

Biological, anaerobic and reductive soil disinfestation to the soil for control of harmful organisms to plants

Desinfestación biológica, anaerobia y reductiva al suelo para el control de organismos dañinos a plantas

José Alfredo Samaniego-Gaxiola*, Yasmín Chew-Madinaveitia, Arturo Gaytán-Mascorro, Campo Experimental La Laguna INIFAP, Boulevard. José Santos Valdez 1200 Pte., Colonia Centro Matamoros, Coahuila, México. C.P. 27440; Aurelio Pedroza-Sandoval², Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional de Zonas Áridas. Carretera Gómez Palacio - Ciudad Juárez Km 40, Bermejillo, Durango. C.P. 35230. *Autor para correspondencia: samaniego.jose@inifap.gob.mx.

Recibido: 02 de Octubre, 2018.

Aceptado: 21 de Noviembre, 2018.

Samaniego-Gaxiola JF, Chew-Madinaveitia Y, Gaytán-Mascorro A and Pedroza-Sandoval A. 2018, Biological, anaerobic and reductive disinfestation to the soil for the control of organisms harmful to plants. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-1

Primera publicación DOI: 09 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 09, 2018.

Resumen. La necesidad de disminuir el uso de pesticidas sintéticos, bajar costos, incrementar eficiencia para el control de fitopatógenos y de realizar una agricultura orgánica, son razones para mejorar y desarrollar nuevas alternativas de control. La desinfestación biológica (DBS), anaerobia (DAS) o reductiva del suelo (DRS) son sinónimos; en ésta revisión, se utiliza el término DRS y se explica la razón. La DRS constituye un método aplicado al suelo para disminuir o eliminar bacterias, hongos, malezas y nematodos que dañan a los

Abstract. The need to reduce the use of synthetic pesticides, lower costs, increase efficiency for the control of phytopathogens and to carry out organic agriculture, are reasons to improve and develop new control alternatives. The biological disinfestation (BSD), anaerobic (ASD) or reductive soil (RSD) are synonymous; in this review, the term RSD is used and the reason explained. The RSD is a method applied to the soil to reduce or eliminate bacteria, fungi, weeds, and nematodes that damage agricultural crops. This technique consists in adding a source of easily oxidized organic carbon such as crop residues, seeds, green manure, etc., cover with plastic and saturate or flood the soil. In this way, the carbon source decomposes in an anaerobic condition, the soil acidifies, the oxidation-reduction potential reaches reductive values (-100 to -400 mV) and short-chain volatile fatty acids (VFAs) are generated. The VFAs are lethal for weeds and phytopathogens in the soil. In this essay the subject of the RSD, shows a historical approach, the principles that sustain it, proposals

cultivos agrícolas. Esta técnica consiste en agregar una fuente de carbono orgánico de fácil oxidación como residuos de cosecha, semillas, abonos, etc., cubrir con plástico y saturar o inundar el suelo. De esta manera, la fuente de carbono se descompone en condición anaerobia, el suelo se acidifica, el potencial oxido-reducción alcanza valores reductivos (-100 a -400 mV) y se generan ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGVs). Los AGVs son letales para malezas y fitopatógenos en el suelo. En este ensayo el tema de la DRS, muestra un enfoque histórico, los principios que la sustentan, se hacen propuestas de mejora y evaluación de sus variantes, y se presentan aplicaciones prácticas.

Palabras clave: ácidos grasos volátiles, inundación, potencial oxido-reducción, pH.

Antes del uso de productos químicos para el control de plagas y enfermedades, la rotación de cultivos y la incorporación de materia orgánica en el suelo fueron los dos métodos más utilizados en la agricultura para este fin (Bailey y Lazarovits, 2003). Esta última se sigue utilizando, pero los resultados para el control de enfermedades de plantas en el suelo tienen una amplia variación, relacionada con la cantidad y tipo de materia orgánica, cultivo a proteger y patógeno que se desee controlar (Bonanomi *et al.*, 2007). Recientemente, el control de plagas y enfermedades de plantas promovió el uso de materia orgánica selectiva o productos derivados de ésta (Meghvansi y Varma, 2015). Particularmente, la degradación de materia orgánica en el suelo bajo condición anaerobia, indujo la aparición de la biofumigación y paralelamente sus variantes; todas ellas, con la finalidad de sustituir al bromuro de metilo, pesticidas y contribuir con una agricultura orgánica (Meghvansi y Varma, 2015; Shennan *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2016).

for improvement and evaluation of its variants are made, and practical applications are presented.

Key words: Volatile fatty acids, flood, oxidation-reduction potential, pH.

Before the use of chemical products for the control of pests and diseases, crop rotation and the incorporation of organic matter in the soil were the two most widely used methods in agriculture for this purpose (Bailey and Lazarovits, 2003). The latter is still being used, but the results for the control of plant diseases in the soil have a wide variation related to the amount and type of organic matter, the crop to be protected and the pathogen to be controlled (Bonanomi *et al.*, 2007). Recently, the control of plant pests and diseases promoted the use of selective organic matter or its byproducts (Meghvansi and Varma, 2015). In particular, the decomposition of organic matter in the soil under anaerobic conditions led to the appearance of biofumigation and its variants, all of which have the intention of substituting methyl bromide and pesticides, and contributing towards organic agriculture (Meghvansi and Varma, 2015; Shennan *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2016).

Soil biofumigation has focused on the incorporation of residues, complete plants, or seeds of the species of the Brassicaceae family into the soil, some of the most important of which are *Brassica carinata*, *B. juncea* and *B. napus*, followed by covering the soil with plastic, where residues decompose, producing toxic compounds for organisms that are harmful to the crops (Ríos-Cano, 2017). Variations of biofumigation are the biological soil disinfestation (BSD), later named anaerobic soil disinfestation (ASD), and finally reductive soil disinfestation (RSD). The purpose of disinfestations is to eliminate or reduce organisms

La biofumigación se ha centrado en la incorporación al suelo de residuos, plantas completas, o semillas de las especies de la familia Brassicaceae, entre las que destaca *Brassica carinata*, *B. juncea* y *B. napus*, posteriormente cubrir el suelo con plástico, donde al descomponerse los residuos, se producen compuestos tóxicos para organismos perjudiciales de los cultivos agrícolas (Ríos-Cano, 2017). Variantes de la biofumigación, son la desinfestación biológica del suelo (DBS), luego nombrada desinfestación anaerobia del suelo (DAS) y finalmente desinfestación reductiva del suelo (DRS). Las desinfestaciones tienen la finalidad de eliminar o reducir organismos en el suelo que dañan los cultivos agrícolas, mediante la incorporación tanto de especies de Brassicaceae, como de otras plantas, compuestos orgánicos y residuos de cosecha, todo en un ambiente donde el suelo se satura con agua y se cubre con plástico (Momma *et al.*, 2008). En un principio, se denominó DBS, debido a que la degradación del material añadido implica un proceso microbiológico; luego se acuñó la DAS, por ser indispensable que el suelo careciera de oxígeno; finalmente, el término DRS, está sustituyendo a los anteriores, al determinar que además de una condición de anaerobiosis, es indispensable que el potencial oxido-reducción (POR) llegue a un nivel reductivo con valores de -100 a -400 mv, el pH de suelo se acidifique y que se produzcan ácidos grasos volátiles (AGVs). No obstante, los términos DBS y DAS continúan en uso y paulatinamente son sustituidos por DRS; en esta revisión se usará DRS como sinónimo de DBS y DAS.

La DRS es una técnica relativamente novedosa, poco conocida en México y cuyas causas no se conocen del todo, pero se investigan en distintos países; consecuentemente, los objetivos de ésta revisión son mostrar los avances, logros y proponer

in the soil that harm crops by incorporating species of Brassicaceae and of other plants, organic compounds and crop residues in an environment where the soil is saturated with water and covered with plastic (Momma *et al.*, 2008). It was initially named BSD, since the degradation of the material added implies a microbiological process; next, the term ASD was coined due to the importance of the lack of oxygen; finally, the term RSD is replacing the previous ones because, along with anaerobiosis, it is also crucial for the oxidation-reduction potential (ORP) to reach a reductive level with values of -100 to -400 mv, the pH of the soil to acidify and for volatile fatty acids (VFAs) to be produced. However, the terms BSD and ASD are still being used and are gradually being replaced with RSD; this revision will consider RSD as a synonym of BSD and ASD.

RSD is a relatively new technique, not widely known in Mexico, and with causes that are not entirely known, but they are being investigated in different countries. Therefore, the aims of this revision are to show the advances, achievements and to propose how to improve the efficiency and efficacy of this technique, used for the control of organisms in the soil that are harmful for crops. The topic of RSD has been revised before, evaluating different inputs for different types of pathogens, and even with an approach of meta-analysis (Momma *et al.*, 2013; Shennan *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2016), which supports the aim of this work.

In consequence, the approach of this revision places emphasis on: i) historical development; ii) principles that back them; iii) proposals to improve and evaluate their variants. All this, supported by the integration of part of the recently produced knowledge, as well as by the bases of additional modifications to improve RSD.

como mejorar la eficiencia y eficacia de esta técnica, utilizada para el manejo de organismos en el suelo perjudiciales para los cultivos agrícolas. Con anterioridad, el tema de la DRS ha sido revisado, en donde se evaluaron diferentes insumos, para distintos tipos de patógenos e incluso con un enfoque de meta-análisis (Momma *et al.*, 2013; Shennan *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2016), lo cual apoya al objetivo de este ensayo.

Consecuentemente, el enfoque de la presente revisión hace énfasis en: i) desarrollo histórico; ii) principios que la sustentan; iii) propuestas para mejorar y evaluar sus variantes. Todo ello, sustentado en integrar parte del conocimiento generado recientemente, así como fundamentar modificaciones adicionales para mejorar la DRS.

Análisis retrospectivo de la DRS. Recientemente, en México, se analizó el estatus de los pesticidas, incluidos los fumigantes, los criterios del análisis, se fundamentan en la peligrosidad detectada por agencias internacionales, entre las que destacan la Organización Mundial de la Salud, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Red Internacional de Plaguicidas; el Cuadro 1, destaca los fumigantes comúnmente utilizados en México, algunos como el Bromuro de Metilo, la Cloropicrina, el 1,3-Dicloropropeno y el metam-sodio son considerados altamente peligrosos; consecuentemente, la necesidad en México y el mundo de buscar nuevas alternativas para una agricultura sostenible (Bejarano-González, 2017).

Una alternativa para el manejo de fitopatógenos en el suelo es la DRS, que incluye inundación, la adición y descomposición de la materia orgánica, la anaerobiosis, los cambios de pH y POR y la producción de AGVs. En el pasado, cada tópico fue investigado por separado, como métodos para el control de fitopatógenos en el suelo y se abordarán como antecedentes de la DRS.

Retrospective analysis of RSD. Recently in Mexico, the status of pesticides was analyzed in a study including fumigants; the criteria of the analysis are based on the danger found by international agencies, the most important of which are the International Health Organization, the United Nations Food and Agriculture Organization, and the Pesticide Action Network. Table 1 highlights the most commonly used fumigants in Mexico, some of which – such as methyl bromide, Chloropicrin, 1,3-Dichloropropene and metham-sodium are considered highly dangerous. Hence the need throughout Mexico and the world to seek new alternatives for a sustainable agriculture (Bejarano-González, 2017).

An alternative for the management of plant pathogens in the soil is RSD, which includes flooding, adding and decomposing organic matter, anaerobiosis, changes in pH and ORP, and the production of VFAs. In the past, each topic was researched separately as methods for the control of plant pathogens in the soils and will be regarded as precedents of RSD.

Flooding soils planted with banana trees resulted in the eradication of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Stover, 1955). It was later found that the sclerotia of *Verticillium dahliae* Kleb died or were unable to reproduce in flooded soils, where organic matter decomposed in anaerobic conditions (Ioannou *et al.*, 1977; Menzies, 1962). In this way, the constants found were flooding and the decomposition of organic matter under anaerobic conditions, which induced the death of plant pathogens. At the same time, the decomposition of organic matter in flooded soils were related to the production of VFAs, which has been recorded in microbiology classics since the 1960s (Alexander, 1961); the same is true for changes in pH and ORP (Ponnamperuma, 1972).

Cuadro 1. Fumigantes^{x,y,z} o pesticidas del suelo utilizados en México y su peligrosidad.
Table 1. Soil fumigants^{x,y,z} or pesticide used in Mexico and their danger.

Ingrediente activo	Formula	Usos principales	Peligrosidad ¹	Peligrosidad ²
Bromuro de metilo	CH ₃ Br	Fungicida, herbicida, insecticida y nematocida	0/0/0/1	¿???
Cloropicrina	C ₁₂ ClNO ₂	idem	1/0/0/0	
1,3-Dicloropropeno	C ₃ H ₄ Cl ₂	idem	0/1/0/0	
Dibromuro de etileno	C ₂ H ₄ Br ₂	Insecticida, nematocida.	NI	Toxico a humanos efecto dañino al ambiente
Yoduro de metilo	CH ₃ I	Fungicida, herbicida, insecticida y nematocida.	NI	idem
metam-sodio	C ₂ H ₄ NNaS ₂	idem	0/1/0/0	
Dazomet	C ₅ H ₁₀ N ₂ S ₂	idem	NI	Toxico a humanos efecto dañino al ambiente
Dimetil disulfuro ³	CH ₃ SSCH ₃	Fungicida, nematocida	NI	NI
Tetratiocarbonato de sodio ³	CNa ₂ S ₂	Nematocida	NI	NI

^x Información obtenida de Bejarano-González (2017), el valor numérico entre las diagonales (/ / / /), indican toxicidad aguda, efectos a largo plazo, toxicidad ambiental e infringir acuerdos internacionales de protección al ambiente, salud o derechos humanos por uso de pesticidas, respetivamente / Information obtained from Bejarano-González (2017); the numeric value between slashes (/ / / /), indicate acute toxicity, long term effects, and the infringement of international environmental protection, health of human rights agreements due to the use of pesticides, respectively.

^y Información obtenida de De la Cruz y Ramírez, (2018) / Information obtained from De la Cruz and Ramírez, (2018). NI = Peligrosidad no incluida en las fuentes de información ¹ y ². / Harmness not included in information sources ¹ and ².

^z La peligrosidad del Dimetil disulfuro y Tetratiocarbonato de sodio, son expuestas en las ligas: http://www.kooragro.com.mx/media/products/F.T._PALADIN_JoLxNOq.pdf y <http://www.afipa.cl/web/files/afipa/arysta2015/ENZONE.pdf>, respectivamente / The harmness of Dimethyl disulfide and sodium Tetrathiocarbonate are shown in the links http://www.kooragro.com.mx/media/products/F.T._PALADIN_JoLxNOq.pdf and <http://www.afipa.cl/web/files/afipa/arysta2015/ENZONE.pdf>, respectively.

La inundación de los suelos cultivados con plantaciones de banano, resultó en la erradicación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Stover, 1955). Posteriormente, se encontró que los esclerocios de *Verticillium dahliae* Kleb, morían o no podían reproducirse en suelo inundado, donde se descomponía materia orgánica en condición anaerobia (Ioannou *et al.*, 1977; Menzies, 1962). De tal manera que, se detectó como una constante la inundación y descomposición de la materia orgánica en condición de anaerobiosis, lo que inducían la muerte de fitopatógenos. Paralelamente, la descomposición de materia orgánica en suelo inundado se asoció con la generación de AGVs lo que fue consignado en el clásico de microbiología del suelo desde los años 60s (Alexander, 1961); además con cambios de pH y POR (Ponnamperuma, 1972).

VFAs are produced by microorganisms when these degrade the organic matter in the soil using a fermentative metabolism (Figure 1). Before RSD, acetic, butyric, formic, propionic acids and other VFAs were known to have biocide effects on fungi (Cochrane, 1958) and on bacteria (Goepfert and Hicks, 1969), and most recently, for other organisms (Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval, 2013). However, it was in Japan where Okazaki (1985) found that the addition of glucose and flooding of the soil produced volatile compounds that killed the *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* chlamydospores, in a device he designed (Figure 2); similarly, Samaniego-Gaxiola (1994) added glucose and flooded the soil, and observed the death of the *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert sclerotia. Meanwhile, Okazaki and

Los AGVs son producidos por los microorganismos al degradar la materia orgánica del suelo, mediante un metabolismo fermentativo (Figura 1). Anterior a la DRS, se sabía que los ácidos acético, butírico, fórmico, propiónico y otros AGVs tienen efecto biosida en hongos (Cochrane, 1958) y en bacterias (Goepfert e Hicks, 1969) y más recientemente para otros organismos (Samaniego-Gaxiola y Pedroza-Sandoval, 2013). Pero fue en Japón, donde Okazaki (1985) encontró que adicionando glucosa en suelo e inundando se generaban compuestos volátiles, los que mataban las clamidosporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, en un dispositivo que diseñó (Figura 2); de manera similar, Samaniego-Gaxiola (1994), añadió glucosa en suelo e inundando observó que morían los esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert. Entretanto, Okazaki y Nose (1986) determinaron que los AGVs acético, propiónico y butírico se producían en esta condición y mataban a *F. oxysporum*; aunque éste trabajo y el de Okazaki (1985) aparecieron traducidos del japonés y publicados en inglés cerca del año 2000. De ésta manera se tuvo evidencia del efecto letal de los AGVs para organismos durante la DRS o simplemente *in vitro*; lo cual se ha confirmado con trabajos posteriores

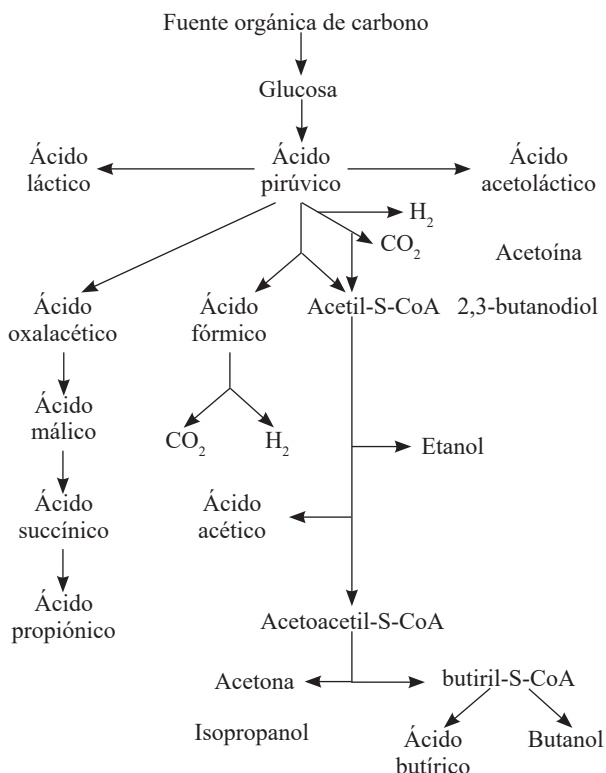


Figura 1. Ácidos grasos volátiles producidos donde al fermentar una fuente orgánica de carbono. Adaptado de Steiner *et al.*, 1977.

Figure 1. Volatile fatty acids produced the fermenting an organic source of carbon. Adapted from Steiner *et al.*, 1977.

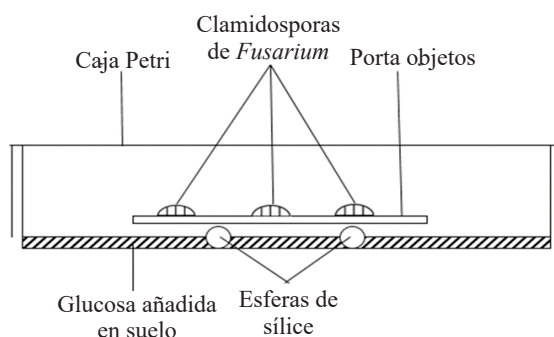


Figura 2. Dispositivo de Okazaki (1985) las clamidosporas de *Fusarium oxysporum* murieron al añadir glucosa en suelo e inundar.

Figure 2. Okazaki device (1985) when chlamydospores *Fusarium oxysporum* died when adding glucose to the soil and flooding.

(Momma 2008; Momma *et al.*, 2006; Samaniego-Gaxiola y Balagurusamy, 2013; Tenuta *et al.*, 2002).

Cabe señalar, que la presencia de AGVs en residuos de plantas como la col (*Brassica oleracea*) ya se conocía desde los 50s (Barnett y Duncan, 1953); así como los efectos fitotóxicos de los AGVs en el suelo con residuos de paja de trigo y las cantidades de ácidos producidos (Lynch, 1977; Lynch *et al.*, 1980), lo cual es de importancia debido a que cascarilla de trigo y la col son residuos comúnmente utilizados para inducir la DRS y biofumigación, respectivamente.

Finalmente, los dos primeros trabajos donde se integraron los principios de la DRS fueron Shinmura *et al.* (1999) en Japón y Blok *et al.* (2000) en Holanda, ambos para el control de hongos fitopatógenos en el suelo. Posteriormente, se determinó que los AGVs contenidos en excretas de cerdo mataban a *Verticillium dahliae* (Tenuta *et al.*, 2002). La aplicación de cascarilla de trigo para inducir DRS y matar bacterias y hongos fitopatógenos en suelo (Momma *et al.*, 2006). También se ha utilizado etanol para generar DRS (Momma *et al.*, 2010), así como residuos de pastos, alfalfa, melaza, semillas, glucosa, entre otros (Conn *et al.*, 2005; Hewavitharana y Mazzola, 2016; Momma, *et al.*, 2010; Shrestha *et al.*, 2016).

Los AGVs. Estos ácidos que se generan en la DRS, son tóxicos para nematodos, hongos y bacterias, preponderantemente cuando se encuentran en forma no ionizada en la solución del suelo u otro medio (Goepfert e Hicks, 1969; Katase *et al.*, 2009; Tenuta *et al.*, 2002). Por ejemplo, el ácido acético en su forma no ionizada o disociada (AGV_{ni}) se puede representar como CH₃CCOH, mientras que en su forma ionizada (AGV_{si}) como CH₃CCO⁻ + H⁺, una u otra forma predominará en función del pH del medio donde se encuentren; los principios y

Nose (1986) determinó que el ácido acético, propiónico y butírico VFAs se produjeron bajo estas condiciones y mató a *F. oxysporum*; aunque este trabajo y Okazaki's (1985) apareció traducido del japonés y publicado en inglés alrededor del año 2000. Esto proporcionó evidencia del efecto letal de los VFAs para organismos durante la DRS, o al menos *in vitro*, lo cual ha sido confirmado en trabajos posteriores (Momma 2008; Momma *et al.*, 2006; Samaniego-Gaxiola y Balagurusamy, 2013; Tenuta *et al.*, 2002).

Es worth pointing out that the presence of VFAs in residues of plants such as cabbage (*Brassica oleracea*) has been known since the 1950s (Barnett and Duncan, 1953). The same is true for the phytotoxic effects of the VFAs in the soil in wheat bran residues and the amount of acids produced (Lynch, 1977; Lynch *et al.*, 1980), which is important, since wheat straw and kale residues are commonly used to induce RSD and biofumigation, respectively.

Finally, the first two authors that included the principles of RSD were Shinmura *et al.* (1999) in Japan and Blok *et al.* (2000) in the Netherlands, both for the control of pathogenic fungi in the soil. The VFAs found in pig slurry were later found to kill *Verticillium dahliae* (Tenuta *et al.*, 2002). Wheat bran was used to induce RSD and kill pathogenic bacteria and fungi in the soil (Momma *et al.*, 2006). Ethanol has also been used to produce RSD (Momma *et al.*, 2010); as well as grass, alfalfa, molasses, seeds, glucose, and others (Conn *et al.*, 2005; Hewavitharana and Mazzola, 2016; Momma, *et al.*, 2010; Shrestha *et al.*, 2016).

The VFAs. These acids, produced in the RSD, are toxic to nematodes, fungi and bacteria, mostly when in a non-ionized form in the soil solution or another medium (Goepfert and Hicks, 1969; Katase *et al.*, 2009; Tenuta *et al.*, 2002). For example, acetic acid,

cálculos para determinar las formas ionizada no ionizada se detallan por Samaniego-Gaxiola y Pedroza-Sandoval (2013). La concentración de AGVsni en la solución del suelo desciende dramáticamente conforme el pH es menos ácido; la Figura 3, indica la concentración de cuatro AGVsni en función del pH. Este comportamiento de los AGVs es de suma importancia para predecir su toxicidad hacia los organismos; por ejemplo 100 mmol L⁻¹ de ácido acético a pH 5.5 genera alrededor de 13.7 mmol L⁻¹

in its non-ionized or dissociated form (VFAsni) can be represented as CH₃CCOH, whereas in its ionized form, (VFAsi) as CH₃CCO⁻ + H⁺, and one or another will predominate based on the pH of the medium in which it is found; the principles and calculations to determine the ionized non-ionized forms are detailed by Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval (2013). The concentration of VFAsni in the soil solution decreases dramatically as the pH becomes less acidic; Figure 3 indicates

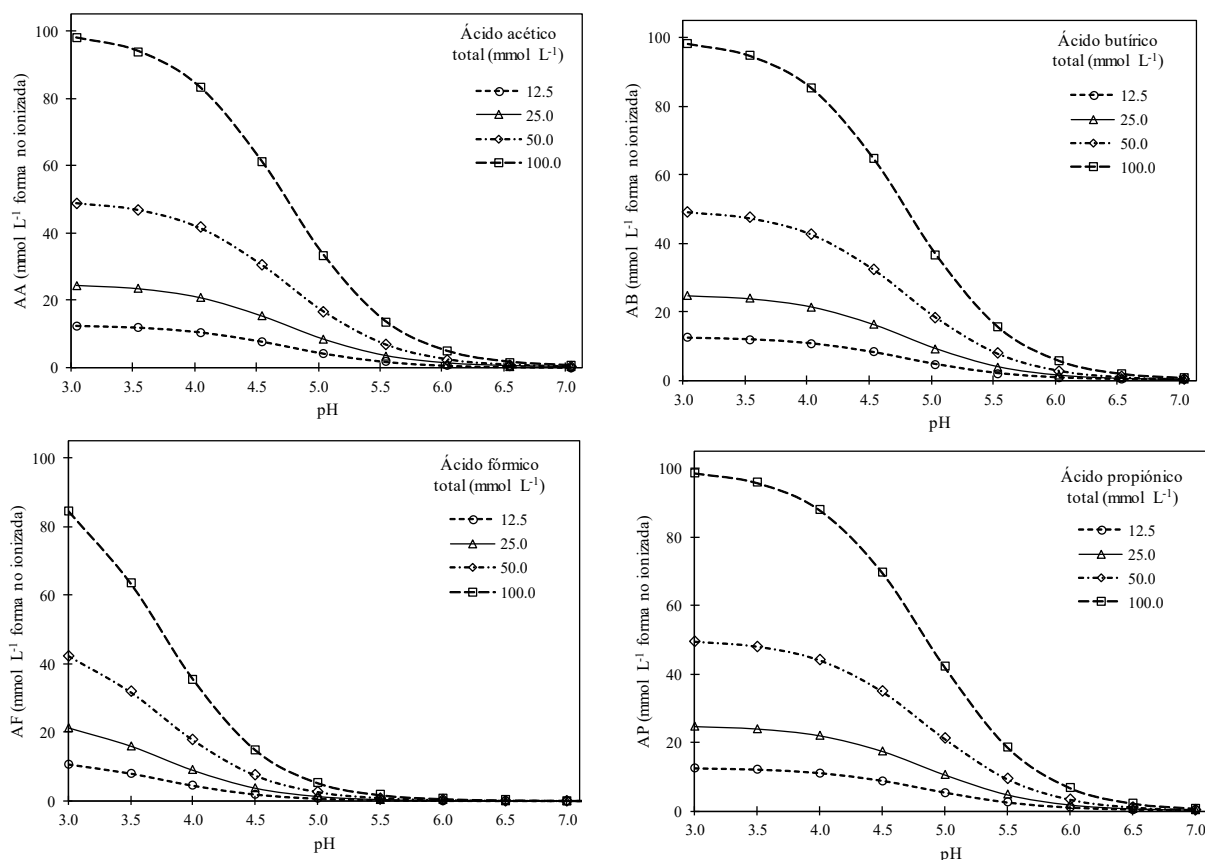


Figura 3. Formas no ionizadas de los ácidos acético, butírico, fórmico y propiónico, cuando se encuentran a concentraciones de 12.5, 25.0, 50.0 y 100.0 mmol L⁻¹, todo en función del pH de la solución. Las gráficas fueron elaboradas por los autores utilizando los datos del peso molecular y pK de cada ácido y la ecuación Henderson-Hasselbalch, todo citado por Samaniego-Gaxiola y Pedroza-Sandoval (2013).

Figure 3. Non-ionized forms of acetic, butyric, formic and propionic acids at concentrations of 12.5, 25.0, 50.0 and 100.0 mmol L⁻¹, all based on the pH of the solution. The graphs were created by the authors using the data of the molecular weight and pH of each acid and the Henderson-Hasselbalch equation, all quoted by Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval (2013).

en su forma no ionizada (tóxica), mientras que 25 mmol L⁻¹ de ácido butírico a pH 4.5 genera 15.4 mmol L⁻¹; es decir, la acidificación de una unidad (de 5.5 a 4.5) permitiría usar cuatro veces menos de ácido butírico que acético con similar generación de AGVsni. Cabe señalar, que cada AGVs tiene diferente comportamiento en función del pH, particularmente el ácido fórmico (Figura 3); asimismo, la toxicidad de *V. dahliae* y *P. omnivora* murieron en función del tipo, concentración y el tiempo de su exposición a los AGVs (Samaniego-Gaxiola y Balagurusamy, 2013; Tenuta *et al.*, 2002).

Propuesta, AGVs modificando el pH. Desde 1969, Goepfert e Hicks (1969) demostraron que al acidificar con HCl el medio que contenía AGVs únicamente moría la bacteria *Salmonella typhimurium*; recientemente, Samaniego-Gaxiola *et al.* (2018) registraron la muerte de los esclerocios de *P. omnivora* solo si se acidificaba con H₂SO₄ una solución obtenida del suelo tratado para DRS y que contenía AGVs. Por tanto, en condiciones de campo, la adición de algún ácido fuerte después de dos a siete días de iniciado el proceso de DRS muy probablemente incrementa la toxicidad de los AGVs, y consecuentemente, la muerte de los organismos susceptibles que se desee eliminar o disminuir su población. En el laboratorio, se determinó la cantidad de H₂SO₄ necesario para ajustar el pH ~4 en suelos con DRS (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2018). Datos adicionales se muestran en este estudio, adaptados de Estupiñán-Herrera *et al.* (2010) donde se indujo cambios de pH en suelo adicionado con fructosa e inundación, posterior a ello, disminuciones adicionales del pH ~4 añadiendo H₂SO₄, Figura 4 A-D.

De la Figura 4, se demuestra que el pH puede bajar ~4. Una agenda a investigar que proponemos, sería evaluar el cambio de pH~4 después de

the concentration of four VFAsni based on the pH. The behavior of the VFAs is crucial to understand its toxicity for organisms. For example, 100 mmol L⁻¹ of acetic acid, with a pH of 5.5 generates approximately 13.7 mmol L⁻¹ in its non-ionized form (toxic), whereas 25 mmol L⁻¹ of butyric acid at a pH of 4.5 generates 15.4 mmol L⁻¹; in other words, the acidification of one unit (from 5.5 to 4.5) results in the use of four times less butyric than acetic acid with a similar production of VFAsni. It is worth pointing out that each VFAs has a different behavior based on the pH and particularly formic acid (Figure 3); likewise, the toxicity of *V. dahliae* and *P. omnivora* died based on the type, concentration and the time of exposure to the VFAs (Samaniego-Gaxiola and Balagurusamy, 2013; Tenuta *et al.*, 2002).

Figure 3. Non-ionized forms of acetic, butyric, formic and propionic acids at concentrations of 12.5, 25.0, 50.0 and 100.0 mmol L⁻¹, all based on the pH of the solution. The graphs were created by the authors using the data of the molecular weight and pH of each acid and the Henderson-Hasselbalch equation, all quoted by Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval (2013).

Proposal, VFAs modified by the pH. In 1969, Goepfert and Hicks (1969) proved that only when acidifying with HCl the medium that contained VFAs, *Salmonella typhimurium* bacteria died; recently, Samaniego-Gaxiola *et al.* (2018) registered the death of the *P. omnivora* sclerotia only when acidifying with H₂SO₄ a solution obtained from the soil treated for RSD that contained VFAs. Therefore, under field conditions, addition of a strong acid after 2 to 7 days of starting the RSD process may very likely increase the toxicity of VFAs, and consequently kill susceptible organisms that one wants to eliminate or reduce. In the laboratory, we determined the amount of H₂SO₄

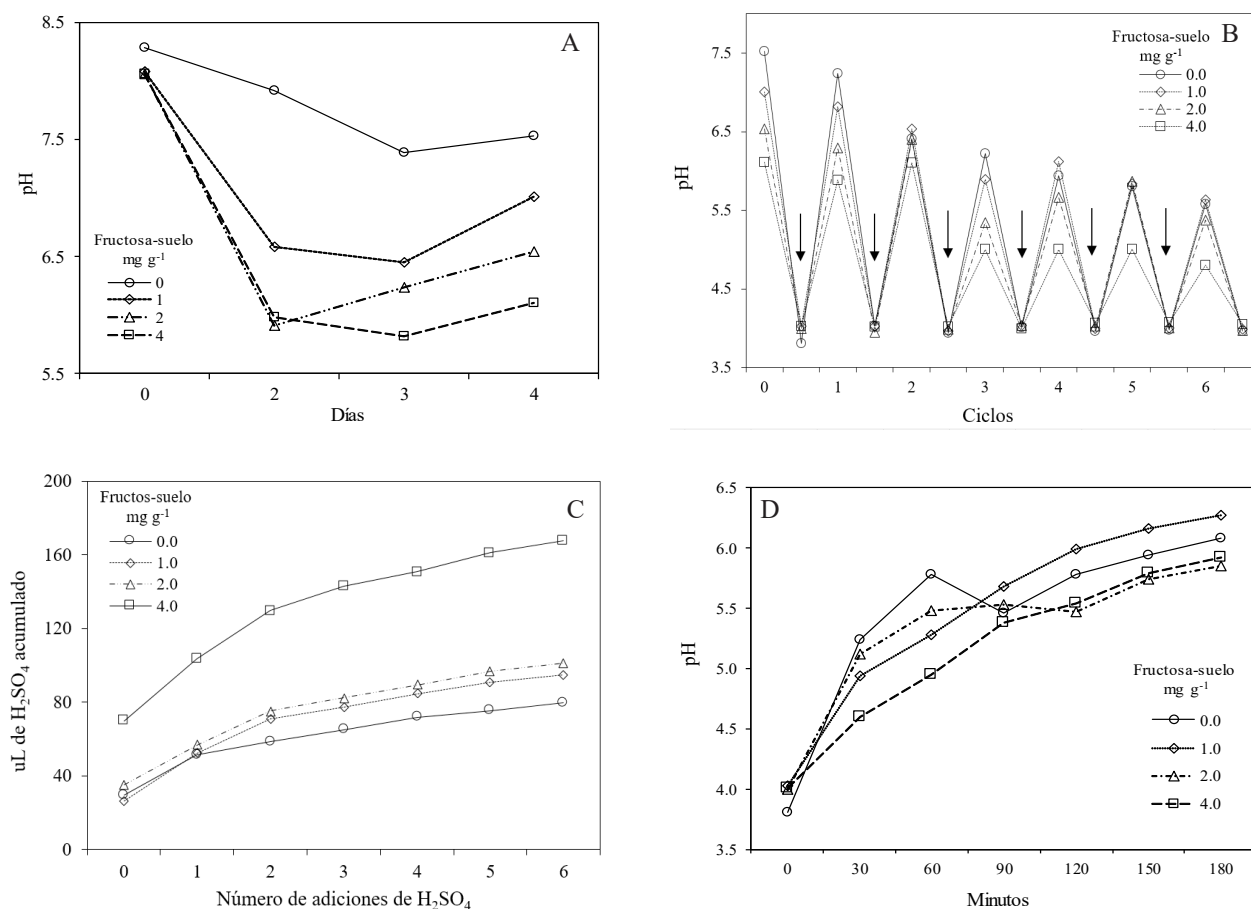


Figura 4. A-D. Cambios en el pH y cantidades de H_2SO_4 necesarias para ajustar el pH ~4 después de adicionar fructosa en suelo e inundar. A. Cambio de pH con distintas dosis de fructosa añadida al suelo inundado. B. Disminución de siete veces (seis ciclos) el pH ~4 añadiendo H_2SO_4 (flechas) a las soluciones del suelo, las soluciones provienen del día cuatro de la Figura 4A. C. Cantidad acumulada (uL) de H_2SO_4 adicionado por siete veces para ajustar el pH ~4, lo que corresponden con las flechas de la Figura 4B. D. Tiempo de retorno del pH después de ajustarlo con el ácido a ~4, para las soluciones del día cuatro de la Figura 4A. Adaptado de Estupiñán-Herrera *et al.* (2010).

Figure 4. A-D. Changes in pH and amounts of H_2SO_4 needed to adjust the pH ~4 after adding fructose to the soil and flooding it. A. Change in pH with different doses of fructose added to the flooded soil. B. Sevenfold reduction (six cycles) of the pH ~4 adding H_2SO_4 (arrows) to the soil solutions; solutions come from day 4 of Figure 4A. C. Accumulated amount (uL) of H_2SO_4 added sevenfold to adjust the pH ~4, which corresponds to the arrows in Figure 4B. D. Time of return of the pH after adjusting it with the acid to ~4, for the solutions of day 4 of Figure 4A. Adapted from Estupiñán-Herrera *et al.* (2010).

la DRS al adicionar H_2SO_4 ; hacerlo en distintos tipos de suelo en campo, utilizando varios insumos, y determinando la viabilidad de los fitopatógenos. Asumiendo que un suelo una vez que alcanzó su máximo descenso de pH después de la DRS, que puede saturarse con agua en un 25 % de su volumen, entonces se requerirían alrededor de 3.3

required to adjust the pH ~4 in soils with RSD (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2018). Additional data are shown in this study, adapted from Estupiñán-Herrera *et al.* (2010), where changes in pH were induced in soil with added fructose and flooding, followed by additional reductions of the pH ~4 by adding H_2SO_4 , Figure 4 A-D.

toneladas de H_2SO_4 para ajustar el pH ~ 4 ; todo ello extrapolando a una hectárea los datos de la Figura 4C, los complementarios de Estupiñán-Herrera *et al.* (2010) y Samaniego *et al.* (2018).

Uso de otros compuestos y/o AGVs directamente. Durante la DRS, además de los AGVs, distintos compuestos letales para fitopatógenos en el suelo se han detectado y otros compuestos volátiles más que se han destacado por inhibir a fitopatógenos (van Agtmaal *et al.*, 2015). Por tanto, la DRS podría incrementar su eficiencia y eficacia al combinarla con la adición de los compuestos letales ya conocidos y aquellos por determinar. Algunos de esos compuestos podrían adicionarse justo después de que el pH y POR alcancen su máximo cambio.

En la DRS además de los AGVs se pueden formar compuestos biosidas como los isotiocianatos y nitrilos que son productos del hidrólisis (en el suelo) de los glucosinolatos, éstos últimos son metabolitos secundarios contenidos en las especies de plantas de la familia Brassicaceae, producidos en el suelo tanto en la biofumigación como en la DRS (Blok *et al.*, 2000; Ríos-Castaño, 2017). Los iones Fe^{2+} y Mn^{2+} en agua en una condición reductiva alcanzada por la DRS, fueron letales para *F. oxysporum*, aunque Momma *et al.* (2011) sugiere confirmar e indagar el mecanismo por el que los iones tienen tal efecto. De acuerdo al pH alcalino o ácido del suelo, los AGVs pueden continuar descomponiéndose en compuestos igualmente letales para fitopatógenos en el suelo; a pH ácido y alcalino se formarán ácido nitroso y amoníaco, respectivamente (Lazarovits *et al.*, 2005; Tenuta y Lazarovits, 2002).

Los AGVs pueden estar presentes en grandes cantidades en medios como excretas líquidas de cerdo, las emulsiones de pescado procesado industrialmente y otras fuentes (Abbasi *et al.*, 2009; Samaniego-Gaxiola y Pedroza-Sandoval, 2013;

Figure 4 shows that the pH can fall to ~ 4 . An agenda to investigate what we propose would be to evaluate the change in pH ~ 4 after RSD when adding H_2SO_4 ; to do it in different types of soil in the field, using several inputs, and to determine the feasibility of the plant pathogens. Assuming that a soil type, after having reached its greatest reduction in pH after RSD, can be saturated with water in 25% of its volume, it would require around 3.3 tons of H_2SO_4 to adjust the pH ~ 4 ; all this, extrapolating to the data in Figure 4C to one hectare, complementary to Estupiñán-Herrera *et al.* (2010) and Samaniego *et al.* (2018).

Direct use of other compounds and/or VFAs. During the RSD, along with the VFAs, different compounds, lethal to the plant pathogens in the soil, have been found, along with other volatile compounds that have stood out for inhibiting pathogens (van Agtmaal *et al.*, 2015). Therefore, the RSD may increase its efficiency and efficacy in combination with the addition of the known lethal compounds which are still to be determined. Some of these compounds may be added immediately after the pH and the ORP reach their maximum change.

In the RSD, along with VFAs, biocidal compounds may be formed, such as isothiocyanates and nitriles, which are products of hydrolysis (in the soil) of the glucosinolates, the latter of which are secondary metabolites contained in the plant species of the Brassicaceae family, produced in the soil, both in biofumigation and in the RSD (Blok *et al.*, 2000; Ríos-Castaño, 2017). Fe^{2+} and Mn^{2+} ions in water in a reductive condition reached by the RSD were lethal to *F. oxysporum*, although Momma *et al.* (2011) suggest the confirmation and investigation of the mechanism that give these ions such an effect. Depending on the alkalinity or

Tenuta *et al.*, 2002); por tanto, su uso potencial a partir de dichas fuentes. Adicionalmente, AGVs podrían generarse en suelo o solución acuosa utilizando melaza, para su uso posterior. En experimentos de nuestra autoría, utilizando la metodología de Samaniego-Gaxiola *et al.* (2018) y donde se mezclaron melaza, agua y suelo, o melaza y agua, fueron medidos el pH y el POR cómo se muestran en la Figura 5; el pH y el POR cambiaron de manera esperada, si bien, no se determinaron las cantidades de AGVs, de cualquier manera, es de esperar la formación de AGVs al mezclar melaza en suelo y/o agua.

Una modalidad de la DRS es el uso de etanol (Momma *et al.*, 2010). También podría utilizarse los ácidos acético, fórmico y otros de manera directa en suelo previamente saturado, como para incrementar

acidity of the soil, VFAs may continue decomposing in compounds equally lethal for plant pathogens in the soil; in an acid and alkaline pH, nitrous acid and ammonia will be formed, respectively (Lazarovits *et al.*, 2005; Tenuta and Lazarovits, 2002).

VFAs may be present in large amounts in media such as pig slurry, the emulsions of industrially processed fish and other sources (Abbasi *et al.*, 2009; Samaniego-Gaxiola and Pedroza-Sandoval, 2013; Tenuta *et al.*, 2002); therefore, its potential use from previously mentioned sources. In addition, VFAs may be generated in the soil or aqueous solutions using molasses for later use. In earlier experiments carried out by us, using the method by Samaniego-Gaxiola *et al.* (2018) and where molasses, water and soil, or molasses and water were mixed, the pH and ORP were measured

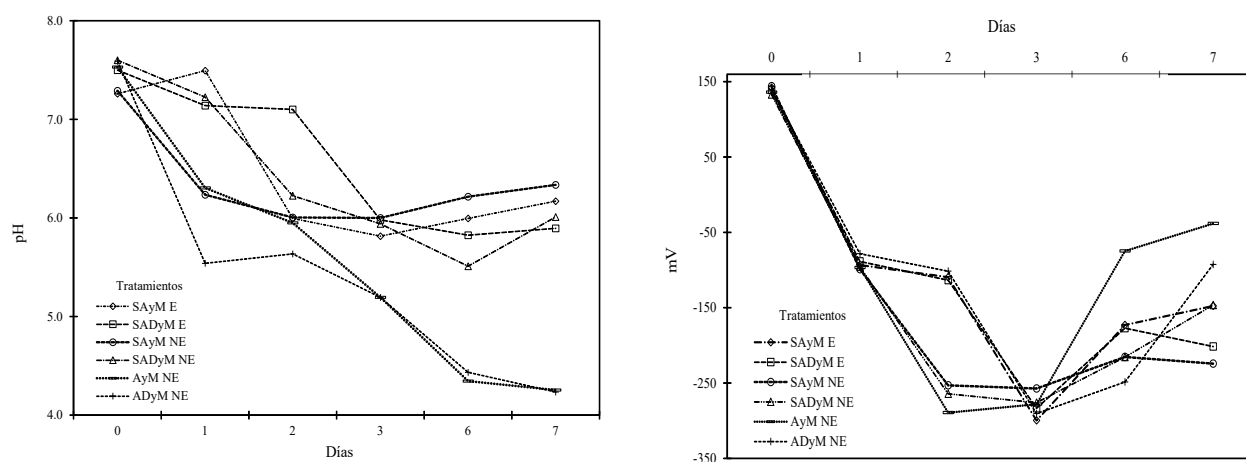


Figura 5. Tratamientos donde se registraron cambios de pH y POR (mV). El suelo, agua corriente y melaza, permanecieron 20 min en autoclave antes de mezclarlos --◇-- SAyM E; suelo, agua destilada y melaza permanecieron 20 min en autoclave antes de mezclarlos --□-- SADyM E; suelo, agua corriente y melaza se mezclaron --○-- SAyM NE; suelo, agua destilada y melaza se mezclaron --△-- SADyM NE; mezcla de agua corriente y melaza AyM NE; mezcla de agua destilada y melaza --- ADyM NE. Cuando se utilizó suelo, agua y melaza fue 150 g, 90 ml y 1% v/v (agua-melaza), respectivamente; y cuando se utilizó agua más melaza se utilizó 90 ml y 1% v/v, respectivamente. La autoclave estuvo a ~121 °C y 280 kPa.

Figure 5. Treatments which registered changes in pH and ORP (mV). The soil, tap water and molasses were kept in an autoclave for 20 min before mixing --◇-- SAyM E; soil, distilled water and molasses were kept in --□-- SADyM E; soil, tap water and molasses were mixed --○-- SAyM NE; soil, distilled water and molasses were mixed --△-- SADyM NE; mixture of tap water and molasses AyM NE; mixture of distilled water and molasses --- ADyM NE. When using soil, water and molasses, it was 150 g, 90 ml and 1% v/v (water-molasses), respectively; and when using water and molasses, we used 90 ml and 1% v/v, respectively. The autoclave was kept at ~121 °C and 280 kPa.

o complementar los efectos de la DRS, tal es el caso de la patente en trámite solicitada por He *et al.* (2012). La distribución de AGVs también se ha realizado por el sistema de riego (Roskopf *et al.*, 2014).

El pH ácido, inducido por DRS, podría utilizarse para incrementar la toxicidad de fungicidas o pesticidas convencionales, es decir, combinar ambas prácticas, e incluso una práctica adicional podría ser la adición de un ácido fuerte posterior a la DRS y uso de pesticidas. Al respecto, se determinó que en solución amortiguador a pH 4 (base de acetato-ácido acético) y 1000 ppm del fungicida Propiconazole (Tilt®), los esclerocios de *P. omnivora* murieron en 20 min hasta en un 60%; bajo la misma condición, pero a pH 7 se necesitó de 72 horas para que los esclerocios murieran en similar porcentaje (Samaniego-Gaxiola, 2008). Asimismo, la DRS se ha utilizado combinándola con la solarización, como una alternativa para sustituir la fumigación con Bromuro de Metilo (Butler *et al.*, 2014).

Inoculación de suelo y planta con otros organismos después de la DRS. Numerosos cambios biológicos se han reportado después de la DRS, como la aparición de antagonistas de los fitopatógenos, aumento del ciclo de nutrientes, mayor crecimiento de los cultivos, la disminución de los índices de diversidad de bacterias y hongos y la aparición de microorganismos dominantes, todo con respecto a suelos sin DRS (Huang *et al.*, 2015, 2016; Hewavitharana y Mazzola, 2016; Liu *et al.*, 2016). Después de la DRS, se ha registrado el establecimiento de manera espontánea o inducida de especies de *Trichoderma* colonizando fitopatógenos como *P. omnivora* y *Sclerotium rolfsii* (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2013); pero también, el restablecimiento de fitopatógenos previamente eliminados, tal es el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* y *Monosporascus* en un

as shown in Figure 5; the pH and the ORP changed as expected, although the amounts of VFAs were not determined. Regardless of this, the formation of VFAs is expected when mixing molasses in soil and/or water.

A way to induce RSD is the use of ethanol (Momma *et al.*, 2010). Acetic, formic, and other acids could also be used directly in previously saturated soil to increase or complement the effects of the RSD, as in the case of the patent pending requested by He *et al.* (2012). The distribution of VFAs has also been carried out with the system of irrigation (Roskopf *et al.*, 2014).

The acidic pH, induced by the RSD, could be used to increase the toxicity of conventional fungicides or pesticides, i.e., combining both practices, and even an additional practice could be the addition of a strong acid after RSD and use of pesticides. In this regard, it was determined that in a buffer solution at a pH of 4 (base of acetate-acetic acid) and 1000 ppm of the fungicide Propiconazole (Tilt®), the *P. omnivora* sclerotia died in 20 min by up to 60%; under the same condition, but at a pH of 7, 72 hours were required for the sclerotia to die in a similar percentage (Samaniego-Gaxiola, 2008). Likewise, the RSD has been used in combination with solarization as an alternative to substitute dusting with methyl bromide (Butler *et al.*, 2014).

Inoculation of soil and plant with other organisms after RSD. Several biological changes have been reported after RSD, such as the appearance of antagonists of plant pathogens, an increase in nutrient cycles, an increase in crop growth, the reduction of the diversity of bacteria and fungi, and the appearance of dominant microorganism, all of this regarding soils without RSD (Huang *et al.*, 2015, 2016; Hewavitharana and Mazzola, 2016; Liu *et al.*, 2016). After RSD, we recorded the spontaneous or induced establishment of species

segundo ciclo del cultivo de sandía *Citrullus lanatus* (Liu *et al.*, 2018). Sin embargo, después de la DRS, la inoculación al suelo, semillas y plántulas con especies de *Trichoderma* u otros hongos y bacterias, probablemente tendría efectos benéficos para el control de enfermedades de plantas; particularmente al evaluar bacterias obtenidas de la DRS que muestren antagonismo hacia fitopatógenos (Ueki *et al.*, 2017, 2018), los endofíticos de *Trichoderma*, bacterias y otros hongos (Druzhinina *et al.*, 2011; Eljounaidi *et al.*, 2016; Santoyo *et al.*, 2016). Una gran cantidad de compuestos tóxicos para los fitopatógenos y benéficos para las plantas son producidos por bacterias y hongos en el suelo tanto *in vitro* como en la DRS (Hayat *et al.*, 2010; Hewavitharana *et al.*, 2014; Siddiquee *et al.* 2012); tanto los compuestos como los microorganismos, después de la DRS, podrían seguir evaluándose, introduciéndolos o favoreciendo su producción para el control de los fitopatógenos. Por ejemplo, de *Trichoderma harzianum* se detectaron 258 compuestos volátiles, con 50 % de abundancia de ácido acético cuando la extracción para su detección se realizó con metanol (Siddiquee *et al.* 2012), es decir, se podría investigar si el hongo es capaz de producir este ácido en cantidad significativa posterior a una DRS.

Aplicaciones prácticas de la DRS. Los cultivos próximos a rastrear, como la alfalfa en su último año de cultivo; residuos de cultivo como los cereales; la poda del césped; residuos de cosecha como los ruzos de la nuez pecanera; así como materiales orgánicos abundantes en cada región de México, son algunas de las múltiples fuentes de Carbono que se podrían usar y evaluar para una DRS.

Habría que considerar para una evaluación en particular, la temperatura a la que la DRS es más efectiva, y aunque está poco estudiada, temperaturas del suelo de 17 a > 30 °C ha funcionado

de *Trichoderma* colonizing pathogens such as *P. omnivora* and *Sclerotium rolfsii* (Samaniego-Gaxiola *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2013); but also the reestablishment of previously eliminated pathogens such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Monosporascus* in a second cycle of the watermelon crop *Citrullus lanatus* (Liu *et al.*, 2018). Moreover, after RSD, the inoculation of soil, seeds and seedlings with species of *Trichoderma*, or other fungi, and bacteria may have beneficial effects in the control of plant diseases; particularly when evaluating bacteria obtained from the RSD that show antagonism towards phytopathogens (Ueki *et al.*, 2017, 2018), the endophytes of *Trichoderma*, bacteria and other fungi (Druzhinina *et al.*, 2011; Eljounaidi *et al.*, 2016; Santoyo *et al.*, 2016).

A large amount of compounds, toxic to plant pathogens and beneficial to plants, are produced by bacteria and fungi in the soil, both *in vitro* and in the RSD (Hayat *et al.*, 2010; Hewavitharana *et al.*, 2014; Siddiquee *et al.* 2012); both the compounds and the microorganisms, after the RSD, may continue to be evaluated, introducing them or promoting their production for the control of pathogens. For example, 258 volatile compounds of *Trichoderma harzianum* were found, with an abundance of 50% of acetic acid when the extraction for their detection was carried out using methanol (Siddiquee *et al.* 2012), i.e., it is possible to investigate if the fungus is capable of producing this acid in a significant amount after an RSD.

Practical applications of the RSD. The next crops to be studied, such as alfalfa in its last year of planting, residues of crops such as cereals, grass trimmings, residues of crops such as pecan shells, as well as organic materials abundant in each region of Mexico, are some of the multiple sources of carbon that could be used and evaluated for an RSD.

satisfactoriamente (Shennan *et al.*, 2014; Yossen *et al.*, 2008). Los tipos de materia orgánica y sus cantidades son también factores que afectan la DRS, de manera general, se necesitan 4 mg de Carbono por cada gramo de suelo (4 mg g⁻¹), lo que equivale a 2 Kg m⁻² de paja de arroz/suelo (salvado) (Serrano-Pérez *et al.*, 2017). El carbono orgánico fácilmente oxidado (CFO) es una forma altamente apropiada para incorporarse al suelo y provocar una exitosa DRS. Por ejemplo, la glucosa y la cascarilla de trigo tienen 276 y 122 g Kg⁻¹ de CFO, respectivamente, pero la primera induce los cambios más grandes y efectividad de la DRS para controlar a *Fusarium oxysporum* (Liu *et al.*, 2016). Composta de estiércol (11 Mg ha⁻¹) no fue efectiva para inducir los cambios típicos de la DRS y no controló a *R. solani* y *Pratylenchus penetrans* (Hewavitharana y Mazzola, 2016); entretanto, estiércol y otros tipos de materia orgánica descompuestos en condiciones aerobias han tenido efectos inconsistentes y algunas veces han favorecido fitopatógenos como *R. solani* (Bonanomi *et al.*, 2007). Por tanto, no se ha determinado que estiércol (maduro o compostado) induzcan DRS, aunque evaluaciones adicionales podrían determinar que si lo puede ser.

Es importante mencionar que los AGVs se pierden por volatilización y degradación microbiana, como ocurrió entre uno a dos días a concentraciones hasta ~ 500 mmol L⁻¹ contenido en estiércoles frescos de cerdo y ganado lechero (Kirchmann & Lundvall, 1993); sin embargo, cuando el suelo tiene un suministro constante de AGVs su degradación puede retrasarse meses (Hrapovic y Rowe, 2002). Consecuentemente, el uso y aplicación continua de excretas frescas de ganado que contengan AGVs podría evaluarse, tomando en cuenta si bacterias patógenas de animales y humanos sobreviven.

En los últimos 10 años, la investigación en la DRS se ha enfocado en mejorar su eficiencia, pero en México aún falta por evaluarse en distintos

For a particular evaluation, it may be worth considering the temperature at which RSD is most effective, and although it is scarcely studied, soil temperatures of 17 to > 30 °C have worked in a satisfactory manner (Shennan *et al.*, 2014; Yossen *et al.*, 2008). The types of organic matter and their amounts are also factors that have an effect on the RSD; in general terms, 4 mg of carbon are required for every gram of soil (4 mg g⁻¹), which is equal to 2 Kg m⁻² of rice hay/soil (bran) (Serrano-Pérez *et al.*, 2017). Easily oxidized organic carbon (EOC) is a highly appropriate method that can be incorporated to the soil and could lead to a successful RSD. For example, glucose and wheat hay have 276 and 122 g Kg⁻¹ of EOC, respectively; the former induces the greatest changes and effectiveness of RSD to control *Fusarium oxysporum* (Liu *et al.*, 2016). Manure compost (11 Mg ha⁻¹) was not effective to induce the typical changes of the RSD and did not control *R. solani* and *Pratylenchus penetrans* (Hewavitharana and Mazzola, 2016); meanwhile, manure and other types of organic matter decomposed in aerobic conditions have had inconsistent effects, and have occasionally favors phytopathogens such as *R. solani* (Bonanomi *et al.*, 2007). Currently, manure (mature or composted) has not consistently showed induction of RSD, although additional approaches have to be explored.

It is important to mention that VFAs are lost by volatilization and microbial degradation, as it occurred from one to two days with concentrations of up to ~ 500 mmol L⁻¹ contained in fresh pig and dairy cow manures (Kirchmann & Lundvall, 1993); however, when the soil has a constant supply of VFAs, its degradation could be delayed for months (Hrapovic and Rowe, 2002). Consequently, the constant use and application of fresh cattle slurry containing VFAs could be evaluated, taking into account whether or not pathogenic animal and human bacteria survive.

cultivos, suelos y fitopatógenos. No obstante, la DRS podría ser particularmente útil en la zona sur de México, en donde la lluvia es abundante y los suelos son ácidos, ambos factores favorables para la DRS.

En el Cuadro 2, se ejemplifican algunos insumos utilizados para generar la DRS y el control de organismos. Ésta información, puede servir como base para evaluarse en suelos, donde cultivos son

For the last 10 years, investigation on RSD has focused on improving its efficiency, although in Mexico, it is yet to be evaluated in different crops, soils and phytopathogens. However, the RSD could be particularly useful in southern Mexico, where rainfalls are abundant and soils are acidic, both of which are favorable factors for RSD.

Table 2 shows examples of inputs used to generate RSD and the control of organisms. This

Cuadro 2. Insumos utilizados para inducir la DRS, para controlar organismos perjudiciales para cultivos agrícolas.
Table 2. Inputs used to induce RSD to control harmful organisms to agricultural crops.

Insumos	Cantidades	Organismos a controlar	Cultivo	Referencia
<i>Brassica oleracea</i> y <i>Lolium perenne</i> .	5 y 8 Mg/ton peso seco para <i>Brassica</i> y <i>Lolium</i> , respectivamente.	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i> , <i>V. dahliae</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	Ninguno (suelo)	Blok <i>et al.</i> 2000.
Paja de trigo	1-1.6 % (paja-suelo, p/p)	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> and <i>Ralstonia solanacearum</i>	Ninguno (suelo)	Momma <i>et al.</i> , 2006.
Melaza	13.9-27.7 m ³ ha ⁻¹	Nematodos	Tomate	Di Gioia <i>et al.</i> , 2016.
Melaza	8.2 Mg ha ⁻¹	<i>Macrophomina phaseolina</i> F. <i>oxysporum</i>	Fresa	Roskopf <i>et al.</i> , 2014
Pajas de trigo y arroz, etanol, orujo de uva, residuos de cebolla, pasta de mostaza.	~ 9 Mg ha ⁻¹ como carbono contenido, excepto el etanol, aplicado (1%).	<i>V. dahliae</i>	Ninguno (suelo)	
Etanol	2-0.5% (v/v), 50-200 L m ⁻²			
Paja de arroz	4.9 Mg ha ⁻¹	Bacterias, hongos, malezas y nematodos	Hortalizas (8)	Shennan <i>et al.</i> , 2014.
Etanol	8.9 kL ha ⁻¹		Frutas (4)	
<i>B. junacea</i>	4.9 Mg ha ⁻¹			
Césped	Hasta Mg ha ⁻¹			
Paja de arroz	4.4 Mg ha ⁻¹	<i>Pratylenchus penetrans</i> y <i>R. solani</i>	Manzano	Hewavitharana y Mazzola, 2016.
<i>B. junacea</i>	4.4 Mg ha ⁻¹			
Paja de arroz	2 kg m ⁻²			
Pasta de <i>B. junacea</i>	2 kg m ⁻²			
Orujo de uva	4 kg m ⁻²	<i>Phytophthora nicotianae</i>	Pimiento	Serrano-Pérez <i>et al.</i> , 2017.
Residuos de cebada fermentada	3.5 kg m ⁻²			

afectados negativamente por organismos. La Figura 6, muestra algunos aspectos de DRS en la alfalfa, nogal e higuera que actualmente están en evaluación.

CONCLUSIONES

La DRS tiene un enorme potencial de uso en México, debido a las grandes extensiones de cereales cultivados, a partir de los cuales se pueden obtener las fuentes de Carbono necesarias. Adicionalmente, el re-uso de plástico negro convencional y la posible adaptación a sistemas de riego sub-superficiales, pueden complementar esta tecnología; particularmente, la DRS es altamente rentable en cultivos de invernadero. La melaza es otra fuente de Carbono sumamente económica en algunas regiones de México, así como la disponibilidad de excretas de cerdos y ganado. De esta manera, la DRS tiene la ventaja de poder usar una gran diversidad de fuentes de Carbono en comparación con la biofumigación.

information could serve as a basis to be evaluated in soils, where organisms negatively affect crops. Figure 6 shows some aspects of RSD in alfalfa, chestnut and fig trees that are currently being evaluated.

CONCLUSIONS

RSD has an enormous potential for use in Mexico, due to the large extensions of cereal planted, from which necessary sources of carbon can be obtained. In addition, reusing regular black plastic and the possible adaptation of sub-surface irrigation may complement this technology; in particular, RSD is highly profitable in greenhouse crops. Molasses are another very cheap source of carbon in some areas of Mexico, along with the availability of pig and cattle slurry. In this way, RSD has the advantage of being able to use a large diversity of carbon sources in comparison with biofumigation.



Figura 6. Izquierda, plástico en parcela experimental cubriendo suelo después de aplicar melaza para inducir DRS, en donde posteriormente se estableció alfalfa. Centro, Melaza adicionada en suelo en microparcela en donde se sembraría nueces de nogal. Derecha, plástico cubriendo suelo donde se aplicó melaza, donde previamente murió una higuera atacada por *P. omnivora*.

Figure 6. Left, plastic in experimental field covering the soil after applying molasses to induce RSD, where alfalfa was later planted. Center, molasses added on soil in micro plot where chestnut trees were to be planted. Right, plastic covering soil on which molasses were added, and where a fig tree died previously by a *P. omnivora*.

AGRADECIMIENTOS

Al fondo SAGARPA-CONACYT, a través del proyecto clave 2011-13-175247, financiando parte de la información. Además, a Daniela Samaniego Castruita por revisar el manuscrito y su versión en inglés.

LITERATURA CITADA

- Abbasi, P. A., Lazarovits, G., & Jabaji-Hare, S. (2009). Detection of high concentrations of organic acids in fish emulsion and their role in pathogen or disease suppression. *Phytopathology*, 99(3), 274-281. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-3-0274>
- Alexander, M. (1961). Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, Inc. 472 p.
- Bailey, K. L., & Lazarovits, G. (2003). Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and tillage research*, 72(2), 169-180. [https://doi.org/10.1016/S0167-1987\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0167-1987(03)00086-2)
- Barnett, A. J. G., & Duncan, R. E. B. (1953). The volatile fatty acids present in fresh and in fermented marrow-stem kale. *Plant and Soil*, 4(4), 370-376. <https://doi.org/10.1007/BF01435506>
- Bejarano-González, F. (Editor). (2017). *Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México*. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A. C. 358 p. https://www.researchgate.net/profile/Omar_Arellano-Aguilar/publication/319515704_Los_Plaguicidas_Altamente_Peligrosos_en_Mexico/links/59b04922a6fdcc3f8889aca4/Los-Plaguicidas-Altamente-Peligrosos-en-Mexico.pdf (consulta, Octubre 2018).
- Blok, W. J., Lamers, J. G., Termorshuizen, A. J., & Bollen, G. J. (2000). Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology*, 90(3), 253-259. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2000.90.3.253>
- Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C., & Scala, F. (2007). Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *Journal of Plant Pathology*, 89(3), 311-324. <http://www.sipav.org/main/jpp/volumes/0307/030701.pdf>
- Butler, D. M., Kokalis-Burelle, N., Albano, J. P., McCollum, T. G., Muramoto, J., Shennan, C., & Roskopf, E. N. (2014). Anaerobic soil disinfestation (ASD) combined with soil solarization as a methyl bromide alternative: vegetable crop performance and soil nutrient dynamics. *Plant and soil*, 378(1-2), 365-381. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2030-z>
- Cochrane, V. W. (1958). *Physiology of fungi*. John Wiley & Sons Inc.; London. 524 p.
- Conn, K. L., Tenuta, M., & Lazarovits, G. (2005). Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology*, 95(1), 28-35. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0028>

ACKNOWLEDGEMENTS

To the SAGARPA-CONACYT fund, through the project code 2011-13-175247, financing part of the information. Also, to Daniela Samaniego Castruita for revising the manuscript and its version in English.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- De la Cruz, E., Bravo, V., & Ramírez, F. (2018). Manual plaguicida de Centroamérica. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas, Universidad Nacional. Costa Rica. <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/> (consulta, Octubre 2018).
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., & Kubicek, C. P. (2011). Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*, 9, 749-759. <https://doi.org/10.1038/nrmi.cro2637>
- Eljounaidi, K., Lee, S. K., & Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. *Biological Control*, 103, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.013>
- Estupiñán-Herrera, C., Samaniego-Gaxiola, J. A., Cueto-Wong, C., & Balagurusamy, N. (2010). Inducción del cambio temporal del pH en la solución de suelos inundados y adicionados con fructosa y ácido sulfúrico. Pp. 710-714. Memoria de la XXII Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED. Noviembre 10-12. Gómez Palacio, Durango, México. 1277 p. [http://faz.ujed.mx/files/Memoria\\_XXII\\_FAZ\\_UJED\\_2010.pdf](http://faz.ujed.mx/files/Memoria_XXII_FAZ_UJED_2010.pdf)
- Goepfert, J. M., & Hicks, R. (1969). Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 97(2), 956-958. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC249784/pdf/jbacter00392-0512.pdf>
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- He, Z. L., Roskopf, E. N., Lin, Y., Powell, C. A., Hu, C., Iriarte, F., & Kokalis-Burelle, N. (2012). U.S. Patent No. US 20120015809 A1. <https://patentimages.storage.googleapis.com/2c/6b/12/21ba1c21271ff4/US20120015809A1.pdf>
- Hewavitharana, S. S., & Mazzola, M. (2016). Carbon source-dependent effects of anaerobic soil disinfestation on soil microbiome and suppression of *Rhizoctonia solani* AG-5 and *Pratylenchus penetrans*. *Phytopathology*, 106(9), 1015-1028. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0329-R>

- Hewavitharana, S. S., Ruddell, D., & Mazzola, M. (2014). Carbon source-dependent antifungal and nematocidal volatiles derived during anaerobic soil disinfection. *European journal of plant pathology*, 140(1), 39-52. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0442-5>
- Hrapovic, L., & Rowe, R. K. (2002). Intrinsic degradation of volatile fatty acids in laboratory-compacted clayey soil. *Journal of contaminant hydrology*, 58(3-4), 221-242. [https://doi.org/10.1016/S0169-7722\(02\)00038-4](https://doi.org/10.1016/S0169-7722(02)00038-4)
- Huang, X., Liu, L., Wen, T., Zhu, R., Zhang, J., & Cai, Z. (2015). Illumina MiSeq investigations on the changes of microbial community in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* infected soil during and after reductive soil disinfection. *Microbiological research*, 181, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.08.004>
- Huang, X., Liu, L., Wen, T., Zhang, J., Wang, F., & Cai, Z. (2016). Changes in the soil microbial community after reductive soil disinfection and cucumber seedling cultivation. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(12), 5581-5593. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7362-6>
- Ioannou, N. S. R. W., Schneider, R. W., & Grogan, R. G. (1977). Effect of flooding on the soil gas composition and the production of microsclerotia by *Verticillium dahliae* in the field. *Phytopathology*, 67, 651-656. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Articles/Phyto67n05\\_651.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Articles/Phyto67n05_651.pdf)
- Katase, M., Kubo, C., Ushio, S., Ootsuka, E., Takeuchi, T., & Mizukubo, T. (2009). Nematicidal activity of volatile fatty acids generated from wheat bran in reductive soil disinfection. *Nematological Research*, 39(2), 53-62. <https://doi.org/10.3725/jjn.39.53>
- Kirchmann, H., & Lundvall, A. (1993). Relationship between N immobilization and volatile fatty acids in soil after application of pig and cattle slurry. *Biology and fertility of soils*, 15(3), 161-164. <https://doi.org/10.1007/BF00361605>
- Lazarovits, G., Conn, K. L., Abbasi, P. A., & Tenuta, M. (2005). Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soil-borne plant pathogens. *Acta Horticulturae*, 698, 215-224. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.698.29>
- Liu, L., Kong, J., Cui, H., Zhang, J., Wang, F., Cai, Z., & Huang, X. (2016). Relationships of decomposability and C/N ratio in different types of organic matter with suppression of *Fusarium oxysporum* and microbial communities during reductive soil disinfection. *Biological Control*, 101, 103-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.011>
- Liu, L., Chen, S., Zhao, J., Zhou, X., Wang, B., Li, Y., Zheng, G., Zhang, J., Cai, Z., & Huang, X. (2018). Watermelon planting is capable to restructure the soil microbiome that regulated by reductive soil disinfection. *Applied Soil Ecology*, 129, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.05.004>
- Lynch, J. M. (1977). Phytotoxicity of acetic acid produced in the anaerobic decomposition of wheat straw. *Journal of Applied Bacteriology*, 42(1), 81-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00672.x>
- Lynch, J. M., Gunn, K. B., & Panting, L. M. (1980). On the concentration of acetic acid in straw and soil. *Plant and soil*, 56(1), 93-98. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02197956>
- Meghvansi, M. K., & Varma, A. (Eds.). (2015). *Organic amendments and soil suppressiveness in plant disease management* (Vol. 46). Dordrecht: Springer, Switzerland. 531p.
- Menzies, J. D. (1962). Effect of anaerobic fermentation in soil on survival of sclerotia of *Verticillium dahliae* (Abst). *Phytopathology*, 52(8), 743. <http://www.apsnet.org/meetings/meetingarchives/Pages/default.aspx>
- Momma, N., Yamamoto, K., Simandi, P., & Shishido, M. (2006). Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfection (BSD). *Journal of General Plant Pathology*, 72(4), 247-252. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0274-z>
- Momma, N. (2008). Biological soil disinfection (BSD) of soilborne pathogens and its possible mechanisms. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 42(1), 7-12. <https://doi.org/10.6090/jarq.42.7>
- Momma, N., Momma, M., & Kobara, Y. (2010). Biological soil disinfection using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms. *Journal of general plant pathology*, 76(5), 336-344. <https://doi.org/10.1007/s10327-010-0252-3>
- Momma, N., Kobara, Y., & Momma, M. (2011). Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, potential agents to induce suppression of *Fusarium oxysporum* for biological soil disinfection. *Journal of General Plant Pathology*, 77(6), 331-335. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0336-8>
- Momma, N., Kobara, Y., Uematsu, S., Kita, N., & Shinmura, A. (2013). Development of biological soil disinfections in Japan. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(9), 3801-3809. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4826-9>
- Okazaki, H. (1985). Volatile (s) from glucose-amended flooded soil influencing survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 51(3), 264-271. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/51/3/51\\_3\\_264/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/51/3/51_3_264/_pdf/-char/ja)
- Okazaki, H., & Nose, K. (1986). Acetic acid and n-butyric acid as causal agents of fungicidal activity of glucose-amended flooded soil. *Japanese Journal of Phytopathology*, 52(3), 384-393. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/52/3/52\\_3\\_384/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjphytopath1918/52/3/52_3_384/_pdf)
- Ponnamperuma, F. N. (1972). The chemistry of submerged soils. In *Advances in agronomy* (Vol. 24, pp. 29-96). Academic Press. <https://pdfs.semanticscholar.org/ed7f/45fc78cfd694ed285e17590058c6c7aa2e62.pdf>
- Ríos-Castaño, P. (2017). Control de la podredumbre radical causada por *Phytophthora cinnamomi* en dehesas mediante biofumigación con *Brassica* spp. Tesis Doctoral. Córdoba España. Pp. 176. <http://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/15073/2017000001669.pdf?sequence=1>
- Roskopf, E. N., Burrell, N., Hong, J., Butler, D. M., Noling, J. W., He, Z., Booker, B., & Sances, F. (2014). Comparison of Anaerobic Soil Disinfection and Drip-Applied Organic Acids for Raised-Bed Specialty Crop Production in Florida. Proc. VIII<sup>th</sup> IS on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfection. *Acta Horticola*, 1044:221-228. Doi: 10.17660/ActaHortic.2014.1044.26
- Samaniego-Gaxiola, J. A. (1994). Viabilidad de los esclerocios de *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Dugg. en suelos inundados y complementados con glucosa. *Revista*

- Mexicana de Fitopatología*, 12(1), 125-133. <http://rmf.smf.org.mx/#>
- Samaniego-Gaxiola, J. A. (2008). Efecto del pH en la sobrevivencia de esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* Dugg Hennebert II expuestos a Tilt y *Trichoderma* sp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26, (1) 32-39. <http://www.redalyc.org/html/612/61226106/>
- Samaniego Gaxiola, J. A., Ordóñez-Meléndez, H. J., Pedroza Sandoval, A., & Cueto-Wong, C. (2010). Relationship between the drying of the sclerotia of *Phymatotrichopsis omnivora* and its survival. *Revista Mexicana de Micología*, 32(1), 49-58. <http://www.redalyc.org/pdf/883/88319899006.pdf>
- Samaniego-Gaxiola, J. A. (2013). Supervivencia de los esclerocios de *Phymatotrichopsis omnivora* en función del pH in vitro. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(3), 337-351. <http://www.redalyc.org/service/redalyc/downloadPdf/2631/263127575001/1>
- Samaniego-Gaxiola, J. A., & Balagurusamy, N. (2013). Survival of soil-borne fungus *Phymatotrichopsis omnivora* after exposure to volatile fatty acids. *Journal of general plant pathology*, 79(2), 105-109. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-013-0436-8>
- Samaniego-Gaxiola, J. A., & Pedroza-Sandoval, A. (2013). Usos potenciales de los ácidos grasos volátiles en suelo, agua y aire. *Terra Latinoamericana*, 31(2), 155-163. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pId=S0187-57792013000300155](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pId=S0187-57792013000300155)
- Samaniego-Gaxiola, J. A., Pedroza-Sandoval, A., Chew-Madaveitia, Y., & Gaytán-Mascorro A. (2018). Reductive disinfestation, desiccation and *Trichoderma harzianum* to control *Phymatotrichopsis omnivora* in pecan tree nursery. *Revista Mexicana de Fitopatología*, (sometido para publicación).
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Serrano-Pérez, P., Rosskopf, E., De Santiago, A., & del Carmen Rodríguez-Molina, M. (2017). Anaerobic soil disinfestation reduces survival and infectivity of *Phytophthora nicotianae* chlamydospores in pepper. *Scientia horticulturae*, 215, 38-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.003>
- Shennan C, Muramoto J, Lamers J, Mazzola M, Rosskopf EN, Kokalis-Burelle N, Momma N, Butler DM, and Kobara Y. (2014). Anaerobic soil disinfestation for soil borne disease control in strawberry and vegetable systems: Current knowledge and future directions. *Acta Hort.* 1044:165-175. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1044.20>
- Shinmura, A., Sakamoto, N., & Abe, H. (1999). Control of Fusarium root rot of Welsh onion by soil reduction. (Abstract in Japanese). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 65(3), 352-353. <https://ci.nii.ac.jp/els/contents110002733276.pdf?id=ART0003023797>
- Shrestha, U., Ownley, B. H., Rosskopf, E. N., Dee, M. E., & Butler, D. M. (2013). Optimization of amendment C: N ratio in anaerobic soil disinfestation for control of *Sclerotium rolfsii*. In *Proceedings of Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions*, San Diego, CA (pp. 14-1).
- Shrestha, U., Augé, R. M., & Butler, D. M. (2016). A Meta-Analysis of the Impact of Anaerobic Soil Disinfestation on Pest Suppression and Yield of Horticultural Crops. *Frontiers in plant science*, 7, article 1254, 1-20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01254>
- Siddiquee, S., Cheong, B. E., Taslima, K., Kausar, H., & Hasan, M. M. (2012). Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of chromatographic science*, 50(4), 358-367. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms012>
- Stanier, R. Y., Doudoroff, M., y Adelberg, E. A. (1977). *Microbiología*. Aguilar. España. 932 p.
- Stover, R. H. (1955). Flood-fallowing for eradication of *Fusarium oxysporum* f. *cubense*: III. Effect of oxygen on fungus survival. *Soil Science*, 80(5), 397-412. [https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1955/11000/FLOOD\\_FALLLOWING\\_FOR\\_ERADICATION\\_OF\\_Fusarium.7.aspx](https://journals.lww.com/soilsci/Citation/1955/11000/FLOOD_FALLLOWING_FOR_ERADICATION_OF_Fusarium.7.aspx)
- Tenuta, M., & Lazarovits, G. (2002). Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 92(3), 255-264. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.2002.92.3.255>
- Tenuta, M., Conn, K. L., & Lazarovits, G. (2002). Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 92(5), 548-552. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2002.92.5.548>
- Ueki, A., Takehara, T., Ishioka, G., Kaku, N., & Ueki, K. (2017). Degradation of the fungal cell wall by clostridial strains isolated from soil subjected to biological soil disinfestation and biocontrol of Fusarium wilt disease of spinach. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(22), 8267-8277. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8543-7>
- Ueki, A., Kaku, N., & Ueki, K. (2018). Role of anaerobic bacteria in biological soil disinfestation for elimination of soil-borne plant pathogens in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 102 (15), 6309-6318. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9119-x>
- van Agtmaal, M., van Os, G. J., Hol, W. G., Hundscheid, M. P., Runia, W. T., Hordijk, C. A., & de Boer, W. (2015). Legacy effects of anaerobic soil disinfestation on soil bacterial community composition and production of pathogen-suppressing volatiles. *Frontiers in microbiology*, 6, article 701, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00701>
- Yossen, V., Zumelzu, G., Gasoni, L., & Kobayashi, K. (2008). Effect of soil reductive sterilization on Fusarium wilt in greenhouse carnation in Córdoba, Argentina. *Australasian Plant Pathology*, 37(5), 520-522. <https://doi.org/10.1071/AP08039>