efectius en aquest primer mostreig. A mesura que han transcorregut els dies aquesta tendència s'ha anat invertint. Si s'observa la Figura 15 es pot comprovar com la tendència en l'última data de mostreig és la disminució general dels nivells poblacionals dels tractaments excepte en el tractament de biofumigació+farina. Per altra banda el control químic mostra una efectivitat que va minvant a mesura que transcorren els dies. És possible que la efectivitat dels tractaments s'inverteixi en els propers mesos havent un augment important a les parcel·les on es va dur a terme el control químic degut a l'esgotament d'aquest producte en el sòl. En aquest TFG només s'ha determinat la dinàmica poblacional en un període de 2 mesos si bé seria ideal contrastar aquests resultats amb un anàlisi més extens per veure si en algun moment es creuen els resultats del control químic i els tractaments biològics.

Només s'han mostrejat tres repeticions de cada tractament. Si en un d'aquests mostrejos s'analitzava una zona altament colonitzada aquest resultat podia alterar els resultats ja que els nematodes són microorganismes que es distribueixen en grans colònies per el sòl. Un gran focus de nematodes en un punt de mostreig no implica necessàriament una important colonització de nematodes en tota aquella superfície de sòl. És per aquest motiu que estaria bé augmentar número de mostres obtingudes per cada tractament.

Segons el laboratori d'anàlisis agrícoles (CSR-Servicios, 2015) el llindar de tolerància en fruiters de nematodes del gènere *Pratylenchus spp.* és de 10 nematodes/100 g sòl. El llindar econòmic, a partir del qual poden produir-se pèrdues econòmiques, és de 300 nematodes/100 g sòl. Si s'observa la Figura 14 en la primera data de mostreig hi ha dues parcel·les amb tractaments en les quals es supera el llindar econòmic si bé en l'última data de mostreig no hi ha cap parcel·la que superi el llindar econòmic. En general, però, la majoria de parcel·les sí que estan per sobre del llindar de tolerància i potser seria convenient dur a terme mesures correctores més efectives i severes per tal de mantenir les poblacions de nematodes per sota d'aquest llindar i així evitar que els nematodes repercutissin en la producció.

5.2 ASSAJOS EN CONDICIONS SEMI-CONTROLADES

En aquest assaig s'ha obtingut un resultat sorprenent. La safata en la qual es va aplicar un tractament a base de colza fresca triturada s'ha determinat un nombre de nematodes de l'ordre de 800 nematodes/100 g sòl. Si aquest resultat es compara amb els llindars establerts segons el laboratori d'anàlisis agrícoles (CSR-Servicios, 2015) que situen el llindar econòmic en 300 nematodes/100 g sòl gairebé es triplica. Aquest fet pot ser degut a que durant el procés d'obtenció de les mostres de sòl a camp es va coincidir amb una zona en la qual hi havia un boom poblacional de nematodes molt important. Per altre banda, només en els tractaments amb *Trichoderma* sp. en grànuls i *Trichoderma* sp. en pols les poblacions de nematodes superaven el llindar de tolerància establert de 10 nematodes/100 g sòl si bé estaven molt lluny del llindar econòmic de danys.

Pel que fa al conjunt de tots els tractaments, només el tractament H_2O diferia significativament del control en la prova de Fisher. Les micro-parcel·les a les quals es va dur a terme el tractament H_2O van ser segellades amb film després de l'aplicació doble de la dosi d'aigua. Aquest fet indica que, en aquests assajos en micro-parcel·les, unes condicions totals d'anaerobiosi són letals per les poblacions de nematodes del sòl. El tractament amb farina de crucíferes no difereix significativament de les safates control ni del tractament H_2O si bé s'observa que la mitjana de nematodes després de realitzar aquest tipus de tractament són notablement més baixes que en la resta. Si aquests resultats s'extrapolen a camp és possible que un tractament basat en biosolarització juntament amb farina de crucíferes i una important dosi d'aigua aplicada pugui ser una alternativa molt viable per el control de les poblacions de nematodes del sòl.

Les safates que van ser tractades amb el fong *Trichoderma* sp. en dos formats diferents (grànuls i pols) presentaven uns nivell poblacionals inferiors de nematodes respecte el control. És possible que la durada del temps d'assaig no permetés el creixement poblacional de *Trichoderma* sp. a nivells prou alts com per resultar un tractament notablement eficaç contra els nematodes del sòl.

La realització d'aquest projecte ha estat útil per aconseguir una idea general de l'evolució de les poblacions de nematodes del sòl i la determinació de l'efectivitat de diferents controls químics i biològics en el control d'aquests. L'anàlisi de la dinàmica poblacional s'ha dut a terme en un període de dos mesos no suficient per conèixer l'evolució anual d'aquestes poblacions. Apart de l'anàlisi poblacional de nematodes, conèixer la producció de cada parcel·la serà important en l'avaluació final dels tractaments.

6.CONCLUSIONS

- La biofumigació del sòl basada en l'enterrament de crucíferes (naps, cols) no ha controlat significativament les poblacions de nematodes del sòl.

- El control químic basat en l'aplicació de dazomet té un efecte nematicida molt eficaç en els primers mesos des de la seva aplicació si bé aquest efecte va desapareixent en el transcurs del temps.

- Ni els tractaments biològics basats en l'aplicació del fong *Trichoderma harzianum* T-22 (TH promotor) ni les aplicacions de farina de crucíferes han mostrat un efecte significatiu en la reducció de la població de nematodes en comparació al testimoni no tractat. Malgrat això s'ha observat una disminució de les poblacions de nematodes al llarg de l'assaig en les parcel·les tractades amb *Trichoderma harzianum* T-22 (TH promotor) o amb farina de crucíferes.

- Al final de l'assaig, el nivell poblacional de nematodes per tots els tractament va ser inferior als 300 nematodes/10 g sòl no superant per tant el llindar econòmic de danys. Tot i això en tots els tractaments excepte el químic amb dazomet els nivells poblacional estaven entre 25 i 86 nematodes/100 g sòl superant per tant el llindar de tolerància. En les parcel·les tractades amb dazomet els valors mitjans van ser de 6,5 nematodes/100 g sòl.

- La saturació del sòl amb aigua, en els assajos realitzats en condicions semi controlades, ha estat molt eficaç en el control de nematodes del sòl.

7.BIBLIOGRAFIA

Agrios, G. N. (2002). *Fitopatologia.* México: Limusa.

Bello, A. (2008). *Biodesinfeccion suelos.* Madrid: Santillana.

Coyne, D., Nicol, J., & Claudius-Cole, B. (2009). *Practical plant nematology: a field and laboratory guide.*SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.

CSR-Servicios. (2015). *Muestreo de nematodos en suelos.*

Díaz, J. C. (2001). *Poblaciones de nematodos fitoparásitos.*

Dropking, V. (1989). *Introduction to plant nematology.* U.S.A.: Wiley-intercience.

FAO. (1998). *Crop Evapotranspiration: Guidelines for Computing Crop Water Requirements. Irrigation and Drainage Paper 56.* Roma.

Frapolli, E. (2000). *Los nematodos fitoparasitos.* Sevilla.

Guharay, F. (2000). *Manejo integrado de plagas en el culivo del café.* Costa Rica.

Igelmo, A., ADV Fruita del Baix Llobregat (2014). La biofumigació, mètode biològic de control de patògens del sòl. *Fitxa tènica Ruralcat nº42*.

Matroudi, M. (1985). *Antagonistic effects of three species of Trichoderma sp. on Sclerotinia sclerotiorum, the causal agent of canola stem rot.*

Morra, B. i. (1997). Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants.

Papavizas, G. (1985). *Trichoderma and Gliocladium: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol.*

Urbano Terrón, P., Bello, A., López Pérez, J., & Díez Rojo, M. (2010). *Biodesinfección de suelos y manejo agronómico.* Madrid.

Yedidia, I., & Benhamou, N. (1999). *Induction of defense responses in cucumber plants (Cucumis sativus L.) by the biocontrol agent Trichoderma harzianum.*