

Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales  
ETSIAM Universidad de Córdoba



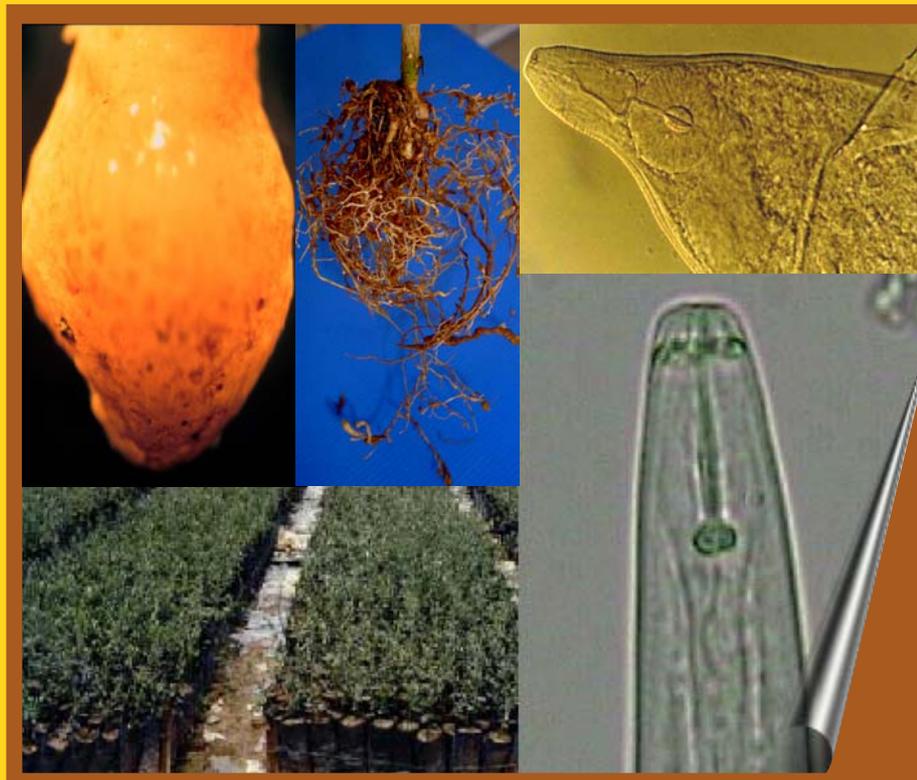
Instituto de Agricultura Sostenible CSIC

Programa de Doctorado "Protección de Cultivos"



TESIS DOCTORAL

# ***Incidencia y patogenicidad de nematodos fitopatógenos en plantones de olivo (*Olea europaea* L.) en viveros de Andalucía, y estrategias para su control***



DIRECTORES

Dr. Pablo Castillo Castillo

Prof. Dr. Rafael Jiménez Díaz

DOCTORANDO

Andrés Nico

Córdoba, febrero de 2002





Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales  
ETSIAM, Universidad de Córdoba  
Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), CSIC  
Programa de Doctorado "Protección de Cultivos"

**Incidencia y patogenicidad de nematodos fitopatógenos en  
plantones de olivo (*Olea europaea* L.) en viveros de Andalucía,  
y estrategias para su control**

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba,  
por el Ingeniero Agrónomo

Andrés I. Nico

VºBº:

Los directores de la tesis

Dr. Pablo Castillo Castillo  
Científico Titular  
IAS- CSIC

Prof. Rafael M. Jiménez Díaz  
Catedrático de Patología Vegetal  
Universidad de Córdoba

Córdoba, febrero de 2002



D. Pablo Castillo Castillo, Científico Titular del Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC y D. Rafael Jiménez Díaz, Catedrático de Patología Vegetal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Córdoba,

Codirectores de la Tesis Doctoral titulada **“Incidencia y patogenicidad de nematodos fitopatógenos en plantones de olivo (*Olea europaea* L.) en viveros de Andalucía y estrategias para su control”**, realizada por el Ingeniero Agrónomo Andrés I. Nico,

Certifican: Que la mencionada Tesis Doctoral ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios e instalaciones del Instituto de Agricultura Sostenible, y se encuentra finalizada para ser presentada y defendida públicamente en la Universidad de Córdoba.

Córdoba, 25 de febrero de 2002

Dr. Pablo Castillo Castillo  
Científico Titular  
IAS – CSIC

Prof. Rafael M. Jiménez Díaz  
Catedrático de Patología Vegetal  
Universidad de Córdoba



D. Luis López Bellido, Catedrático de Producción Vegetal y Director del Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Córdoba,

Informa: Que el Consejo de Departamento, en su reunión del 25 de febrero de 2002 ha acordado que la Tesis Doctoral presentada por D. Andrés I. Nico, con el título "**Incidencia y patogenicidad de nematodos fitopatógenos en plantones de olivo (*Olea europaea* L.) en viveros de Andalucía y estrategias para su control**" y realizada bajo la dirección de D. Pablo Castillo y D. Rafael Jiménez Díaz, reúne las características necesarias para su lectura y defensa.

Córdoba, 25 de febrero de 2002

Dr. Luis López Bellido  
Catedrático de Producción Vegetal





## **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

### **INSTITUTO DE AGRICULTURA SOSTENIBLE**

#### DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN DE CULTIVOS

El presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), Córdoba, gracias a la concesión al autor de una Beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) y su desarrollo ha sido financiado por los proyectos **CAO-99-010-C3-01 (*Mejora de la sanidad y de la calidad en la propagación viverística del olivo*)** y **1FD97-1322-CO4-02 [*Utilización de subproductos agrícolas comportados para el control de la Verticilosis (*Verticillium dahliae*) y nematodos noduladores (*Meloidogyne spp.*) en tomate y plantones de olivo*]**.

Córdoba, febrero de 2002



## **BIOGRAFÍA**

Andrés Nico nació el 29 de julio de 1965 en La Plata, República Argentina. Cursó sus estudios en esta ciudad y obtuvo en 1989 el título de Ingeniero Agrónomo. Desde la fecha de su graduación desarrolla en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata actividades profesionales referidas a la Protección de Cultivos.

En noviembre de 1997 obtuvo una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional para realizar estudios de Doctorado. Se incorporó al Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC (Córdoba) para desarrollar investigaciones en el Laboratorio de Nematología bajo la dirección del Dr. Pablo Castillo. Los resultados del trabajo desarrollado por él en este centro, referidos a la incidencia, la patogenicidad y el control de nematodos fitoparásitos en viveros de olivo, han sido presentados en publicaciones y reuniones científicas europeas en el área de la Fitopatología y conforman el contenido de la Tesis que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.



*A mis padres*



## **AGRADECIMIENTOS**

A las instituciones que permitieron la realización de mis estudios de Doctorado y la conclusión del presente trabajo; a los responsables de estas instituciones y a los miembros involucrados en este apoyo que se me brindó. Incluyo en este reconocimiento a la Agencia Española de Cooperación Internacional, el Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC, la Escuela Técnica Superior de ingenieros Agrónomos y la Comisión de Doctorado de la Universidad de Córdoba y la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

A los directores del presente trabajo. A Rafael agradezco en particular la confianza que depositó en mí al permitirme ser incluido en su equipo de trabajo, la provisión de muchas necesidades que se me presentaron en el trabajo y el celo que mostró en la corrección de los ejemplares provisionales. A Pablo debo agradecer muchísimas cosas. Le agradezco, en principio, haber confiado en mí para su proyecto y haber compartido conmigo generosamente toda su experiencia. Aprecio la preocupación que siempre mostró por mi bienestar personal y su presencia constante en los momentos de desánimo. Reconozco en lo profesional su inagotable capacidad de trabajo y la constante diligencia de que dispuso para resolver de forma práctica y eficiente todas las etapas de esta empresa.

A todas las personas que con su tiempo, su dedicación y la desinteresada contribución de sus conocimientos y recursos permitieron enriquecer este trabajo. A Juan Antonio, porque siempre tuvo tiempo para atender con la corrección y la calidad didáctica que lo distinguen todas las consultas que le presenté. A Hava y al personal de su laboratorio, por haber contribuido con sus medios y su experiencia a la comprensión y documentación con imágenes de los aspectos histopatológicos del presente trabajo. A Nico Vovlas y Antonio Gómez Barcina agradezco sus consejos, el talante amable y el constante interés por seguir los progresos de mi trabajo.

A Jorge, por muchísimas cosas. En primer lugar porque su trabajo fue fundamental e indispensable para que esta tesis se completara. Luego le agradezco, claro está, por su actitud amistosa y discreta, su permanente buen humor y porque en cuatro años de contacto permanente no le conocí un solo gesto desprovisto de cordialidad.

A los compañeros y amigos que hicieron agradables las horas transcurridas en el trabajo y las que se prolongaron fuera de él. A José Luis, por su corrección y por su preocupación por mi integración. A Lola Rodríguez, por su cortesía y su generosidad profesional. A Jesús y Antonio, por su amistad, la complicidad y el interés por el mutuo conocimiento. A Manolo, Elena Tejedor, Susana García, Julio y Lola Duro, por el aprecio que surgió al compartir las expectativas de nuestros trabajos y por el afectuoso trato de "hermano mayor" que me dispensaron. A Auxi y a Blanca, por su simpatía y su inyección de vitalidad. A Marta, a Enrique y a Pino, por el excelente recuerdo de los momentos compartidos en el trabajo y por la mejor sensación de una amistad que resiste a la distancia.

A Eduardo, Beth, Andrea, Susana Maya y Pedro, compañeros de Doctorado y compañeros de aventura trasatlántica, por la camaradería y la amistad.

Al personal del Instituto de Agricultura Sostenible, y en particular a José Manuel Priego, Juan Urbano y José María Rodero, tres personas que siempre me dispensaron un trato afectuoso y presentaron una disposición permanente para ayudarme en lo que les necesitara.

A aquellos con los que compartí vivienda en estos cuatro años y que fueron los pilares domésticos de esta empresa. A Marcos, por su delicada amistad y por ser tan buen compañero de ruta en nuestro descubrimiento de España. A David, por su actitud franca y abierta desde el comienzo, por querer y dejarse querer y por confirmar mis presunciones sobre la calidad humana de los gaditanos. A Angjelina, por su amistad y la presencia en los momentos de flaqueza. A Martín, por su amistad, su lealtad, su espíritu incombustible y por todas las manos y el apoyo moral que me dio en la complicada etapa final.

A Alejandro, Carmela, Mirta y Orlando, que asumieron con generosidad la sobrecarga laboral que les significó mi ausencia.

A Elena, por la actitud cariñosa con que apuntaló mi ánimo y disimuló las asperezas de mi carácter en las últimas instancias de este trabajo.

## RESUMEN

Los nematodos fitoparásitos están ampliamente distribuidos en suelos naturales y cultivados de todas las regiones del mundo, y cualquier cultivo puede sufrir un perjuicio importante cuando se presentan elevadas densidades de población en suelo y/o raíces. Las infecciones de plantones de olivo por nematodos fitoparásitos, fundamentalmente nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) y lesionadores de raíz (*Pratylenchus* spp.), se han asociado con reducciones del crecimiento y vigor de la planta en varios países de la Cuenca Mediterránea, si bien entre el complejo de enfermedades que afectan al olivo las causadas por nematodos han sido consideradas tradicionalmente como de aparición esporádica e importancia menor. Sin embargo, algunas de las condiciones agronómicas derivadas del desarrollo de la Nueva Olivicultura alertan sobre la posibilidad de que los nematodos puedan convertirse a medio plazo en un problema fitosanitario de impacto moderado sobre el olivar. La adopción masiva del método de multiplicación por estaquillas semileñosas en los olivares de nueva plantación puede, por otra parte, contribuir a la dispersión de las formas infectivas de muchas especies de nematodos fitoparásitos. Esta Tesis Doctoral pretende atender parcialmente estas inquietudes y se plantea con los siguientes objetivos: 1) determinar la incidencia y distribución de nematodos fitoparásitos en plantones de olivo de viveros de Andalucía; 2) determinar la patogenicidad de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) y lesionadores de raíz (*Pratylenchus* spp.) sobre los dos cultivares de mayor difusión en el olivar andaluz ('Picual' y 'Arbequina'); y 3) evaluar la eficacia de estrategias de control sostenibles para la desinfestación de sustratos de uso viverístico (incluyendo solarización, biofumigación y adición de enmiendas orgánicas) y la protección de los plantones mediante micorrizas arbusculares.

La incidencia y distribución de nematodos fitoparásitos en plantones de olivo de viveros de Andalucía se evaluó en diversas prospecciones en Córdoba, Sevilla y Jaén, las tres provincias más importantes en el sector viverístico del olivo. Se seleccionaron un total de 18 viveros en función de su importancia comercial, tipo de suelo utilizado en la fase de crianza y distribución geográfica. En cada uno de ellos se muestrearon de plantones representativos de la totalidad de cultivares y clases de edad presentes y los nematodos fitoparásitos presentes en sus raíces y rizosfera fueron extraídos e identificados a nivel específico. De las 37 especies de nematodos fitoparásitos identificadas en los viveros estudiados destacaron por su incidencia en suelo rizosférico, los ectoparásitos migratorios *Merlinius brevidens*, *Criconemella xenoplax*, *Tylenchorrhynchus clarus* y *Helycotylenchus pseudorobustus*; en tanto que los endoparásitos *Pratylenchus penetrans*, *Pratylenchus vulnus* y *Meloidogyne javanica* destacaron por su incidencia en la raíz. Asimismo, entre las especies presentes

resaltaron por su importancia fitopatológica y económica los nematodos noduladores de raíz *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* y *M. javanica*, y los nematodos lesionadores de raíz *Pratylenchus penetrans* y *P. vulnus*. Los resultados obtenidos indican que los plantones de olivo constituyen un medio idóneo para la propagación de nematodos fitoparásitos a nuevas áreas.

La aparición de una enfermedad requiere, en primera instancia, el establecimiento de una relación huésped-parásito compatible que permita al nematodo desarrollarse y reproducirse de forma considerable sobre el huésped. Con posterioridad al establecimiento de esta relación huésped-parásito compatible la ocurrencia de alteraciones en las funciones normales de la planta pueden dar lugar a perjuicio fisiológico en la planta. A fin de conocer hasta qué punto estos fenómenos podían tener lugar con las especies de mayor importancia halladas en la prospección, se evaluó la capacidad reproductiva y el efecto patogénico de las mismas fueron evaluados sobre plantones de 'Arbequina' y 'Picual' en condiciones controladas. La capacidad reproductiva se determinó mediante el índice de reproducción ( $Pf/Pi = \text{población final/población inicial}$ ), mientras que el efecto patogénico se evaluó utilizando diversos parámetros de crecimiento relativo de diferentes órganos del plantón. Los nematodos lesionadores de raíz *Pratylenchus thornei*, *Pratylenchus fallax* y *Zygotylenchus guevarai* no establecieron una relación compatible en plantones de olivo de los cvs. Picual y Arbequina, lo cual indica que el olivo es un huésped inapropiado para los mismos. Los ectoparásitos migratorios *C. xenoplax*, *H. pseudorobustus* y *H. vulgaris*, en cambio, presentaron tasas de reproducción situadas en un rango entre 1,05 y 2,18 lo cual demuestra que estas especies se multiplican sobre el olivo. La infección por los nematodos noduladores *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, y los nematodos lesionadores de raíz *P. penetrans* y *P. vulnus* provocó una reducción del crecimiento manifestada fundamentalmente en el diámetro caulinar, tanto sobre 'Picual' como sobre 'Arbequina'. Las cinco especies de nematodos evaluadas fueron patogénicas sobre los dos cultivares de olivo evaluados. Por tanto, la infección de material de plantación por estos nematodos, puede constituir un riesgo para el establecimiento de nuevas plantaciones de olivo.

Evitar el contacto directo entre planta y patógeno constituye la forma más apropiada de lucha contra las infecciones provocadas por nematodos. Por este motivo la utilización de plantones libres de inóculo, así como la elección de suelos no infestados o con baja densidad de inóculo, son las estrategias más recomendables para el establecimiento de olivares sanos. Tres prácticas sostenibles de desinfestación de sustratos de uso viverístico alternativas al empleo de nematicidas sintéticos fueron evaluadas en nuestro trabajo como métodos de control para ser aplicados en viveros de olivo y promover la producción de

plantones libres de inóculo. Estos métodos fueron: a) solarización, b) biofumigación, y c) adición de enmienda orgánica. Asimismo, se estudió el efecto protector de la micorrización contra infecciones por nematodos fitopatógenos.

Los tres métodos de desinfestación de sustratos mostraron ser eficientes, si bien en forma variable. La solarización efectuada durante 3 semanas sobre sustrato viverístico dispuesto en montículos de 80 cm de altura determinó una reducción de la viabilidad del inóculo de *M. incognita* superior al 95 %, independientemente de la localización y la fuente de inóculo utilizada (huevos libres o masas de huevos). Asimismo, la adición al sustrato viverístico de compost de corcho redujo significativamente las poblaciones de *M. incognita*. Dicha reducción fue inversamente proporcional a la concentración de la enmienda en el sustrato, y alcanzó porcentajes superiores al 95 % en proporciones elevadas de enmienda (75 %). Sin embargo, los parámetros de crecimiento de los plantones mantenidos en los sustratos enmendados con compost de corcho no se vieron incrementados significativamente a altas dosis de la enmienda, lo que sugiere que existen mecanismos de fitotoxicidad que anulan parcialmente los efectos positivos de la desinfestación.

La biofumigación de sustratos viverísticos mediante la adición de paja de sorgo triturada (2 %, 4 %, p/p) determinó una reducción significativa de la viabilidad del inóculo de *M. incognita* respecto de los controles sin biofumigar, independientemente del porcentaje de sorgo empleado y de la utilización de cobertura plástica del suelo tratado. Sin embargo, la reducción de viabilidad del inóculo alcanzada fue inferior a la que se obtuvo mediante la solarización del sustrato viverístico o la adición de compost de corcho y requirió períodos más prolongados de exposición al tratamiento, por lo que esta práctica resulta por sí sola un método insuficiente de desinfestación de sustratos de uso viverístico.

La micorrización de plantones de olivo cvs. Picual y Arbequina presentó efecto protector frente a la patogenésis causada por *M. incognita* y *P. vulnus*. Este efecto protector se manifestó en un crecimiento relativo significativamente superior en los plantones micorrizados pero inoculados con nematodos, respecto de los respectivos controles no micorrizados e inoculados con nematodos. Dicho efecto protector es dependiente de la composición del inóculo micorrízico, el cultivar de la planta huésped y la especie del nematodo fitoparásito. Entre las micorrizas estudiadas, aquella compuesta por un inóculo mixto de *Glomus intraradices* y *Glomus fasciculatum* mostró ser más la efectiva, ya que protegió a 'Picual' del efecto patogénico de *M. incognita* y *P. vulnus* y a 'Arbequina' del efecto patogénico de *M. incognita*. La reducción de la patogenicidad no estuvo relacionada con una reducción en la infección por el nematodo, lo que sugiere que el efecto protector se debe a algún mecanismo de incremento de la tolerancia al nematodo. La micorrización

aparece como una práctica apropiada para complementar las medidas de desinfestación que se recomiendan en viveros para los sustratos.

## SUMMARY

Plant parasitic nematodes occur widespread in natural and cultivated soils all over the world. Any crop can be severely damaged by plant parasitic nematodes when appropriated inoculum densities in soil or root are present. Infection of olive trees by plant parasitic nematodes, mainly root-knot species (*Meloidogyne* spp.) and root-lesion species (*Pratylenchus* spp.), have been associated with reduction in plant growth and vigour in many countries from the Mediterranean Basin, but diseases caused by plant parasitic nematodes have normally been regarded as sporadic and of minor importance. Nevertheless, some practices and conditions derived from modern olive crop production may facilitate that nematode parasitism become a relevant aspect for olive crops. Propagation by rooted soft-wood leafy cuttings, a widely adopted method for newly planted olive orchards, may also contribute to spread many plant-parasitic nematode species. This Doctoral Dissertation is addressed to attend some concerns of above according to the following objectives: 1) to determine the incidence and distribution of plant parasitic nematodes in nurseries producing olive stocks in Andalusia; 2) to determine pathogenicity of root-knot (*Meloidogyne* spp.) and root-lesion (*Pratylenchus* spp.) nematodes on 'Picual' and 'Arbequina', the most frequent olive cultivars used in Andalusia; and 3) to assess efficacy of sustainable nematode management strategies for desinfestation of substrates used in nursery production (including solarization, biofumigation and organic amendment) and protection of planting stocks (mycorrhization).

The incidence and distribution of plant parasitic nematodes in olive planting stocks was assessed by means of disease surveys carried out in 18 nurseries at Córdoba, Jaén and Sevilla provinces, which are the most important ones for olive production. The surveyed nurseries were selected according to its commercial importance, substrate used for production of olive plant stocks and geographical distribution. A sample representative of the whole diversity of plant and cultivars present in each nursery was taken. Plant parasitic nematodes were extracted from root and rizosphere soil and identified up to specific level. Thirty seven plant parasitic nematode species were found. The migratory ectoparasitic nematode species *Merlinius brevidens*, *Criconemella xenoplax*, *Tylenchorrhynchus clarus* y *Helycotylenchus pseudorobustus* were remarkable because of high incidence in soil samples, while endoparasitic plant nematode species *Pratylenchus penetrans*, *Pratylenchus vulnus* y *Meloidogyne javanica* were remarkable because of high incidence in root samples and economic importance. Results from this study indicated that nursery olive stocks may play a role in the dispersal for plant parasitic nematodes to newly established olive orchards.

A compatible host-parasite relationship that facilitates the complete development

and reproduction of the nematode is a first requirement for disease development in plants. Thereafter impairment of the normal physiological functions taking place after the establishment of the compatible host-parasite relationship determines plant damage. In our study, experiments were carried out to assess reproductive ability and pathogenicity of the main important nematode species found in the survey. Reproductive fitness was assessed by a reproduction index ( $P_f/P_i$  = final population/ initial population) and pathogenicity was determined by recording several growth parameters associated with nematode parasitism in different plant organs. Root-lesion nematodes species *Pratylenchus thornei*, *Pratylenchus fallax* y *Zygotylenchus guevarai* did not establish a compatible host-parasite relationship on 'Picual' and 'Arbequina' planting stocks suggesting that olive is not an appropriate host for these nematodes. On the other hand, *C. xenoplax*, *H. pseudorobustus* and *H. vulgaris*, reached a reproduction index of 1,05 to 2,18, thus demonstrating that populations of these species increase on olive. Infection by root-knot nematodes species *M. arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica* and root-lesion nematode species *P. penetrans* y *P. vulnus* determined a plant growth reduction mainly on shoot diameter of both 'Picual' and 'Arbequina' olives. All these five species were pathogenic to the two olive cultivars. Therefore, use of infected olive planting stocks may determine a serious risk for plant impairment in new orchards.

Preventing nematodes from getting in close contact with the plant is the most suitable method for controlling plant infections by these parasites. This leads to recommend use of nematode free planting stocks along with the selection of non-infested sites for the establishment of new olive orchards. In this work, we assessed efficacy of three methods for the sustainable management of nematodes by means of desinfestation of substrates used in olive nurseries: a) solarization, b) fumigation and c) organic amendment. Similarly, the establishment of arbuscular mycorrhizal fungi in plant roots was studied as a method for protecting planting stocks from infections by plant parasitic nematodes.

The three methods for substrate desinfestation were effective. Solarization of substrates in 80 cm high piles for 3 weeks resulted in 95 % reduction in the viability of root-knot nematode *M. incognita*, regardless of location of nematode inoculum within the pile as well of the type of inoculum, i.e., free eggs or egg masses. In a similar way, substrate amendment with dry cork waste compost significantly reduced *M. incognita* populations. The reduction in nematode population provided by the compost amendement was significantly correlated with amendment concentration and it was greater than 95 % with high doses (75 %). However, growth parameters in olive planting stocks grown on amended substrates did not increase with high concentrations of compost. This suggests that

phytotoxicity may interfere with the beneficial effects provided by substrate desinfestation.

Biofumigation of substrates used in nursery production by means of sorghum straw (2 % and 4 % w/w) as amendment determined a significant reduction of inoculum viability and infectivity of *Meloidogyne incognita*, irrespective of straw concentration and plastic tarping. Nevertheless, reduction in viability and infectivity provided by this method was lesser than the obtained with solarization or cork compost amendment, and required a longer time of exposure to putative biofumigants produced in the process. This method is therefore considered as not efficient enough for be used as a single component in a disease management strategy.

Inoculation of olive planting stocks with arbuscular mycorrhizal fungi protects 'Picual' and 'Arbequina' olives from pathogenesis caused by *M. incognita* and *P. vulnus*. This protection effect determined higher growth rates in infected mycorrhized plants compared with non mycorrhized infected controls. Extent of protection depended on mycorrhizal inoculum, olive cultivar and nematode species. Mycorrhization with an inoculum composed of *Glomus intraradices* and *Glomus fasciculatum*, was the most effective of the mycorrhizae treatments studied since it protected 'Picual' from pathogenesis by *M. incognita* y *P. vulnus* and 'Arbequina' from pathogenesis by *M. incognita*. Reduction in pathogenesis was not correlated with a decrease in infection by the nematode suggesting that protection may be due to improvement in plant tolerance to the nematode. Mycorrhization appears to be an effective method to supplement efficiency of substrate desinfestation for nematodes control in a rational management strategy for nursery production of nematode-free olive planting stocks.



# ÍNDICE GENERAL

<b>Capítulo I: Introducción y objetivos</b>	<b>1</b>
1.1. EL CULTIVO DEL OLIVO EN ESPAÑA Y EL MUNDO	1
1.2. EL OLIVAR TRADICIONAL Y LA NUEVA OLIVICULTURA	4
1.3. LAS ENFERMEDADES DEL OLIVO COMO FACTOR LIMITANTE DE LA PRODUCCIÓN	6
1.4. NEMATODOS FITOPARÁSITOS ASOCIADOS AL OLIVO	8
1.5. LOS NEMATODOS COMO FACTOR LIMITANTE EN LA OLIVICULTURA ESPAÑOLA: PANORAMA PRESENTE	9
<b>Capítulo II: Incidencia de nematodos fitoparásitos en viveros de olivo en Andalucía</b>	<b>17</b>
2.1. INTRODUCCIÓN	17
2.1.1. EL VIVERO DE OLIVO	18
2.1.1.1. Técnicas de multiplicación vegetativa en olivo	18
2.1.1.2. El sector viverista en España: su importancia dentro de la olivicultura moderna	20
2.1.2. ASPECTOS FITOSANITARIOS VINCULADOS A LA PROPAGACIÓN DE FRUTALES	24
2.1.2.1. La exclusión de nematodos y otros patógenos: su importancia en viveros de frutales	24
2.1.2.2. Prospecciones nematológicas en viveros de frutales a nivel regional: importancia y antecedentes	26
2.1.3. LA CERTIFICACIÓN SANITARIA EN VIVEROS	27
2.1.3.1. Algunos antecedentes en la aplicación de programas de certificación sanitaria	28
2.1.3.2. La certificación sanitaria del olivo y otros frutales en la UE, España y Andalucía	30
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.2.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	30
2.2.1.1. Selección y caracterización de los viveros	30
2.2.1.2. Recolección de las muestras	34
2.2.2. ANÁLISIS NEMATOLÓGICO DE LAS MUESTRAS	34
2.2.2.1. Extracción a partir de muestras de suelo y raíz	34
2.2.2.2. Identificación y recuento de los ejemplares	37
2.2.3. ESTUDIOS DE LAS ALTERACIONES HISTOLÓGICAS PROVOCADAS POR <i>MELOIDOGYNE</i> SPP. EN RAÍCES	39
2.3. RESULTADOS	40
2.3.1. SINTOMATOLOGÍA Y ALTERACIONES ANATÓMICAS E HISTOLÓGICAS	40

2.3.2 EVALUACIÓN GLOBAL DE LAS POBLACIONES DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS	43
2.3.2.1. Especies identificadas	43
2.3.2.2. Incidencia y abundancia de las diferentes especies en la muestra total	47
2.3.2.3. Análisis de la similitud entre los viveros estudiados	49
2.3.3. ANÁLISIS DISCRIMINADO POR PROVINCIAS	50
2.3.3.1. Provincia de Córdoba	50
2.3.3.2. Provincia de Sevilla	53
2.3.3.3. Provincia de Jaén	57
2.4. DISCUSIÓN	61
2.4.1 ASPECTOS ECOLÓGICOS	61
2.4.1.1. Hábitat y distribución de los nematodos encontrados	61
2.4.1.2. Distribución proporcional por taxones	62
2.4.1.3. Agrupación jerárquica por agregados de comunidades	63
2.4.2. NEMATODOS FITOPARÁSITOS PRESENTES EN LA PROSPECCIÓN Y SU RIESGO POTENCIAL EN OLIVO	63
2.4.2.1. Especies de hábito ectoparasítico	63
2.4.2.2. Especies de hábito endoparasítico migratorio	68
2.4.2.3. Especies de hábito endoparasítico sedentario	71
2.4.2.4. Nematodos fitopatógenos en olivo no detectados en la prospección	73
2.4.3. CONSIDERACIONES FINALES	75

## **Capítulo III: Patogenicidad de nematodos fitoparásitos en plántulas de olivo**

<b>Capítulo III: Patogenicidad de nematodos fitoparásitos en plántulas de olivo</b>	79
3.1. INTRODUCCIÓN	80
3.1.1. CONCEPTO DE PATOGENICIDAD EN NEMATOLOGÍA	80
3.1.2. COMPATIBILIDAD PLANTA HUÉSPED - NEMATODO FITOPARÁSITO Y CAPACIDAD REPRODUCTIVA	81
3.1.2.1. Concepto de capacidad reproductiva: significación biológica y su empleo en nematología en frutales	81
3.1.2.2. La compatibilidad planta-nematodo a través de las diferentes etapas del parasitismo y su vinculación con la capacidad reproductiva	82
3.1.3. MECANISMOS ASOCIADOS A LA REDUCCIÓN DE CRECIMIENTO EN PLANTAS PARASITADAS POR NEMATODOS	85
3.1.3.1. Aspectos generales	85
3.1.3.2. Bases citológicas asociadas a la reducción de crecimiento en plantas parasitadas por nematodos	86
3.1.3.3. Bases fisiológicas asociadas a la reducción de crecimiento en plantas parasitadas por nematodos	87
3.1.4. PATOGENICIDAD DE NEMATODOS SOBRE FRUTALES DE CLIMA TEMPLADO	90
3.1.4.1. Las pruebas de patogenicidad en especies frutales	90
3.1.4.2. Pruebas de patogenicidad de nematodos sobre olivo: Antecedentes	93
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	95
3.2.1. SELECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE POBLACIONES DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS	95
3.2.1.1. Aislamiento y multiplicación de <i>Meloidogyne</i> spp.	95

3.2.1.2. Identificación específica y racial de <i>Meloidogyne</i> spp. sobre huéspedes diferenciales	97
3.2.1.3. Aislamiento y multiplicación de nematodos lesionadores de raíz ( <i>Pratylenchus</i> spp. y <i>Zygotylenchus guevarai</i> )	98
3.2.1.4. Aislamiento y multiplicación de nematodos anillados ( <i>Criconemella xenoplax</i> )	99
3.2.1.5. Aislamiento y multiplicación de nematodos espirales ( <i>Helicotylenchus pseudorobustus</i> y <i>Helicotylenchus vulgaris</i> )	99
3.2.2. PRUEBAS DE CAPACIDAD REPRODUCTIVA	100
3.2.2.1. Inóculo utilizado	100
3.2.2.2. Material vegetal empleado y método de inoculación	101
3.2.2.3. Condiciones controladas de crecimiento de los plantones	101
3.2.2.4. Evaluación de la población nematológica final y análisis estadístico	102
3.2.3. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	102
3.2.3.1. Inóculo utilizado	102
3.2.3.2. Material vegetal empleado	105
3.2.3.3. Experimento de patogenicidad I	106
3.2.3.4. Experimento de patogenicidad II	106
3.2.3.5. Condiciones controladas de crecimiento de los plantones	107
3.2.3.6. Evaluación del efecto del parasitismo sobre el crecimiento de los plantones	107
3.2.3.7. Evaluación de la reproducción de las poblaciones de nematodos	108
3.2.3.8. Análisis estadístico	109
3.3. RESULTADOS	109
3.3.1. PRUEBA DE CAPACIDAD REPRODUCTIVA	109
3.3.1.1. Lesionadores de raíz y anillados	109
3.3.1.2. Nematodos espirales	110
3.3.2. PRUEBA DE PATOGENICIDAD: PRIMER EXPERIMENTO	111
3.3.2.1. Caracterización racial de <i>Meloidogyne</i> spp.	111
3.3.2.2. Sintomatología	111
3.3.2.3. Influencia de la infección por <i>Meloidogyne</i> spp. y <i>Pratylenchus</i> spp. sobre el crecimiento de plantones de olivo	112
3.3.2.3.1. Cultivar Arbequina	112
3.3.2.3.2. Cultivar Picual	114
3.3.2.4. Reproducción de nematodos noduladores y lesionadores de raíz en plantones de olivo inoculados	115
3.3.2.4.1. Cultivar Arbequina	115
3.3.2.4.2. Cultivar Picual	117
3.3.3. PRUEBA DE PATOGENICIDAD: SEGUNDO EXPERIMENTO	118
3.3.3.1. Sintomatología	118
3.3.3.2. Control de calidad del inóculo	121
3.3.3.3. Influencia de la infección por <i>Meloidogyne</i> spp. y <i>Pratylenchus</i> spp. sobre el crecimiento de plantones de olivo	121
3.3.3.3.1. Cultivar Arbequina	121
3.3.3.3.2. Cultivar Picual	123

3.3.3.4. Reproducción de nematodos noduladores y lesionadores de raíz en plantones de olivo inoculados	124
3.3.3.4.1. Cultivar Arbequina	124
3.3.3.4.2. Cultivar Picual	126
<b>3.4. DISCUSIÓN</b>	<b>127</b>
3.4.1. CAPACIDAD REPRODUCTIVA	127
3.4.2. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD: REPRODUCCIÓN DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO	130
3.4.2.1. Reproducción de <i>Meloidogyne</i> spp.	130
3.4.2.2. Reproducción de <i>Pratylenchus</i> spp.	131
3.4.3. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD: INFLUENCIA DE LA INFECCIÓN POR NEMATODOS NODULADORES Y LESIONADORES DE RAÍZ SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTONES DE OLIVO	133
3.4.3.1. Efectos del parasitismo sobre el aspecto de las plantas	133
3.4.3.2. Peso fresco de la parte aérea	134
3.4.3.3. Peso fresco de la raíz	137
3.4.3.4. Diámetros del tronco y el brote principal	138
3.4.3.5. Altura y número de nudos	139
3.4.4. CONSIDERACIONES FINALES	141

## **Capítulo IV: Medidas para el control sostenible de nematodos fitopatógenos en viveros de olivo**

	145
	145
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>145</b>
4.1.1. CONCEPTOS GENERALES	146
4.1.2. EXCLUSIÓN	148
4.1.3. PROTECCIÓN	151
4.1.4. SANEAMIENTO	152
4.1.4.1. Desinfestación	153
4.1.4.2. Desinfección	156
4.1.5. PRÁCTICAS SOSTENIBLES EVALUADAS PARA EL CONTROL DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS	157
4.1.5.1. Solarización	157
4.1.5.2. Micorrización	160
4.1.5.3. Aplicación de enmiendas orgánicas	161
4.1.5.4. Biofumigación	164
<b>4.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>165</b>
4.2.1. DESINFESTACIÓN DE SUSTRATOS DE USO VIVERÍSTICO MEDIANTE SOLARIZACIÓN	165
4.2.1.1. Preparación de las pilas o montículos de sustrato	165
4.2.1.2. Inóculo	166
4.2.1.3. Preparación de las bolsitas	166
4.2.1.4. Ubicación de las estaciones en los montículos-Registro de temperaturas	167
4.2.1.5. Evaluación de la viabilidad del inóculo	170
4.2.1.6. Análisis estadístico	171
4.2.2. EFECTO PROTECTOR DE LA MICORRIZACIÓN	171
4.2.2.1. Inóculo utilizado	172

4.2.2.2. Material vegetal empleado y método de inoculación	172
4.2.2.3. Condiciones de crecimiento de los plántones	175
4.2.2.4. Evaluación del crecimiento de las plantas y de las poblaciones de nematodos	175
4.2.3. EFECTO DE LA ENMIENDA DEL SUSTRATO CON COMPOST DE CORCHO SOBRE LA PATOGENICIDAD DE <i>M. INCOGNITA</i>	176
4.2.3.1. Inóculo utilizado	176
4.2.3.2. Material vegetal empleado y método de inoculación	176
4.2.3.3. Condiciones controladas de crecimiento de los plántones	177
4.2.3.4. Evaluación del crecimiento de las plantas y de la población de nematodos	177
4.2.3.5. Análisis estadístico	177
4.2.4. EFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN	178
4.2.4.1. Inóculo utilizado	178
4.2.4.2. Preparación de los sustratos	178
4.2.4.3. Preparación de las bolsas	178
4.2.4.4. Disposición de los tratamientos y parámetros evaluados	179
4.2.4.5. Análisis estadístico	179
4.3. RESULTADOS	180
4.3.1. EFECTO DE LA SOLARIZACIÓN: AÑO 1999	180
4.3.1.1. Variación diaria de las temperaturas	180
4.3.1.2. Evaluación de la viabilidad del inóculo	181
4.3.2. EFECTO DE LA SOLARIZACIÓN: AÑO 2000	186
4.3.2.1. Variación diaria de las temperaturas	186
4.3.2.2. Evaluación de la viabilidad del inóculo	188
4.3.3. EFECTO PROTECTOR DE LA MICORRIZACIÓN CONTRA LA PATOGENICIDAD DE NEMATODOS SOBRE EL OLIVO: PRIMER EXPERIMENTO	190
4.3.3.1. Influencia sobre los parámetros de crecimiento de la planta	190
4.3.3.1.1. Cultivar Arbequina	190
4.3.3.1.2. Cultivar Picual	194
4.3.3.2. Reproducción de los nematodos	197
4.3.3.2.1. Cultivar Arbequina	197
4.3.3.2.1. Cultivar Picual	198
4.3.4. EFECTO PROTECTOR DE LA MICORRIZACIÓN CONTRA LA PATOGENICIDAD DE NEMATODOS SOBRE EL OLIVO: SEGUNDO EXPERIMENTO	201
4.3.4.1. Influencia sobre los parámetros de crecimiento de la planta	201
4.3.4.2. Reproducción de los nematodos	202
4.3.5. EFECTO DE LA ENMIENDA DEL SUSTRATO CON COMPOST DE CORCHO SOBRE LA PATOGENICIDAD DE <i>M. INCOGNITA</i>	203
4.3.5.1. Efecto sobre los parámetros de crecimiento de la planta	203
4.3.5.2. Efecto sobre la reproducción del nematodo	205
4.3.6. EFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN	207
4.3.6.1. Evaluación de la supervivencia del inóculo	207
4.4. DISCUSIÓN	212
4.4.1. EXPERIMENTOS DE SOLARIZACIÓN	212
4.4.1.1. Temperatura del suelo	212
4.4.1.2. Efecto de los tratamientos sobre la viabilidad e infectividad del inóculo	214

4.4.2. EFECTO PROTECTOR DE LA MICORRIZACIÓN	218
4.4.2.1. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento de las plantas no inoculadas	218
4.4.2.2. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento de las plantas inoculadas	220
4.4.2.3. Efecto de la micorrización sobre la reproducción de los nematodos	223
4.4.3. EFECTO DE LA ENMIENDA DEL SUSTRATO CON COMPOST DE CORCHO SOBRE LA PATOGENICIDAD DE <i>M. INCOGNITA</i>	225
4.4.4. DESINFESTACIÓN DEL SUSTRATO POR BIOFUMIGACIÓN	228
4.4.5. CONSIDERACIONES FINALES	230
<b>Conclusiones</b>	235
<b>Bibliografía</b>	237

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Publicaciones científicas sobre parasitismo de nematodos en diferentes árboles frutales de clima templado o subtropical encontradas entre los años 1995 y 1999	10
<b>Tabla 2.1.</b> Viveros productores de plantas de olivo en 1998	23
<b>Tabla 2.2.</b> Distribución y características de viveros de plántones de olivo muestreados en la provincia de Córdoba	31
<b>Tabla 2.3.</b> Distribución y características de viveros de plántones de olivo muestreados en la provincia de Sevilla	32
<b>Tabla 2.4.</b> Distribución y características de viveros de plántones de olivo muestreados en la provincia de Jaén	32
<b>Tabla 2.5.</b> Origen y características analíticas de los sustratos empleados en los viveros estudiados	33
<b>Tabla 2.6.</b> Nematodos ectoparásitos migratorios aislados e identificados en la prospección de viveros de comerciales de olivo de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla	43
<b>Tabla 2.7.</b> Nematodos endoparásitos migratorios aislados e identificados en la prospección de viveros comerciales de olivo de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla	44
<b>Tabla 2.8.</b> Nematodos endoparásitos sedentarios aislados e identificados en la prospección de viveros de comerciales de olivo de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla	44
<b>Tabla 2.9.</b> Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plántones de olivo en viveros en Andalucía	48
<b>Tabla 2.10.</b> Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plántones de olivo en viveros de la provincia de Córdoba	50
<b>Tabla 2.11.</b> Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plántones de olivo en viveros muestreados en la provincia de Córdoba discriminados según los diferentes cultivares	51
<b>Tabla 2.12.</b> Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plántones de olivo en viveros de la provincia de Sevilla	54
<b>Tabla 2.13.</b> Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plántones de olivo en viveros muestreados en la provincia de Sevilla discriminados según los diferentes cultivares	55
<b>Tabla 2.14.</b> Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plántones de olivo en viveros de la provincia de Jaén	58
<b>Tabla 2.15.</b> Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plántones de olivo en viveros muestreados en la provincia de Jaén discriminados según los diferentes cultivares	59
<b>Tabla 3.1.</b> Capacidad reproductiva de nematodos lesionadores de raíz y nematodos anillados en cultivares de olivo (primera repetición)	110
<b>Tabla 3.2.</b> Capacidad reproductiva de nematodos lesionadores de raíz y nematodos anillados en cultivares de olivo (segunda repetición)	110
<b>Tabla 3.3.</b> Capacidad reproductiva de <i>Helicotylenchus</i> spp. en cultivares de olivo	111
<b>Tabla 3.4.</b> Influencia de la infección de raíces de olivo por nematodos noduladores y lesionadores de raíz sobre el crecimiento de plántones del cultivar Arbequina (primera repetición)	113

<b>Tabla 3.5.</b> Influencia de la infección de raíces de olivo por nematodos noduladores y lesionadores de raíz sobre el crecimiento de plántones del cultivar Picual (primera repetición)	113
<b>Tabla 3.6.</b> Reproducción de nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre plántones de olivo del cultivar Arbequina (primera repetición)	116
<b>Tabla 3.7.</b> Reproducción de nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre plántones de olivo del cultivar Picual (primera repetición)	118
<b>Tabla 3.8.</b> Influencia de la infección de raíces de olivo por nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre el crecimiento de plántones del cv. Arbequina (segunda repetición)	122
<b>Tabla 3.9.</b> Influencia de la infección de raíces de olivo por nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre el crecimiento de plántones del cv. Picual (segunda repetición)	124
<b>Tabla 3.10.</b> Reproducción de nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre plántones de olivo del cv. Arbequina (segunda repetición)	125
<b>Tabla 3.11.</b> Reproducción de nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre plántones de olivo del cultivar Picual (segunda repetición)	127
<b>Tabla 4.1.</b> Ubicación de las diferentes estaciones de control de la temperatura con sus códigos correspondientes	169
<b>Tabla 4.2.</b> Parámetros térmicos registrados en las estaciones correspondientes a los diferentes tratamientos en la prueba de solarización llevada a cabo en 1999	181
<b>Tabla 4.3.</b> Efecto del tiempo de exposición a la solarización sobre la eclosión de huevos de <i>M. incognita</i> . Experimento del año 1999	182
<b>Tabla 4.4.</b> Parámetros térmicos registrados en las estaciones correspondientes a los diferentes tratamientos en la prueba de solarización llevada a cabo en 2000	187
<b>Tabla 4.5.</b> Parámetros poblacionales de <i>M. incognita</i> obtenidos en el bioensayo efectuado con las muestras extraídas en la prueba de supervivencia del inóculo a la solarización (Año 2000)	188
<b>Tabla 4.6.</b> Influencia de la micorrización de plántones de olivo 'Arbequina' con <i>Glomus intraradices</i> (E), <i>G. mosseae</i> (M) o <i>G. intraradices</i> + <i>G. fasciculatum</i> (C) sobre las infecciones de raíces por <i>P. vulnus</i> y <i>M. incognita</i>	191
<b>Tabla 4.7.</b> Influencia de la micorrización de plántones de olivo 'Picual' con <i>Glomus intraradices</i> (E), <i>G. mosseae</i> (M) o <i>G. intraradices</i> + <i>G. fasciculatum</i> (C) sobre las infecciones de raíces por <i>P. vulnus</i> y <i>M. incognita</i>	195
<b>Tabla 4.8.</b> Reproducción de <i>P. vulnus</i> y <i>M. incognita</i> en plántones de olivo cv. Arbequina micorrizados con <i>Glomus intraradices</i> (E), <i>G. mosseae</i> (M) o <i>G. intraradices</i> + <i>G. fasciculatum</i> (C) y no micorrizados	198
<b>Tabla 4.9.</b> Reproducción de <i>P. vulnus</i> y <i>M. incognita</i> en plántones de olivo cv. Picual micorrizados con <i>Glomus intraradices</i> (E), <i>G. mosseae</i> (M) o <i>G. intraradices</i> + <i>G. fasciculatum</i> (C) y no micorrizados	199
<b>Tabla 4.10.</b> Influencia de la micorrización de plántones de olivo 'Picual' con <i>G. intraradices</i> + <i>G. fasciculatum</i> (C) sobre las infecciones de raíces por <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i>	201
<b>Tabla 4.11.</b> Reproducción de <i>M. incognita</i> y <i>M. javanica</i> en plántones de olivo cv. Picual micorrizados con <i>G. intraradices</i> + <i>G. fasciculatum</i> (C) y no micorrizados	202
<b>Tabla 4.12.</b> Influencia de las infecciones de raíces por <i>M. incognita</i> sobre el crecimiento de plántones de olivo 'Picual' cultivado en sustratos con diferentes concentraciones de compost de corcho	204

<b>Tabla 4.13.</b> Reproducción de <i>M. incognita</i> en plantones de olivo de 'Picual' que crecieron en sustratos enmendados con diferentes concentraciones de compost de corcho	206
<b>Tabla 4.14.</b> Influencia de la biofumigación con distintas dosis de enmienda de paja de sorgo sobre la infectividad de huevos y J <sub>2</sub> de <i>M. incognita</i> en tomate	209



## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig 1.1.</b> Superficie cultivada de olivo en España y Andalucía, respecto del total mundial	2
<b>Fig 1.2.</b> Regiones olivareras españolas	3
<b>Fig 1.3.</b> Representación esquemática del planteamiento general de la Tesis	15
<b>Fig 2.1.</b> Propagación del olivo	21
<b>Fig 2.2.</b> Preparación de la muestra de raíz para la extracción de nematodos mediante el método de centrifugación (Coolen, 1979) modificado para plantas leñosas	35
<b>Fig 2.3.</b> Extracción de nematodos en muestras de suelo o de raíces mediante centrifugación (Coolen, 1979)	36
<b>Fig 2.4.</b> Extracción de nematodos en muestras de suelo (Coolen, 1979)	37
<b>Fig 2.5.</b> Alteraciones anatómicas e histológicas provocadas por <i>Meloidogyne</i> spp. en plántulas de olivo de vivero	41
<b>Fig 2.6.</b> Nematodos fitoparásitos del olivo hallados en la prospección	45
<b>Fig 2.7.</b> Proporción de nematodos fitoparásitos encontrados en viveros de olivo en Andalucía pertenecientes a los tres grupos tróficos identificados (a) y familias a las que corresponden (b)	47
<b>Fig 2.8.</b> Agrupación de los viveros estudiados en función de la similitud (índice de similitud de Jaccard) de los nematodos fitoparásitos identificados en cada uno de ellos	49
<b>Fig 3.1.</b> Fases sucesivas en el ciclo de infección de un nematodo fitoparásito y su vinculación con la capacidad reproductiva	83
<b>Fig 3.2.</b> Metodología empleada en el estudio de la patogenicidad de nematodos fitoparásitos sobre el olivo	103
<b>Fig 3.3.</b> Reacción de las plantas en las pruebas de patogenicidad	119
<b>Fig 4.1.</b> Representación esquemática de las tres estrategias adoptables en el control de nematodos: exclusión, protección y saneamiento	147
<b>Fig 4.2.</b> Esquema de las diferentes etapas que tienen lugar en la multiplicación e implantación del olivo donde se muestran las posibles vías de ingreso de nematodos fitoparásitos al sistema y las alternativas que pueden adoptarse para el control de los mismos.	149
<b>Fig 4.3.</b> Experimento de solarización	168
<b>Fig 4.4.</b> Metodología empleada en el estudio del control de nematodos fitoparásitos en viveros de olivo	173
<b>Fig 4.5.</b> Evolución diaria de las temperaturas registradas en 1999 en el interior del montículo sin solarizar (izq.) y en el interior del montículo solarizado (der.)	181
<b>Fig 4.6.</b> Regresión lineal del porcentaje de eclosión de <i>M. incognita</i> determinado por la presencia de J2 en función del tiempo de exposición a los tratamientos de solarización (Año 1999): efecto de la posición en el montículo de bolsas con huevos libres (izq.) y con masas de huevos (der.).	183
<b>Fig 4.7.</b> Regresión lineal del porcentaje de eclosión de <i>M. incognita</i> determinado por la presencia de J2 en función del tiempo de exposición a los tratamientos de solarización (Año 1999): efecto de la profundidad en el montículo sobre viabilidad en huevos libres (izq.) y en masas de huevos (der.).	184

<b>Fig 4.8.</b> Regresión lineal del porcentaje de eclosión de <i>M. incognita</i> determinado por la presencia de J2 en función del tiempo de exposición a los tratamientos de solarización (Año 1999): efecto del tipo de inóculo sobre la viabilidad a 20 cm de profundidad (izq.) y a 40 cm de profundidad (der.).	185
<b>Fig 4.9.</b> Efecto del tratamiento (control vs. solarizado) y la profundidad (20 cm vs. 40 cm) sobre la supervivencia del inóculo de <i>M. incognita</i> en el interior de montículos de sustratos viverísticos sometidos a solarización	186
<b>Fig 4.10.</b> Evolución diaria de las temperaturas registradas en el año 2000 en el interior del montículo sin solarizar (izq.) y en el interior del montículo solarizado (der.)	187
<b>Fig 4.11.</b> Efecto de la profundidad de enterrado de <i>M. incognita</i> en montículos no solarizados sobre su infectividad en tomate indicada por la población del nematodo alcanzada en el bioensayo (Año 2000): Regresión lineal sobre el tiempo de la población final relativa (der.)	189
<b>Fig 4.12.</b> Efecto de la solarización y la profundidad de enterrado (20 cm vs. 40 cm) de huevos de <i>M. incognita</i> en el interior de montículos de sustratos viverísticos sobre su infectividad en plantas de tomate indicada por la población final de nematodos alcanzada	190
<b>Fig 4.13.</b> Relación entre la población final de <i>M. incognita</i> en plántones de olivo del cultivar Picual y la concentración de compost de corcho en el sustrato donde éstas crecieron	207
<b>Fig 4.14.</b> Regresión lineal de la población final absoluta y relativa de <i>M. incognita</i> en plantas de tomate sometidas a diferentes tiempos de exposición al tratamientos de biofumigación (considerando la totalidad de los tratamientos): efecto del empleo de cobertura plástica sobre la población final absoluta (izq.) y sobre la población final relativa (der.)	210





# Capítulo I: Introducción y objetivos

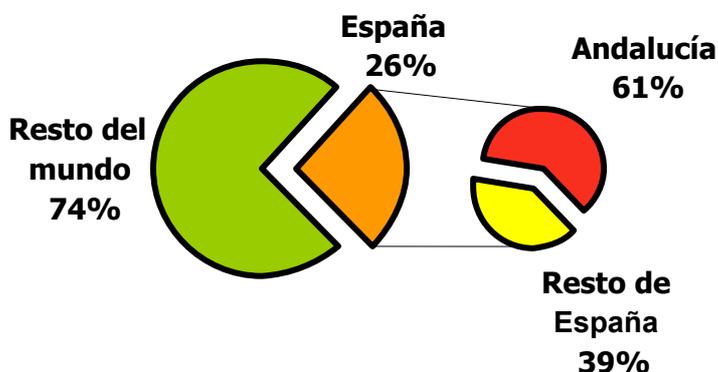
---

## 1.1. EL CULTIVO DEL OLIVO EN ESPAÑA Y EL MUNDO

El olivo, *Olea europaea* L. subsp. *europaea*, es un árbol perennifolio, longevo, de medianas dimensiones, cuyo hábitat preferente son áreas de clima mediterráneo. La zona de origen del olivo se ubica en la región que va desde el sur del Cáucaso hasta las altiplanicies de Irán, Palestina y el área costera de Siria, es decir en coincidencia completa y parcial con los centros 5 y 4 de la clasificación de Vavilov, respectivamente. El fruto del olivo, la aceituna, adecuadamente elaborado resulta comestible como tal -la aceituna de mesa- y del mismo se extrae un zumo -el aceite de oliva-, muy valorado por sus propiedades nutritivas y culinarias. Tanto la aceituna de mesa como el aceite de oliva ocuparon un lugar preponderante en la dieta de las grandes civilizaciones que habitaron el Viejo Mundo occidental durante la edad antigua. Por esta razón, la domesticación del olivo a partir de las formas silvestres tuvo lugar en épocas muy remotas, y el área de dispersión se expandió tempranamente desde el centro de origen hacia todas las áreas circundantes del Mediterráneo, incluidas las zonas de Cercano Oriente, Asia Menor, Grecia, Egipto, noreste de África y las penínsulas itálica e ibérica. Esto ha determinado la existencia de múltiples ecotipos, adaptados a la diversidad de ambientes y situaciones culturales con las que ha coexistido como planta cultivada. La península ibérica, y en particular el territorio que coincide con la actual Andalucía, desarrolló una agricultura donde el olivo ocupó un lugar de privilegio. La provincia Bética fue la proveedora casi exclusiva del aceite de oliva que se consumía en el Imperio Romano (Angles, 1999). Asimismo, con el descubrimiento de América el olivo se extendió por todo este continente, dando lugar también a la selección de las poblaciones mejor adaptadas al nuevo ambiente y a la aparición de un número importante de formas culturales propias. Más recientemente, el cultivo del olivo también se ha extendido hacia otras regiones como Australia, China, Japón y Sudáfrica (Civantos, 1998).

En la actualidad se estima que existen en el mundo unos 820 millones de olivos que ocupan en total unas 8.200.000 has (COI, 1995). Los países de la Cuenca Mediterránea presentan una clara hegemonía en el panorama mundial del olivar. En ellos se concentra aproximadamente el 96 % de los olivos y el 97% de la superficie sembrada. España ocupa el primer lugar en el mundo entre los países oleícolas, tanto por el número de árboles como por la superficie cultivada. Un esquema de la participación de los olivares español y andaluz, dentro del concierto internacional, queda reflejado en la Fig. 1.1. En la clasificación de países con mayor número de olivos destacan en orden decreciente España, Italia, Turquía,

Túnez, Grecia, Portugal, Siria y Marruecos; y fuera de la Cuenca Mediterránea China, Argentina y Estados Unidos.



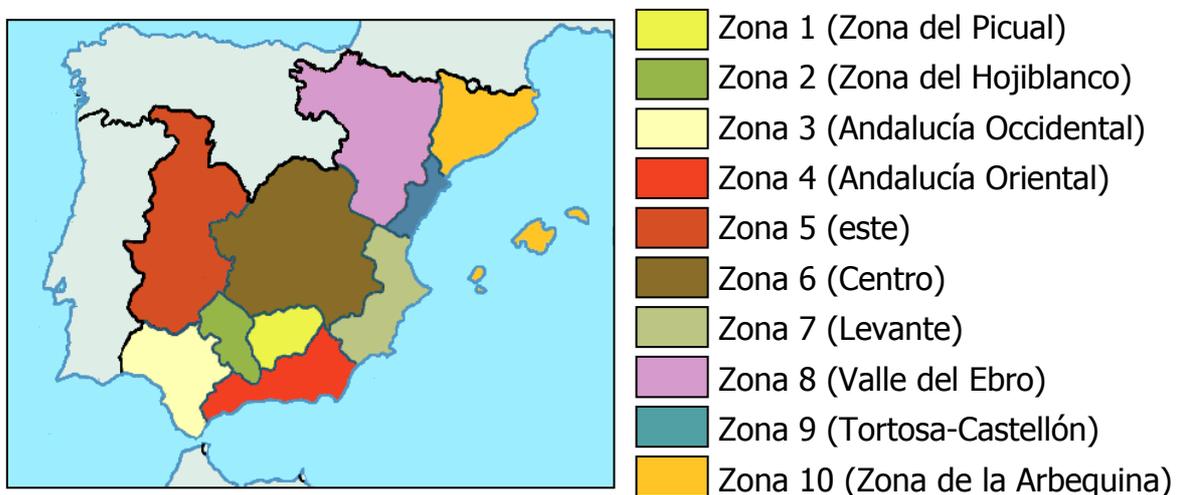
**Fig. 1.1.** Superficie cultivada de olivo en España y Andalucía, respecto del total mundial.

Según datos del Consejo Oleícola Internacional, la producción mundial de aceite de oliva para la campaña 1999/2000 fue de aproximadamente 20.100.000 t. La Unión Europea (UE) domina ampliamente la lista de países productores de aceite de oliva con 15.600.000 Tm., siendo España, Italia, Grecia, Portugal y Francia los mayores productores en orden decreciente. Asimismo, la UE es el primer consumidor, exportador e importador mundial con un 75, 46 y 40 % del total, respectivamente. Fuera de la UE destacan otros países de la Cuenca Mediterránea (Marruecos, Siria, Turquía y Túnez). Argentina y Estados Unidos son los mayores productores de aceite de oliva fuera del área mediterránea (COI, 1995).

El 10 % de la producción del olivo se consume de forma directa, como aceituna de mesa. La producción mundial de este producto es de alrededor de 1 millón de toneladas (COI, 1995). Tal como ocurre con el aceite de oliva, la UE destaca como productor en este segmento con casi el 50 % de la producción mundial. De España procede un 25 % de la producción mundial. Como países productores siguen a España, ordenados según el volumen de producción, Estados Unidos, Turquía, Italia, Marruecos, Grecia, Siria, Egipto, Argentina y Portugal.

Las estadísticas del comercio mundial de aceite de oliva y aceituna de mesa muestran claramente el liderazgo que ejerce España en el sector del olivar. Éste, por su parte, ocupa además un lugar privilegiado dentro del balance final de la agricultura española. En la producción final agraria del año 2000, el aceite de oliva ocupó el tercer lugar en importancia detrás del grupo formado por hortalizas, frutas y flores, situado en primer lugar, y de los cereales, que ocuparon el segundo (Ministerio de Agricultura, 2000).

De acuerdo con las características productivas, el área olivarera española puede considerarse dividida en 10 regiones (Ministerio de Agricultura, 1972; Fig. 1.2), de las cuales cuatro se encuentran en Andalucía. La primera región, o zona del 'Picual' en la que predomina la variedad del mismo nombre, abarca toda la provincia de Jaén y las comarcas de Bujalance (Córdoba) e Iznalloz (Granada), ocupa 600.000 has, y es la más importante en superficie cultivada. La producción de esta región se destina casi exclusivamente a la producción de un aceite de oliva que destaca por su gran estabilidad. La segunda región, o zona de la 'Hojiblanca', comprende casi toda la provincia de Córdoba con excepción de las comarcas de Bujalance y La Carlota, la comarca de Estepa (Sevilla), la de Loja (Granada) y la de Antequera (Málaga). Esta región es la segunda en España en superficie cultivada de olivo y las variedades dominantes en la misma son Picual, Hojiblanca y Picudo. La producción de la misma también se destina casi exclusivamente a la producción de aceite de oliva. La tercera región (Andalucía Occidental) abarca por completo las provincias de Cádiz y Huelva, la totalidad de la provincia de Sevilla con excepción de la comarca de Estepa, y la comarca de La Carlota en Córdoba. Ésta es la primera región española en producción de aceituna de mesa y predominan las variedades Manzanilla y Gordal Sevillana. Por último, la cuarta región (Andalucía Oriental) comprende toda la provincia de Almería y la casi totalidad de las provincias de Granada (excepto Iznalloz) y Málaga (excepto Antequera) Es la de menor importancia en Andalucía y ocupa 100.000 has de olivar.



**Fig. 1.2.** Regiones olivareras españolas.

En conjunto las regiones olivareras andaluzas comprenden más del 60 % de la superficie total del olivar español, el 80 % de la producción nacional de aceite de oliva y el 75 % de la producción de aceituna de mesa. Por tanto, Andalucía es claramente la Comunidad Autónoma con mayor identidad olivarera dentro de España y tanto la superficie cultivada como la producción se encuentran actualmente en plena expansión. Asimismo,

Andalucía destaca dentro del panorama oleícola nacional e internacional, no sólo por su participación en la producción, sino también por el grado de desarrollo de sectores que atienden aspectos subsidiarios a la misma, como son la generación de tecnología y la provisión de insumos y servicios.

## **1.2. EL OLIVAR TRADICIONAL Y LA NUEVA OLIVICULTURA**

El olivar, junto con el viñedo, constituyen los agroecosistemas más arraigados en el paisaje español, y representan los dos grandes sistemas de producción frutal de secano en el país (Rallo, 1998a). El olivo ha sido durante siglos el proveedor por antonomasia de grasas vegetales a la dieta de los pueblos de la Cuenca Mediterránea. En este contexto se dieron circunstancias propicias para que el olivar español se desarrollara de forma sostenida a fin de satisfacer en todas las épocas las demandas de su propio mercado y otros próximos. El desarrollo tuvo lugar adecuándose a las circunstancias ecológicas y socioeconómicas del país, de tal forma que a lo largo de su historia el llamado "olivar tradicional" adquirió varios rasgos que definieron su identidad. La existencia de un mercado que durante siglos aseguraba el consumo sostenido e incluso creciente de un producto al cual no se le exigían transformaciones cualitativas, contribuyó a la persistencia de una olivicultura muy similar a la practicada desde la antigüedad. Algunos de los caracteres estructurales más notables que sirven para describir al olivar tradicional español (Rallo, 1998a) son:

a) **Perennidad:** el carácter longevo del olivo, en consonancia con la existencia de una demanda sostenida del producto, determinó que los olivares se programaran previendo plantaciones permanentes y especializadas. Esto explica el carácter extensivo y la existencia de marcos amplios que permitían la persistencia productiva de las plantaciones durante largo tiempo.

b) **Marginalidad:** el aumento creciente de la demanda condujo progresivamente al laboreo de suelos marginales. Ésto ha llevado a la existencia de un olivar extensivo de baja productividad y con frecuencia situado en zonas donde la agricultura es incompatible con la preservación del suelo.

c) **Disponibilidad de mano de obra abundante y barata:** el requerimiento estacional de mano de obra numerosa, en particular durante la recolección, se vio tradicionalmente satisfecho en las regiones olivareras españolas por la presencia de una

amplia dotación laboral. De esta manera la adopción de sistemas mecanizados para la cosecha y otras labores, no ha constituido una demanda importante durante mucho tiempo.

d) **Tecnología de base empírica:** la planificación de los olivares y la adopción de las diferentes prácticas culturales, obedeció tradicionalmente a comprobaciones particulares de los agricultores transmitidas por canales no formales e incorporadas a un acervo colectivo.

Las rígidas estructuras que caracterizaron al olivar tradicional fueron suficientes para garantizar su viabilidad durante la mayor parte de su existencia. A partir de los años 50, gran parte de los cambios que han tenido lugar en la sociedad española se han vuelto críticos para el mismo y han amenazado con poner en peligro su continuidad. En este sentido, Rallo (1998a) menciona la competencia con otros aceites vegetales, el progresivo encarecimiento de la mano de obra, el aumento de la renta de la población y la incorporación a la UE. Esta situación llegó a su momento más grave durante el segundo lustro de la década de los 60 y el comienzo de la década de los 70, cuando el sector olivarero español sufrió una profunda crisis que determinó una importante caída de la superficie cultivada y la producción (Civantos, 1998).

En respuesta a esta situación se establecieron acciones tendentes a configurar un sistema de cultivo capaz de aumentar la productividad y reducir los costes de cultivo (Rallo, 1998b). El conjunto de estrategias que surgió a partir de esta iniciativa se denominó "Nueva Olivicultura". Muchas de las innovaciones promovidas desde el sector público se encuentran hoy disponibles para los olivicultores, si bien el grado de aceptación que ha tenido cada una de ellas es muy diverso. Los cambios que pueden atribuirse a la "Nueva Olivicultura" y que han tenido mayor efecto sobre el desarrollo del sector son los siguientes: a) la expansión del área bajo regadío, b) el establecimiento de plantaciones con mayor densidad y árboles de un pie adaptados a la recolección mecánica, c) el desarrollo de una industria viverística adaptada a la obtención de plantas de un tronco y entrada precoz en producción y d) la adopción de prácticas de producción, recolección y post-cosecha tendentes a mejorar la calidad del aceite de oliva.

Como consecuencia de este cambio tecnológico y del establecimiento de una coyuntura económica más favorable, la crisis que atravesaba el olivar español pudo revertirse a partir de la segunda década de los años 80. Desde 1988 hasta la actualidad, se han incrementado anualmente sin interrupción tanto la superficie cultivada como la producción de aceite de oliva y aceituna de mesa, aunque ambos productos están sometidos

a fuertes oscilaciones anuales. Sin embargo, dentro de la olivicultura y el sector oleícola español persisten graves deficiencias estructurales. Las características que han determinado el perfil tradicional del olivar español y que fueron mencionadas anteriormente siguen vigentes hasta la fecha en la mayor parte del sector y están condicionando en gran parte su sostenibilidad. La viabilidad económica de la mayoría de las explotaciones parece depender de forma indispensable de la persistencia del sistema de ayudas comunitarias a la producción. Por tanto, en la actualidad se mantienen vigentes los mismos condicionantes que estimularon a los pioneros de la Nueva Olivicultura (aumento de la productividad y descenso en los costes de producción), y la búsqueda sigue orientándose hacia la resolución de aquellos factores que limitan o condicionan la productividad del olivar.

Entre los factores que limitan la productividad del olivar español, destacan, en orden decreciente, la disponibilidad de agua, la erosión del suelo y las heladas invernales (Rallo, 1998a). Asimismo, las enfermedades del olivo, sin llegar a ser limitantes, también son factores que condicionan la productividad.

### **1.3. LAS ENFERMEDADES DEL OLIVO COMO FACTOR LIMITANTE DE LA PRODUCCIÓN**

El olivar tradicional constituye un agroecosistema estable, caracterizado por escasa alteración antrópica, marcada adaptación del material vegetal a las condiciones de su ambiente y una amplia diversidad genética intraespecífica a escala regional. Estas condiciones han determinado que exista un equilibrio sutil entre el olivo y sus patógenos y que las pérdidas considerables sólo se produzcan cuando se rompe ese equilibrio (Trapero y Blanco, 1998).

La valoración del impacto económico de las enfermedades del olivo es insuficiente e imprecisa. De Andrés (1991) asignó una pérdida media global del 12 % en España para el período 1969-74. A estas pérdidas hay que sumarle el coste económico y medioambiental de los tratamientos químicos rutinarios empleados en el control de aquellas enfermedades que se manifiestan endémicamente. Trapero y Blanco (1998) señalan que muchas de las condiciones propias de la Nueva Olivicultura intensiva, como son una mayor uniformidad varietal y un sistema más forzado de cultivo, pueden acarrear como consecuencia indeseable la alteración del equilibrio establecido entre el olivo y sus patógenos y conducir a un aumento en la magnitud de tales pérdidas.

El Repilo o "Vivillo", causado por *Spilocaea oleagina* (Castagne) Hughes, ha sido

considerado tradicionalmente como la enfermedad más importante del olivar español y es la micosis del olivo más extendida en el mundo (Wilson y Ogawa, 1978). La enfermedad puede originar una severa defoliación del árbol que, en algunos casos, alcanza al 60-70 % del follaje (Ramos Clavero, 1969). La disminución de la actividad fotosintética da lugar al debilitamiento del árbol y merma de su productividad. A esto pueden sumarse las pérdidas directas ocasionadas por la caída de frutos, cuando se producen infecciones del pedúnculo. En California, durante años de epidemia, se verificaron pérdidas del 20 % de la producción y en España se estimaron reducciones en el rendimiento ligeramente superiores al 6 % durante el período 1969-74 (De Andrés, 1991). A pesar de la presencia endémica del patógeno, en la actualidad el Repilo no se considera una limitación severa para el olivo en ninguna región olivarera española, posiblemente debido a la eficiencia de las aplicaciones foliares de fungicidas protectores para su control. En cualquier caso, la incidencia que el control de esta enfermedad tiene sobre los costes de producción hace que siga siendo considerada como la más importante del olivo. Las investigaciones que se desarrollan en la actualidad tienden a mejorar el conocimiento de la epidemiología y establecer estrategias de control más baratas y menos agresivas para el ambiente (Trapero y Blanco, 1998).

La Verticilosis del olivo, causada por *Verticillium dahliae* Kleb., fue diagnosticada por primera vez en Italia (Ruggieri, 1946) y desde entonces ha sido descrita en múltiples países del área mediterránea y América (Al-Ahmad y Moslin, 1993; Thanassoulopoulos *et al.*, 1979; Serrhini y Zeroual, 1995). La primera cita de verticilosis del olivo en España fue realizada por Caballero *et al.* (1980). Posteriormente, prospecciones realizadas en Andalucía en 122 olivares menores de 15 años indicaron que la enfermedad ocurre en las principales provincias olivareras y afecta al 38,5 % de los olivares inspeccionados, con incidencias medias variables entre el 10 y el 90 % de árboles afectados (Blanco-López *et al.*, 1984). Observaciones recientes sugieren una expansión creciente de la enfermedad entre olivares de nueva plantación y se ha comprobado que a ella responde el 27 % de los casos de muerte de olivos de entre 4 y 10 años englobados bajo la denominación general de "Seca de olivos jóvenes" (Sánchez Hernández *et al.*, 1996). El control de la Verticilosis resulta particularmente difícil debido a tres razones fundamentales: a) la supervivencia prolongada del hongo en el suelo mediante microesclerocios, b) la inaccesibilidad al mismo una vez que coloniza el xilema, y c) la amplia gama de cultivos susceptibles. Si bien el Repilo presenta en España una importancia económica mayor aún que la Verticilosis, la dificultad de su control ha hecho que esta enfermedad represente una mayor preocupación entre olivicultores y fitopatólogos.

La Tuberculosis, causada por la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

(Smith) Young *et al.* y también conocida como verrugas, tumores o agallas del olivo es una enfermedad muy difundida en todas las áreas olivareras. A pesar de la extensa distribución de la Tuberculosis, no existen estimaciones precisas de las pérdidas que ocasiona. De Andrés (1991) estima que esta enfermedad reduce la producción en España alrededor del 1,3 %. El perjuicio económico no ocurre exclusivamente debido a la disminución de los rendimientos, sino también a alteraciones organolépticas en el fruto que disminuyen la calidad del aceite (Tjamos *et al.*, 1993). Sin embargo, en condiciones normales la Tuberculosis no constituye un factor limitante en el olivar español, debido fundamentalmente a las medidas preventivas que repercuten en un control satisfactorio de la enfermedad.

La enfermedad conocida con el nombre de Aceitunas jabonosas, causada por *Colletotrichum gloesporioides* (Penzig) Saccardo, está presente en numerosos países olivareros de la Cuenca Mediterránea, Asia y América, y también se le conoce como Antracnosis, Lepra, Vivillo o Momificado. Esta enfermedad afecta fundamentalmente las aceitunas y tiene efecto sobre el rendimiento pero afecta sobre todo a la calidad del aceite, que disminuye notablemente. En ciertas regiones, como el sur de Portugal y algunas áreas de Italia, donde las condiciones ambientales resultan particularmente propicias para su desarrollo, esta enfermedad ha sido considerada como la más importante del olivo. En las regiones olivareras más húmedas de España es donde la enfermedad encuentra su máxima expresión y las pérdidas pueden llegar hasta el 40 % de la cosecha potencial (Trapero y Blanco, 1998). En España los tratamientos preventivos con fungicidas protectores antes de las lluvias otoñales proporcionan un buen control de la misma.

Además de las enfermedades mencionadas anteriormente, existe en España un complejo de otras enfermedades parasitarias menores que atacan igualmente al olivo. En este sentido podemos mencionar el Escudete de la aceituna (*Camarosporium dalmaticum* (Thum) Zachos & Tzavella-Klonan, el Emplomado (*Mycocentrospora cladiosporioides* (Sacc) P. Costa ex Deighton), Podredumbres radicales (*Armillaria* spp., *Phytophthora* spp.), podredumbres en post-cosecha (*Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., etc.) y parasitismo por fanerógamas (*Viscum* spp., *Cuscuta* spp., etc.). La incidencia de todas estas enfermedades es baja o sin importancia práctica general. Sólo ocasionalmente pueden presentarse ataques severos (Trapero y Blanco, 1998).

#### **1.4. NEMATODOS FITOPARÁSITOS ASOCIADOS AL OLIVO**

Los nematodos fitoparásitos están ampliamente distribuidos en suelos naturales y

cultivados de todas las regiones del mundo, y cualquier planta cultivada puede sufrir un perjuicio importante cuando se presentan elevadas densidades de población en suelo y/o raíces (Webster, 1987). Se han citado una gran cantidad de especies de nematodos fitoparásitos asociados a árboles frutales, aunque las de mayor significación fitopatológica son los nematodos noduladores y lesionadores de raíz (*Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., respectivamente). Algunas especies de estos géneros juegan un papel fundamental en los problemas de replantación de frutales como cerezo, manzano, melocotonero, peral, etc. (Mai y Abawi, 1978, Mai *et al.*, 1994).

Dadas la amplia gama de huéspedes y la escasa especialización que caracterizan a los principales nematodos asociados a plantas leñosas de climas templados, es razonable anticipar que el olivo no escape al parasitismo causado por estos agentes. Lamberti y Vovlas (1993) en una revisión de las citas de nematodos fitoparásitos asociados a raíces y/o rizosfera del olivo recogen hasta 70 especies diferentes. Los datos disponibles en España en relación con las infecciones de olivo por nematodos corresponden a prospecciones ocasionales. La única prospección sistemática fue llevada a cabo sobre olivares adultos en la provincia de Jaén (Peña Santiago, 1990), y en la misma destacan por su importancia económica las infestaciones por *Pratylenchus* spp.. En varios países de la Cuenca Mediterránea, las infecciones de plantones de olivo por nematodos fitoparásitos han sido asociadas a reducciones del crecimiento y vigor de la planta (Lamberti y Baines, 1969a, 1969b; Hashim, 1982; Abrantes y Santos, 1991; Sassanelli *et al.*, 1997). Por último, cabe mencionar que en ciertos países olivareros emergentes, como Argentina, Chile y Perú, donde el cultivo del olivo frecuentemente se asocia a la presencia de suelos de textura gruesa en superficie, poblaciones de nematodos no caracterizadas con precisión originan perjuicios graves en la implantación, obligando a la reposición de marras o determinando serios retrasos en la entrada en plena producción (Condorí Tintaya, 1987, Costilla, *com. pers.*).

## **1.5. LOS NEMATODOS COMO FACTOR LIMITANTE EN LA OLIVICULTURA ESPAÑOLA: PANORAMA PRESENTE**

El complejo de enfermedades que causa el parasitismo de nematodos fitoparásitos en el olivo no suele ser considerado como un problema sanitario de relevancia. Para ilustrar esta circunstancia basta decir que la gran mayoría de los tratados generales sobre el cultivo del olivo ni siquiera mencionan a los nematodos fitoparásitos en los capítulos relacionados con la sanidad del cultivo. Cabe mencionar del mismo modo la falta de consideración de

este tema en la mayoría de los foros de formación académica y de divulgación científica sobre la sanidad del olivar. También están ausentes estos agentes fitoparásitos en los planes sanitarios elaborados para el Olivar por la Administración y con frecuencia ocupan un sitio muy postergado entre las prioridades establecidas a la hora de fomentar líneas de investigación y desarrollo científico.

Del mismo modo, el estudio del parasitismo de los nematodos sobre el olivo, constituye un aspecto muy poco considerado entre los nematólogos. Muchos tratados generales de Nematología Agrícola que abordan sistemáticamente la descripción del impacto de nematodos fitoparásitos sobre los cultivos de mayor importancia, apenas mencionan o simplemente excluyen el apartado dedicado al olivo de los capítulos relativos a la fruticultura. La producción de artículos científicos vinculados al parasitismo de nematodos sobre el olivo es, a la vez, sumamente escasa. Para ilustrar esta situación basta comparar el número de artículos científicos vinculados a diferentes especies de frutales que han aparecido entre los años 1995 y 1999 (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Publicaciones científicas sobre parasitismo de nematodos en diferentes árboles frutales de clima templado o subtropical encontradas entre los años 1995 y 1999

Año	Número de citas por género <sup>a</sup>					
	<i>Citrus</i> spp.	<i>Malus</i> spp.	<i>Olea</i> spp.	<i>Prunus</i> spp.	<i>Pyrus</i> spp.	<i>Vitis</i> spp.
1999	14	4	2	25	-	12
1998	11	2	3	13	-	9
1997	22	4	2	9	1	11
1996	9	8	1	31	3	11
1995	13	6	1	18	-	21
Total	<b>69</b>	<b>24</b>	<b>9</b>	<b>96</b>	<b>4</b>	<b>64</b>

<sup>a</sup> Fuente *Nematological Abstracts*, CAB International, Wallingford, UK.

Muchas son las causas que contribuyen a explicar el poco interés que ha despertado la problemática de los nematodos fitoparásitos en el olivo. A continuación se enuncian algunos de estos posibles motivos:

✓ Durante mucho tiempo, y hasta un pasado reciente, el olivo tuvo un tratamiento de cultivo semi-extensivo, escasamente tecnificado y con un bajo nivel de capitalización. Esto contribuyó a que muchos problemas fitosanitarios de incidencia relativamente baja pudieran pasar desapercibidos al verse enmascarados por mermas recurrentes que obedecían a carencias estructurales.

✓ Una gran parte del olivar español ocupaba, y sigue ocupando hoy, suelos relativamente marginales para el cultivo de especies anuales. En aquellos casos donde el olivar tradicional implantado en la primera mitad del siglo XX ocupó suelos agrícolas, el uso anterior más habitual de la tierra había sido el monocultivo de trigo. De esta forma, ya fuera porque el cultivo se establecía sobre terreno virgen o en suelo donde las especies fitoparásitas potenciales no habían tenido oportunidad de reproducirse, la posibilidad de que el olivo se implantara sobre terrenos con niveles poblacionales significativos de estos patógenos era mínima.

✓ La forma tradicional de propagación del olivo hasta fines de la década de los años '70 fue el empleo de estacas leñosas plantadas directamente en el suelo, sin previo enraizamiento en contenedores con sustrato. Como ninguna de las especies de nematodos fitoparásitos se encuentra presente, en ningún momento del ciclo vital, en órganos aéreos del olivo, la posibilidad de introducir el agente en las nuevas plantaciones a través del material de propagación era, en términos prácticos, nula.

✓ Los suelos predominantes en las regiones olivareras tradicionales presentan, en general, texturas superficiales relativamente finas. Las características particulares del clima mediterráneo determinan, por otra parte, que en las condiciones de secano propias del cultivo tradicional, las temperaturas altas o relativamente altas coincidan con bajos niveles de humedad en el suelo. Esta conjunción de condiciones ambientales resulta poco favorable para la reproducción de los nematodos fitoparásitos del olivo (Norton, 1989).

✓ Los síntomas propios del parasitismo de los nematodos, en general, son inespecíficos y esto ha llevado a que se les conozca con la denominación informal de "enemigos ocultos". El perjuicio que provocan a menudo se confunde con el cuadro propio de otras enfermedades de origen fisiogénico o parasitario y su origen suele, por tanto, pasar desapercibido a los ojos del observador poco experimentado.

Sin embargo, las recientes modificaciones tecnológicas introducidas en el sector del olivar durante los últimos 20 años han originado importantes transformaciones, que determinan situaciones nuevas que hacen que pueden no mantener vigentes muchas de las condiciones que se acaban de enumerar:

✓ La baja productividad del olivar ha constituido una de las mayores amenazas a la sostenibilidad del olivar tradicional (Rallo, 1998a). Ésto ha determinado la necesidad de adoptar tecnologías capaces de superar el efecto de los factores que impedían la expresión

de los rendimientos óptimos potenciales. De esta forma, a medida que la tecnología va superando las limitaciones que inciden sobre la producción, factores restrictivos que con anterioridad habían sido soslayados pueden pasar a constituirse en fundamentales. Tal puede ser el caso de ciertas patologías consideradas actualmente como ocasionales, entre las que se encuadran las causadas por los nematodos fitoparásitos.

✓ La evolución favorable de los precios del aceite desde la incorporación de España a la UE (Rallo, 1998b) ha determinado la expansión del área de olivar. Debido a este fenómeno, el cultivo del olivo volvió a resultar una alternativa competitiva frente a los cultivos herbáceos anuales, dentro de las áreas tradicionales. Así se llegó al estableciendo de muchas plantaciones en suelos con dilatados antecedentes en el cultivo de especies que potencialmente podrían haber incrementado las poblaciones de nematodos fitoparásitos.

✓ Entre las innovaciones tecnológicas adoptadas con la "Nueva Olivicultura", figura el empleo de plántulas a un solo pie obtenidos por el enraizamiento de estaquillas semileñosas. De esta forma, el material de propagación empleado casi con exclusividad en las nuevas plantaciones contiene tanto los órganos subterráneos de la planta como el sustrato que los acompaña, que pueden constituirse en vehículo de formas infectivas de muchas especies de nematodos fitoparásitos. Esta situación se agrava al considerar que la súbita expansión del área implantada determinó que en muchas ocasiones no pudieran adoptarse las medidas sanitarias apropiadas para la producción del material de propagación.

✓ El incremento del área implantada con olivar determinó la expansión de sus fronteras. De esta manera se han incorporado regiones con características edafológicas y climáticas diferentes a las propias del olivar tradicional. En estas nuevas áreas olivareras se incluyen zonas con suelos de textura superficial gruesa y clima con amplitudes térmicas moderadas, como por ejemplo las áreas del litoral de la provincia de Huelva. Condiciones ambientales como las descritas anteriormente pueden resultar muy favorables para la reproducción de algunas especies de nematodos fitoparásitos de marcada importancia económica y parásitos potenciales del olivo (Norton, 1989).

✓ Otra de las innovaciones tecnológicas que incorporadas al olivar intensivo es la dotación complementaria de agua mediante sistemas presurizados, principalmente el riego por goteo. El mantenimiento permanente de altos contenidos de humedad en el suelo determina condiciones favorables para la reproducción de algunas especies de nematodos fitoparásitos de gran potencial patogénico (Perry y Wright, 1998). Por este motivo, es previsible que en este tipo de explotaciones comiencen a ser cada vez más frecuentes casos graves de parasitismo por nematodos.

✓ La poca consideración que tradicionalmente se ha dispensado a la problemática ha determinado que existan pocas opciones efectivas para el control de nemátodos fitoparásitos en el olivo, una vez que estos se han establecido en la plantación. Para ilustrar esta situación, basta mencionar que ningún nematicida específico figura entre los productos fitosanitarios aprobados en España para su uso en el olivar implantado. Tampoco existe ningún cultivar, entre los difundidos y adaptados a las condiciones del olivar español, del que se conozca con certeza su condición de resistente a las principales especies de nematodos fitoparásitos que lo atacan.

Por toda esta serie de razones, los nematodos fitoparásitos tienen el potencial de constituir un problema sanitario relevante dentro del panorama oleícola español. Asimismo, la expansión del sector viverista español hacia mercados olivareros del Norte de África y América Latina alerta, por otra parte, a prevenir la aparición de restricciones al comercio debidas a problemas fitosanitarios. Además, recientemente se ha acrecentado la preocupación sobre una probable interacción sinérgica entre diferentes nematodos fitoparásitos y *V. dahliae*, que ha sido demostrada ya en otros cultivos, como fresa (McKinley y Talboys, 1979) y patata (Wheeler y Riedel, 1994). Aunque esta circunstancia no ha podido comprobarse hasta el momento en el olivo, el incremento y difusión de la Verticilosis del olivo, ha reforzado el interés de muchos fitopatólogos hacia los mecanismos de interacción entre *V. dahliae* y otros habitantes de la rizosfera de la planta (Lamberti *et al.*, 2001).

Las circunstancias expuestas anteriormente han suscitado el interés en algunos ámbitos científicos de España y, en particular de Andalucía, por investigar la problemática de los nematodos fitoparásitos en el cultivo del olivo. Con ésto se pretende anticipar respuestas a un problema que se aprecia como de fuerte repercusión en un futuro a medio plazo, ante los cambios tecnológicos que está imponiendo la Nueva Olivicultura. En este sentido, desde el año 1997 el laboratorio de Fitonematología del Instituto de Agricultura Sostenible viene desarrollando diversas líneas de investigación dirigidas a determinar la incidencia de los nematodos fitoparásitos entre los viveros de olivo de Andalucía, demostrar su patogenicidad y desarrollar un método sostenible de producción de plantones libres de nematodos fitopatógenos. Estas investigaciones se desarrollan bajo el auspicio y financiación de diversas entidades públicas como el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), la Comisión Interministerial de Ciencia y Técnica (CICYT) y el convenio bilateral hispano-italiano entre el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y el Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR).

El trabajo de Tesis Doctoral que a continuación se presenta reúne gran parte de la información recogida en este contexto, y los objetivos que se han abordado son los siguientes:

1. **Determinar la incidencia y distribución de nematodos fitoparásitos y/o fitopatógenos asociados al sistema radical y rizosfera de plantones de olivo en viveros de Andalucía.**
2. **Determinar la capacidad parasítica y/o patogénica de poblaciones de nematodos noduladores (*Meloidogyne spp.*) y lesionadores de raíz (*Pratylenchus spp.*) sobre plantones de olivo.**
3. **Evaluar la eficacia de distintas técnicas y tratamientos que posibiliten la desinfestación del suelo de uso viverístico mediante métodos físicos (solarización) y biológicos (biofumigación).**
4. **Determinar el efecto protector de la aplicación de microorganismos beneficiosos que estimulan el crecimiento vegetal frente a infecciones por nematodos noduladores (*Meloidogyne spp.*) y lesionadores de raíz (*Pratylenchus spp.*) sobre plantones de olivo.**

Los objetivos particulares se detallan en cada uno de los capítulos respectivos. El planteamiento de la tesis, el orden cronológico de cada una de sus etapas sucesivas y la correspondencia de las mismas con cada uno de los capítulos puede verse en el esquema general que se detalla en la Fig. 1.3.

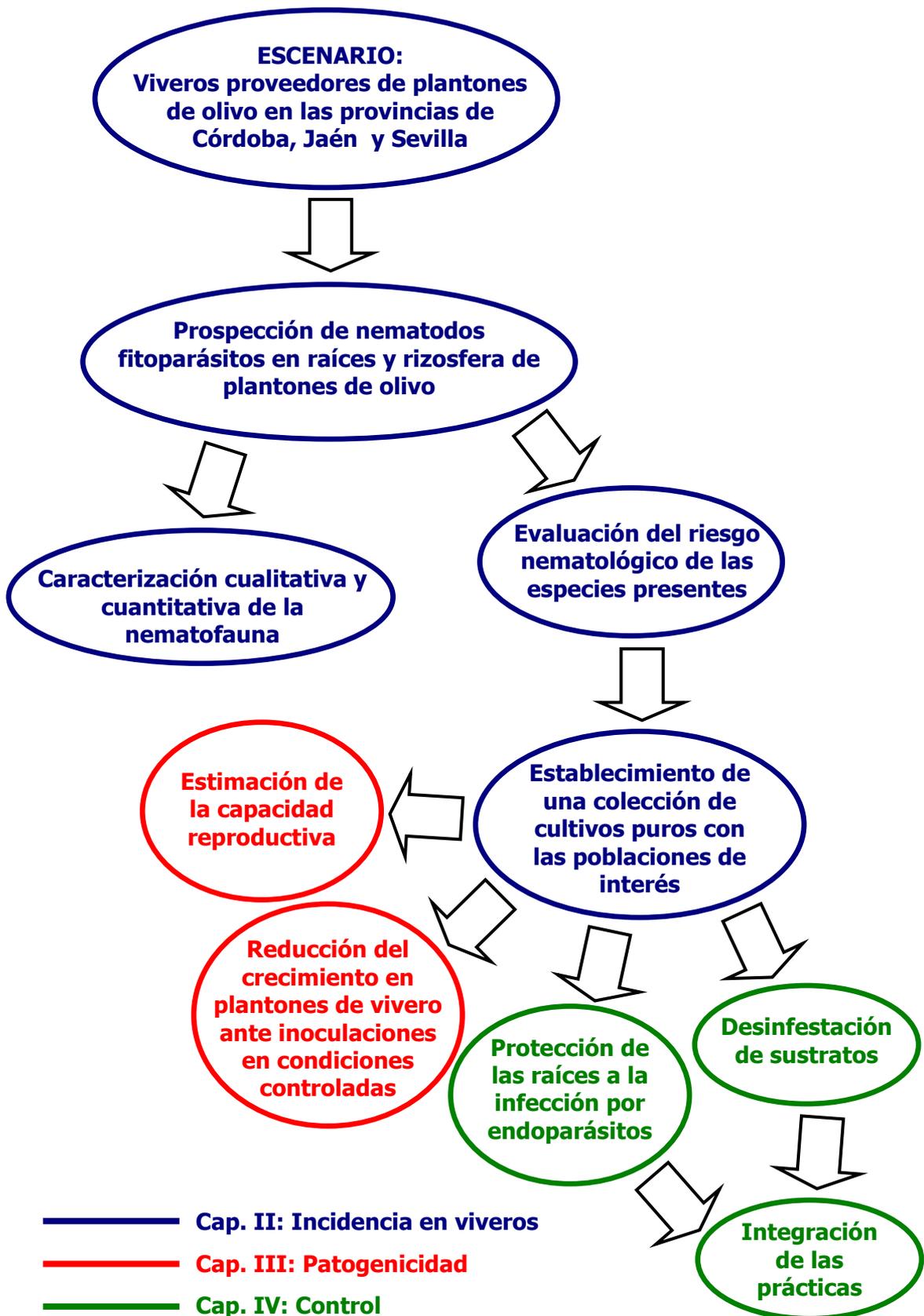


Fig. 1.3. Representación esquemática del planteamiento general de la Tesis



# Capítulo II: Incidencia de nematodos fitoparásitos en viveros de olivo en Andalucía

---

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El diseño de normas reguladoras fitosanitarias con proyección regional o nacional requiere como condición previa el conocimiento de las plagas y los patógenos presentes en el escenario que se desea proteger. Las labores de recolección sistemática de esta información constituyen la función denominada como "vigilancia", que es competencia del sector público a través de los órganos nacionales de protección fitosanitaria. Éstos pueden servir para tales fines de prospecciones específicas o de la recopilación de información a partir de diversas fuentes, incluidas las universidades y otras instituciones de investigación, en el proceso que se denomina "vigilancia general" (FAO, 1997). En árboles frutales se asume que el material empleado en la propagación presenta una gran capacidad de diseminación de patógenos y por este motivo resulta fundamental conocer las especies de organismos fitopatógenos que acompañan a los plantones a la salida del vivero. No existe constancia de la realización de una prospección sistemática destinada a caracterizar cualitativa y cuantitativamente las poblaciones de nematodos fitoparásitos asociadas con plantones de viveros de olivo. Los argumentos expuestos en la Introducción General alientan a superar esa deficiencia en el ámbito de Andalucía, la región olivarera española por excelencia. Por ello, con objeto de atender esa demanda y contribuir a los objetivos de la vigilancia general en el ámbito particular de los nematodos que parasitan el olivo, el presente capítulo se plantea el siguiente objetivo:

1. **Determinar la incidencia y distribución de nematodos fitoparásitos asociados al sistema radical y rizosfera de plantones de olivo en viveros de Andalucía.**

Teniendo en cuenta que el objetivo planteado pretende contribuir, a medio plazo, al diseño de una norma fitosanitaria para la producción de plantones de olivo, es conveniente abordar determinados aspectos relacionados con la obtención del material de propagación y la posible certificación del mismo.

## **2.1.1. EL VIVERO DE OLIVO**

### **2.1.1.1. Técnicas de multiplicación vegetativa en olivo**

La gran facilidad con que el olivo genera raíces adventicias en propágulos de diverso tamaño y edad, sumada a los problemas que provoca la segregación propia de la reproducción sexual, ha hecho que la multiplicación vegetativa haya sido adoptada ampliamente en esta especie (Caballero y del Río, 1998).

El enraizamiento de grandes propágulos ha sido el método de multiplicación vegetativa empleado tradicionalmente. En la práctica fue el sistema casi exclusivo de propagación hasta la segunda mitad de la década de los años 80, momento en que varios viveros comerciales adoptaron la técnica del enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización. El injerto, otro método tradicional de multiplicación vegetativa, sólo tiene difusión en regiones con amplia tradición viverística, como la Toscana o el Levante español (Caballero y del Río, 1998). En particular, algunas veces se aplica en otras regiones para resolver problemas específicos, tal como el recambio varietal en olivares adultos donde se pretende implantar variedades de difícil enraizamiento (i.e., 'Gordal Sevillana').

Los grandes propágulos empleados en la multiplicación pueden ser estacones leñosos provenientes de la parte aérea (ramas) o estacas leñosas de raíz, también llamadas "zuecas" (Jacoboni *et al.*, 1976). La propagación por estacones leñosos presenta dos modalidades. Hasta hace poco tiempo en España la más adoptada consistía en plantar directamente sobre el terreno definitivo estacas de aproximadamente 60 cm de longitud, obtenidas de las ramas cortadas durante la poda de renovación de madera en olivares adultos. Más recientemente comenzaron a emplearse estacas más cortas -aproximadamente 20 cm- que se dejaban enraizar antes de la plantación definitiva, ya sea en el suelo del vivero o en bolsas de plástico de tamaño apropiado conteniendo sustrato. El empleo de estacones enraizados en bolsas de plástico sigue estando ampliamente difundido en muchas regiones olivareras españolas.

Los métodos de multiplicación con estacas leñosas presentan múltiples inconvenientes que han llevado a la búsqueda de sistemas alternativos (Caballero y Del Río, 1994): 1) estos sistemas requieren un gran volumen de material que sólo está disponible en la época de poda; 2) la formación del sistema radical es lenta, independientemente de que los estacones se planten directamente en el terreno definitivo o pasen por una etapa previa de vivero; y 3) esta práctica promueve la formación de matas compuestas con muchos troncos, lo que obliga a la realización de frecuentes podas de formación, con el consecuente desperdicio energético e incremento en los costes.

Como consecuencia de todos estos inconvenientes y de la necesidad de satisfacer una demanda creciente de material de propagación de calidad, se desarrolló la técnica de enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización. Este sistema se basa en la estimulación de la rizogénesis en estaquillas menores de 1 año mediante la aplicación de reguladores de crecimiento y calentamiento basal. Los fundamentos de esta técnica comenzaron a ser investigados en Estados Unidos hacia los años 50 (Hartmann, 1952), pero hasta la segunda mitad de la década de los 70 no comenzó a aplicarse en viveros comerciales de los principales países olivareros de la Cuenca Mediterránea. En España, la puesta a punto y difusión de esta nueva tecnología fue realizada en organismos públicos ubicados en Córdoba, en particular la Universidad y el Departamento Nacional de Olivicultura y Elaiotecnia.

El proceso de obtención de los plantones comprende tres etapas: a) enraizamiento; b) endurecimiento de los plantones; y c) crianza (Caballero, 1980). Para efectuar el enraizamiento se seleccionan estaquillas de la zona media de ramas vigorosas del año, de aproximadamente 15 cm de longitud, preferentemente a partir de árboles en activo crecimiento vegetativo cultivados con esa finalidad. En la base de las estaquillas se aplica hormona auxínica de enraizamiento siguiendo las recomendaciones de concentración y tiempo de tratamiento apropiadas según la formulación comercial que se haya escogido. A continuación, las estaquillas se plantan en el medio a utilizar, normalmente perlita, contenido en mesas o cajas de propagación. El enraizamiento dura aproximadamente unos 2 meses durante los cuales debe asegurarse el cumplimiento de dos condiciones ambientales indispensables para su éxito: una temperatura de 20-25° C en el sustrato y un ambiente fresco y muy húmedo en la parte aérea.

El endurecimiento de los plantones consiste en una transición gradual y controlada desde las condiciones de baja demanda evapotranspiratoria que caracterizan a la primera etapa a situaciones más rigurosas propias de ambientes no protegidos. Para ello, se aumenta el intervalo entre las nebulizaciones hasta que los nuevos brotes alcancen una longitud de unos 4 cm y se transfiere los plantones a un sustrato con una capacidad de retención hídrica ligeramente inferior (generalmente turba).

La crianza se realiza en bolsas o macetas de polietileno con distintos tipos de sustratos, contenedores en los que saldrán a la venta los plantones. Habitualmente se emplean bolsas de plástico de 3 L conteniendo sustrato de arena limosa, con o sin adición de turba y fertilizantes de liberación lenta. Las plantas se mantienen en vivero hasta que alcanzan un tamaño adecuado para su trasplante y pueden, por consiguiente, salir a la venta.

Durante los últimos años muchos viveros españoles han adoptado con éxito técnicas

de micropropagación *in vitro* para la producción de plántones de olivo. Este método, aplicado rutinariamente en otros cultivos, consiste en regenerar plantas completas a partir de yemas separadas de la planta madre o de embriones somáticos producidos de novo a partir de diferentes tipos de explantes (Pliego, 1992). Diferentes técnicas de micropropagación han sido probadas experimentalmente en el olivo con éxito desigual (Rugini, 1995). Recientemente, miembros del equipo técnico de un vivero español han descrito un método eficiente para la propagación *in vitro* del olivo a gran escala (García Ferriz *et al.*, 2000). El método se inicia con la producción de las plantas madres, que se obtienen mediante el injerto de yemas terminales de las variedades deseadas sobre plántones provenientes de semilla. Un año después se extraen segmentos de 5-10 cm de las ramas nuevas, que se esterilizan superficialmente y de ellas se obtienen explantes uninodales que se colocan en un medio de cultivo adecuado para la elongación bajo condiciones ambientales controladas. Las microestaquillas se mantienen en dicho medio hasta que alcanzan la elongación deseada, tras lo cual el extremo basal de los explantes se sumerge durante tiempo suficiente en una solución de hormonas de enraizamiento. Posteriormente las microestaquillas se transplantan a contenedores con sustrato ligero (habitualmente mezclas de turba y compost de fibra de coco en proporciones iguales) y se mantienen bajo 100 % de HR durante aproximadamente 1 mes. Habitualmente el sistema radical está suficientemente desarrollado al cabo de este tiempo como para que los plántones puedan ser transferidos a contenedores de mayor volumen con sustrato más grosero a fin de continuar una aclimatación de características similares a la etapa de endurecimiento descrita en el método de enraizamiento de estaquillas semileñosas.

Entre las ventajas que se atribuyen a esta práctica figura la posibilidad de producir a lo largo de todo el año un gran número de plantas que se caracterizarán por sus excelentes condiciones de calidad en lo que se refiere a desarrollo radical, uniformidad y condiciones sanitarias. A la vez, se señala como un gran logro de la técnica la posibilidad de obtener rápidamente un gran número de plántones de cultivares nuevos o recién puestas a propagar. En efecto, la práctica reduce significativamente el número de plantas madre necesarias para realizar propagaciones masivas.

#### **2.1.1.2. El sector viverista en España: su importancia dentro de la olivicultura moderna**

La investigación desarrollada para cumplir con los objetivos de la Nueva Olivicultura llevó a instituir un nuevo sistema que contempla cambios en el planteamiento productivo desde desde la misma implantación. Entre estos cambios destaca la adopción de marcos de plantación más densos y el empleo de plántones de un solo pie y más precoces. Todos



**Fig 2.1.** Propagación del olivo. **A) Propagación por enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización** A<sub>1</sub>) Vista general de un vivero, A<sub>2</sub>) Estaquillas dispuestas para el enraizamiento bajo nebulización A<sub>3</sub>) Cama de enraizamiento bajo nebulización A<sub>4</sub>) Estaquilla enraizada A<sub>5</sub>) Estaquillas en endurecimiento A<sub>6</sub>) Rellenado de bolsas con el sustrato para la crianza A<sub>7</sub>) Plantones en crianza **B) Micropropagación de estaquillas** B<sub>1</sub>) Estaquillas micropropagadas en endurecimiento B<sub>2</sub>) Estaquilla micropropagada B<sub>3</sub>) Estaquillas micropropagadas en crianza B<sub>4</sub>) Plantones micropropagados listos para la venta **C) Mutiplicación por grandes propágulos** C<sub>1</sub>) Estación enraizado.



estos cambios exigieron una reconversión del sector viverista que permitiera producir abundantes plantas de calidad para satisfacer las demandas de las nuevas plantaciones. El desarrollo de la técnica de enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización permitió cumplir en gran parte con estas exigencias (Caballero y Del Río, 1998). Ningún otro sistema hubiese podido suministrar las plantas necesarias para el aumento de superficie que ha tenido lugar durante los últimos años. Por otra parte, el enraizamiento bajo nebulización ha tecnificado una buena parte de la industria viverística del olivo surgida como consecuencia de una mayor rentabilidad del cultivo, en parte debida a las mejoras producidas por los estudios desarrollados por diversas instituciones de investigación, pero también a los incrementos de las ayudas y precios percibidos por los olivareros.

Los viveros comerciales españoles suministran casi por completo el material requerido para las plantaciones y reposiciones que se llevan a cabo dentro del territorio nacional (Chomé Fuster, 1998). La importación alcanza valores despreciables y el empleo de plantones producidos en la misma finca o en viveros de ocasión sólo es relevante en explotaciones familiares con bajo nivel de tecnificación o en aquéllas donde persisten cultivares locales poco difundidos en el circuito comercial. Por otra parte, desde hace algunos años, el sector viverístico del olivo provee no sólo al mercado interno sino que atiende también las demandas crecientes que provienen de países olivareros emergentes.

Los viveros que proporcionan el material empleado por los fruticultores habitualmente producen plantones de una gama muy amplia de especies leñosas que incluye frutales y ornamentales. Según los registros oficiales de las diferentes Comunidades Autónomas existen en la actualidad 261 viveros que producen y comercializan plantones de olivo. La distribución territorial de los mismos resume en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Viveros productores de plantas de olivo en 1998

<b>Comunidad Autónoma</b>	<b>Provincia</b>	<b>Número de viveros</b>	<b>Comunidad Autónoma</b>	<b>Provincia</b>	<b>Número de viveros</b>
<b>Andalucía</b>	Almería	2	<b>Cataluña</b>	Barcelona	3
	Cádiz	1		Gerona	2
	Córdoba	38		Lérida	1
	Granada	11		Tarragona	12
	Jaén	20	<b>Extremadura</b>	Badajoz	5
	Málaga	3		Cáceres	1
	Sevilla	21		<b>Madrid</b>	Madrid
<b>Aragón</b>	Teruel	1	<b>Murcia</b>		Murcia
	Zaragoza	1		<b>Valencia</b>	Alicante
<b>Canarias</b>	Las Palmas	1	Castellón		15
	Tenerife	3	Valencia		76
<b>Castilla-La Mancha</b>	Albacete	9	<b>TOTAL</b>		261
	Ciudad Real	11			
	Toledo	5			

Podemos observar que Valencia es la provincia con mayor concentración de viveros proveedores de plántones de olivo. Esta situación, que contrasta con la distribución geográfica de la producción olivarera, se explica por el desarrollo de un importante sector viverístico asociado a la citricultura. Si bien el olivo constituye un producto secundario en estos viveros, la capacidad tecnológica y la versatilidad de los mismos los ha convertido en importantes proveedores de las plantaciones intensivas desarrolladas en España y en el exterior. Detrás de Valencia se ubica Córdoba como provincia productora. En esta última provincia se ha desarrollado un sector viverístico de buen nivel tecnológico que, si bien ofrece una amplia variedad de especies leñosas, se especializa fundamentalmente en la producción de plántones de olivo. La proximidad a los organismos públicos de investigación desde los cuales se difundió la técnica de enraizamiento de estacas semileñosas bajo nebulización, determinó que Córdoba se mantuviera a la vanguardia de Andalucía. Asimismo, las provincias de Jaén y Sevilla mantienen hasta el presente un sector viverístico importante y de vieja tradición, muy especializado en la producción de cultivos de difusión regional.

La expansión sin precedentes que presentó el sector viverístico del olivo en España a partir de la década de los 80, tuvo lugar al amparo de la fuerte recuperación del área de plantación y, a menudo, ese fuerte crecimiento se dio de forma descontrolada. La experiencia recogida desde aquel momento, y el análisis de la situación actual, llama nuestra atención sobre dos aspectos en los cuales la tecnología viverística del olivo aún no ha brindado al sector respuestas totalmente satisfactorias: a) la necesidad de garantizar la pureza varietal, y b) **la exigencia de producir plantas que satisfagan un estándar de calidad sanitaria.**

## **2.1.2. ASPECTOS FITOSANITARIOS VINCULADOS A LA PROPAGACIÓN DE FRUTALES**

### ***2.1.2.1. La exclusión de nematodos y otros patógenos: su importancia en viveros de frutales***

Se conoce con el nombre de "exclusión" al conjunto de medidas de control de enfermedades que tienen como objetivo evitar que un patógeno inexistente en un área de cultivos acceda a la misma. Esta práctica constituye la primera medida de control a considerar en el manejo de los nematodos, ya que es más fácil prevenir la infestación con ellos de los suelos agrícolas que erradicarlos o manejarlos posteriormente (Thomson y Caswell, 1987).

La naturaleza de las medidas de exclusión puede ser diversa según el objetivo que se haya preestablecido. Los sistemas de cuarentena impuestos a materiales vegetales provenientes de áreas infectadas representan la expresión práctica de la exclusión en el ámbito nacional o regional y constituyen, por tanto, una función básica de regulación fitosanitaria adoptada por la mayoría de los países (Maas, 1987). Diversas prácticas de saneamiento recomendadas a nivel de finca procuran evitar que las formas infectivas de muchos nematodos se trasladen por medio de la maquinaria, el agua de riego, u otros mecanismos pasivos desde zonas infestadas a zonas libres de aquellos (Dropkin, 1989). Tienen una importancia particular aquellos métodos de exclusión dirigidos a evitar la dispersión de nematodos a través de semilla o de material de propagación agámica. El empleo de semilla libre de nematodos ha mostrado ser un medio efectivo de control para *Anguina tritici* (Steinbuch) Filipjev en trigo (Swarup y Sosa Moss, 1990), *Aphelenchoides besseyi* (Christie) Christie en arroz (Bridge *et al.*, 1990) y *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev en alfalfa y trébol (Marre *et al.*, 1983). Del mismo modo, el empleo de material de propagación libre de nematodos es una herramienta eficaz de control en cultivos propagados por bulbos, rizomas o tubérculos. Esto se ha verificado con diversas especies de nematodos fitopatógenos como *D. dipsaci* (Sturhan y Brzeski, 1991), *Radopholus similis* (Cobb) Thorne (Blake, 1972) y *Globodera* spp..

Los conceptos referidos acerca de la importancia de la exclusión para el control de nematodos fitoparásitos resultan particularmente aplicables al caso de los frutales y otros cultivos de carácter plurianual. En estos casos, los nematodos fitoparásitos pueden producir muchas generaciones a lo largo del ciclo productivo. Por ello, poblaciones que resultan insignificantes en el origen del cultivo pueden alcanzar niveles de infestación perjudiciales (Greco, 1990). Por tanto, a diferencia de lo que ocurre en cultivos anuales, en árboles frutales una vez implantados las medidas de control frente a nematodos fitoparásitos sólo pueden alcanzar una reducción de los niveles poblacionales y no la erradicación de los mismos (Caroppo, 1998). Por esta razón, resulta fundamental prevenir la introducción de nematodos fitoparásitos en la plantación de frutales a través del material de propagación. El vivero juega un papel primordial en la prevención de la dispersión de nematodos y otras enfermedades o plagas de suelo (González, 1969; Esser, 1977; Pinochet *et al.*, 1987; Lorrain, 1998).

Si bien los plantones de vivero constituyen una importante fuente de dispersión de nematodos fitoparásitos en aquellos frutales que se propagan a raíz desnuda, este riesgo se incrementa en el caso de especies perennifolias que se multiplican a través de material de vivero que contienen cepellón de tierra. En efecto, el suelo que acompaña a los plantones constituye un componente adicional de infestación (Pinochet, *et al.*, 1992a), particularmente

apropiado para aquellas especies de nematodos ectoparásitos que presentan importancia económica en frutales.

### **2.1.2.2. Prospecciones nematológicas en viveros de frutales a nivel regional: importancia y antecedentes**

El ejercicio de la exclusión de nematodos y otros patógenos en frutales requiere conocer cuáles son las especies que están presentes en los viveros que suministran a las plantaciones en un área geográfica determinada. Con este objeto, se han llevado a cabo prospecciones regionales en viveros de especies frutales en múltiples ocasiones. Algunas de ellas han permitido, en el caso del olivo, demostrar la responsabilidad del vivero en la dispersión de enfermedades importantes, como la Verticilosis (Thanassoulopoulos, 1993). El desarrollo de la prospección como medida de vigilancia ha tenido un escaso desarrollo en el ámbito de la propagación viverística de frutales, pero existen algunos ejemplos destacables que mencionaremos a continuación.

Pinochet *et al.* (1987) analizaron muestras de suelo y raíz provenientes de plantas pertenecientes a 35 especies de frutales recolectadas en viveros comerciales de Panamá. De todas las especies aisladas *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, *Pratylenchus coffeae* (Zimmerman) Filipjev y Schuurmans Stekhoven y *Tylenchulus semipenetrans* Cobb fueron las especies consideradas de mayor importancia, tanto por su patogenicidad reconocida como por su incidencia y, en muchos casos, las altas densidades de población registradas. Asimismo, los autores destacan como causa probable de la elevada infestación encontrada en algunos viveros, condiciones deficientes en el manejo agronómico y sanitario de los mismos.

Verdejo y Pinochet (1991) realizaron una prospección de nematodos asociados a plantones de frutales y cítricos en viveros comerciales localizados en varias provincias españolas. Se identificaron un total de 17 géneros de nematodos fitoparásitos. Las densidades detectadas en las poblaciones fueron, en general bajas, lo que se atribuyó al escaso tiempo de permanencia del plantón en el vivero. Las poblaciones identificadas en frutales presentaron mayor diversidad que las de cítricos, presumiblemente debido a la mayor especificidad que presenta la nematofauna asociada a este grupo de plantas. *Pratylenchus* spp., *Tylenchorhynchus* spp. y *Tylenchus* spp. fueron los géneros de nematodos aislados con mayor frecuencia. Los tres géneros estuvieron presentes en más del 60 % del total de las muestras y fueron los únicos que se encontraron sin excepción asociadas a todas las especies de frutales prospectadas. La frecuencia con que se halló *Meloidogyne* spp. fue muy inferior, ya que

apenas pudo ser aislada en un 5 % de las muestras.

Valcarce y Laborda (1980) efectuaron una prospección de la nematofauna presente en viveros de agrios oficialmente autorizados y ubicados en las provincias de Alicante, Castellón y Sevilla. Los géneros de nematodos fitoparásitos más importantes por su frecuencia fueron *Boleodorus* spp. y *Tylenchus* spp.; mientras que *Zygotylenchus* sp. y *Tylenchulus semipenetrans*, si bien no estuvieron presentes con en un gran número de muestras, destacaron entre el resto de las especies por el grave riesgo potencial que implica su parasitismo.

### **2.1.3. LA CERTIFICACIÓN SANITARIA EN VIVEROS**

#### **2.1.3.1. Algunos antecedentes en la aplicación de programas de certificación sanitaria**

Las medidas de exclusión pueden ser alentadas o promovidas desde los organismos públicos a través de diferentes mecanismos. Un ejemplo claro en esta materia es la certificación sanitaria de material vegetal en viveros. Se conoce con este nombre al conjunto de normas reguladoras destinadas a producir material de propagación que satisfaga un estándar mínimo en cuanto a la presencia de formas infectivas de determinados patógenos considerados de riesgo.

La certificación sanitaria de la producción viverística de frutales ha resultado efectiva en prevenir la dispersión de múltiples patógenos. Este hecho es particularmente relevante en el caso de las infecciones virales, ya que los programas de producción de material de propagación certificado continúan siendo una de las herramientas fundamentales en el manejo de estas enfermedades. La puesta en práctica de un programa de certificación sanitaria en viveros en Apulia (sur de Italia), ha dado lugar a una importante disminución de la incidencia de múltiples enfermedades virales en cítricos, frutales de hueso, olivo y vid (Savino *et al.*, 1995). Programas semejantes al referido se han empleado en Estados Unidos para prevenir la dispersión de enfermedades virales en frutales de hueso (Welsh, 1976). En España los servicios autonómicos de investigación agraria mantienen bancos de material base libre de virus para los principales cultivares de cítricos y frutales de hueso y pepita, a fin de proveer a los viveros que efectúan la multiplicación (Navarro, 1994, Moriones y Luis, 1996).

La certificación sanitaria del material de propagación ha resultado apropiada en ocasiones para el control de enfermedades causadas por nematodos fitoparásitos en frutales.

El ejemplo más notable en este sentido es el que mencionan Esser *et al.* (1988). Hacia la década de los 50 se produjo en cultivos de cítricos establecidos en Florida (Estados Unidos), una gravísima epidemia de "spreading decline" o "decaimiento generalizado" causada por el nematodo barrenador *R. similis*. La gravedad del problema determinó la puesta e marcha de una campaña oficial destinada a erradicar el agente. Las plantas enfermas fueron arrancadas y quemadas, y se clausuraron provisionalmente las fincas afectadas. A fin de garantizar que el patógeno no volviera a reinstalarse en el suelo de las nuevas plantaciones, se implementó un "Programa de aprobación de ubicación de viveros". El establecimiento de viveros fue permitido exclusivamente en aquellos lugares que mostraban estar libres del nematodo después de las prospecciones oficiales realizadas. En años posteriores se añadió la exigencia de que el terreno estuviera libre de otros dos nematodos considerados como fitoparásitos clave de los cítricos, *T. semipenetrans* y *P. coffeae*. El impacto de este programa sobre la incidencia del patógeno resultó espectacular: se calcula que la aplicación de estas medidas evitó la infestación de 18.000 has (Poucher *et al.*, 1967). La puesta en marcha del programa posibilitó que la superficie de cultivo de cítricos aumentara, desde el comienzo de su aplicación, en 1954, hasta 1985, en más de 100.000 has.

En Brasil, el otorgamiento de subsidios por el gobierno para establecimiento de nuevas plantaciones de café exigía como condición el cumplimiento de ciertas prácticas para la exclusión de nematodos. Entre tales prácticas figuraba la prohibición de emplear plántulas de vivero infestadas en las nuevas plantaciones (Campos *et al.*, 1990). Esto impidió, durante el tiempo que estuvo en vigencia la norma, el establecimiento en áreas no infestadas de especies de nematodos de gran importancia económica para el café, especialmente *Meloidogyne* spp.

### **2.1.3.2. La certificación sanitaria del olivo y otros frutales en la UE, España y Andalucía**

La necesidad de contar con un marco de referencia único para todos los Estados miembros, ha llevado a las autoridades de la UE a establecer un esquema de certificación para el material de propagación que circula entre los diferentes países del bloque y recomendaciones para una política de cuarentena común. Cuatro especies de nematodos fitoparásitos de importancia económica en frutales y ausentes en los países de la UE - *Longidorus diadecturus* Eveleigh y Allen, *Xiphinema americanum* Cobb (s.l.), *Xiphinema californicum* Lamberti y Bleve-Zacheo y *Radopholus citrophilus* Huettel, Dickson y Kaplan han sido incluidos entre los organismos fitopatógenos de cuarentena (Di Silvestro y Tacconi,

1998). Para el tránsito de material de propagación de frutales entre los países miembros de la UE se han establecido las normas CAC (*conformitas agrarias communitatis*), que constituyen la base para un esquema común de certificación sanitaria y varietal del material de vivero de frutales. Esto supone simultáneamente, para el material que cumple los estándares de la norma, la expedición del "pasaporte fitosanitario", certificado que permite el libre tránsito de plantones dentro de la UE y garantiza la ausencia de plagas y enfermedades consideradas como muy perjudiciales para la calidad del material de multiplicación. En este grupo se incluyen varias especies de nematodos fitoparásitos como *Meloidogyne* spp., *T. semipenetrans*, *Aphelenchoides* spp. y *D. dipsaci*.

Los diversos países miembros de la UE han ido implementando programas oficiales de certificación sanitaria dirigidos a viveros de frutales de acuerdo con las directivas de sede comunitaria. En España, la materia está legislada en el RD 929/1995 (BOE Nº 141) que aprueba el Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de frutales. El ámbito de aplicación del decreto comprende la producción, comercialización e importación del material de propagación correspondiente a 20 especies de plantas, que incluyen cítricos, frutales de cáscara, frutales de hueso, frutales de pepita, frutas finas y platanera. En el mencionado decreto se describen los requisitos de calidad que deben cumplir las plantas de vivero de categoría CAC, que incluyen exigencias de sanidad, pureza varietal y calidad exterior. Las normas relativas a calidad sanitaria imponen que el material se encuentre libre, al menos por observación visual, de cualquier organismo nocivo que afecte a los plantones, con énfasis particular en una lista de patógenos y plagas que se anexa para cada especie de frutal. La calificación de planta de vivero certificada requiere asimismo el cumplimiento de la normativa fitosanitaria establecida en el RD 2071/1993 (BOE Nº 300), que estipula las condiciones para acceder al pasaporte fitosanitario.

Desde hace aproximadamente 10 años, los países olivareros de la UE comenzaron a mostrar interés por desarrollar normas de certificación para el olivo. Italia fue el primer país en contemplar esta materia, ya que en 1993 dictó a través de un decreto ministerial las normas técnicas para la producción de material de propagación vegetal certificado de olivo (D.M. 16.06.1993). En el citado decreto se mencionan las condiciones para el control de las características genéticas y el estado sanitario de la producción viverística. Las inspecciones previstas para las plantas de vivero en la norma italiana exigen que por observación visual se muestren libres de *V. dahliae*, *P. savastanoi* y cualquier tipo de virosis. Se exige, por otra parte, que el suelo donde vayan a implantarse plantas madres u otro material de premultiplicación debe estar libre de *V. dahliae* y *X. diversicaudatum* (Micoletzky) Thorne, asumiendo la responsabilidad de ésta última especie en la transmisión de nepovirus del olivo.

España y Portugal siguieron a Italia en su interés por establecer normas de certificación sanitaria para el olivo. El RD 929/1995, mencionado precedentemente, establece para España, la primer lista de organismos nocivos y enfermedades que al menos por observación visual deben estar ausentes en las plantas certificadas de olivo. Se incluyen en esta lista "insectos, ácaros y nematodos en todas sus fases de desarrollo" y se menciona, en particular, a *Saissetia oleae* Bern. y *Eusophera pinguis* Haw., entre los insectos, y *Meloidogyne* spp., entre los nematodos. Respecto de las enfermedades se hace mención expresa de la bacteria responsable de la tuberculosis (*P. syringae* pv. *savastanoi*), del hongo *V. dahliae*, y de "todos" los virus y organismos similares. Con posterioridad a la redacción del reglamento técnico español, el Organismo Europeo y Mediterráneo para la Protección de las Plantas (OEPP) recoge los antecedentes en la materia, en particular los italianos, y elabora un esquema para la certificación de árboles y plantones de olivo. En dicho esquema figuran las directivas recomendadas para ser adoptadas por los países de la UE. España modificó las disposiciones particulares dispuestas para el olivo en el RD 929/1995 a fin de adecuarlas a las recomendaciones comunitarias, y ésto se concreta en el RD 1678/1999 (BOE Nº 276). En él se incluye la exigencia de que el suelo o sustrato de plantación esté libre de *V. dahliae* y nematodos transmisores de virus en todas las etapas de multiplicación.

En Andalucía no existe ninguna norma que establezca normas de certificación sanitaria de frutales complementarias a las establecidas a nivel nacional. Sin embargo, el Reglamento Específico de la Producción Integrada del Olivar, constituido en la Orden del 12.8.1997 (BOJA Nº 100), representa un avance significativo en dirección hacia la generalización del empleo de plantas sanas en las nuevas plantaciones. En efecto, este reglamento impone, para la Producción Integrada la obligatoriedad de emplear plantas que satisfagan el estándar de calidad sanitario impuesto por el RD 929/1995.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS**

#### **2.2.1.1 Selección y caracterización de los viveros**

Se realizaron prospecciones de viveros comerciales proveedores de plantones de olivo en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla entre junio de 1996 y mayo de 1998. El número de viveros incluidos en la muestra pretendió cubrir aproximadamente un 20 % de la totalidad de los viveros presentes en cada provincia. La selección de viveros a prospectar se

efectuó a partir de un conjunto exhaustivo constituido por los registros oficiales de la Dirección General de la Producción Agraria (Sección de Control de Semillas y Plantas de Vivero) de la Junta de Andalucía e información particular de productores y asesores. El criterio empleado para la selección de los viveros fue incluir un grupo de unidades muestrales que representara la diversidad de establecimientos presentes en cada provincia, en lo que respecta a cultivares producidos, métodos de enraizamiento, origen del sustrato, nivel tecnológico, movimiento comercial, etc. Por ello, se incluyeron en la prospección 9 viveros de la provincia de Córdoba, 6 de Jaén y 3 de Sevilla. En las Tablas 2.2, 2.3. y 2.4. se resumen las características de cada uno de los establecimientos incluidos en la prospección.

**Tabla 2.2.** Distribución y características de viveros de plantones de olivo muestreados en la provincia de Córdoba

<b>Nº de referencia</b>	<b>Producción anual de plantones</b>	<b>Multiplicación</b>	<b>Cultivares estudiados (Nº plantones)</b>	<b>Nº total de muestras estudiadas</b>
101	120.000	Estaquillado semileñoso	Picual (6), Arbequina (6), Manzanilla (6), Hojiblanca (6),	24
102	200.000	Estaquillado semileñoso	Picual (6), Arbequina (9), Cornicabra (3), Hojiblanca (3), Ocal (3), Gordal (3)	27
103	75.000	Estaquillado semileñoso	Picual (6), Arbequina (6), Manzanilla (6), Hojiblanca (6),	24
104	100.000	Estaquillado semileñoso	Picual (9), Arbequina (6), Hojiblanca (3),	18
105	150.000	Estaquillado semileñoso	Picual (3), Arbequina (6), Manzanilla (3), Hojiblanca (3),	15
107	40.000	Estaquillado semileñoso	Picual (6) Arbequina (6)	12
110	45.000	Estacas leñosas	Picual (6)	6
111	200.000	Estacas leñosas	Picual (3), Hojiblanca (3),	6
113	150.000	Estacas leñosas	Picual (6), Cornicabra (6), Hojiblanca (6),	18
<b>TOTAL</b>	1.080.000	-	Picual (51), Arbequina (39), Manzanilla (15), Hojiblanca (30), Cornicabra (9), Ocal (3), Gordal (3)	150

**Tabla 2.3.** Distribución y características de viveros de plantones de olivo muestreados en la provincia de Sevilla

<b>Nº de referencia</b>	<b>Producción anual de plantones</b>	<b>Multiplicación</b>	<b>Cultivares estudiados (Nº plantones)</b>	<b>Nº total de muestras estudiadas</b>
201	120.000	Estaquillado semileñoso	Picual (6), Arbequina (6), Manzanilla (3), Hojiblanca (3), Picolimón (1)	19
202	180.000	Estaquillado semileñoso	Picual (6), Arbequina (6), Manzanilla (6), Hojiblanca (6),	24
203	150.000	Estaquillado semileñoso	Picual (6), Arbequina (6), Manzanilla (3), Cornicabra (6),	21
<b>TOTAL</b>	450.000	-	Picual (18), Arbequina (18), Manzanilla (12), Hojiblanca (9), Cornicabra (6), Picolimón (1)	64

**Tabla 2.4.** Distribución y características de viveros de plantones de olivo muestreados en la provincia de Jaén

<b>Nº de referencia</b>	<b>Producción anual de plantones</b>	<b>Multiplicación</b>	<b>Cultivares estudiados (Nº plantones)</b>	<b>Nº total de muestras estudiadas</b>
301	240.000	Estaquillado semileñoso	Picual (6), Arbequina (6), Cornicabra (6) Acebuche (2)	20
302	120.000	Estaquillado semileñoso	Picual (3)	3
303	45.000	Estaquillado semileñoso	Picual (6)	6
304	60.000	Estacas leñosas	Picual (6)	6
305	50.000	Estacas leñosas	Picual (6)	6
306	40.000	Estacas leñosas	Picual (6)	6
<b>TOTAL</b>	555.000	-	Picual (33), Arbequina (6), Cornicabra (6)	47

En todos los casos y con independencia del método de multiplicación utilizado, los plantones estaban dispuestos para la venta en bolsas de polietileno negro de aproximadamente 3 L de capacidad, conteniendo el sustrato en el que se han mantenido los plantones durante la fase de crianza. El sustrato en el que cada vivero llevó a cabo la etapa de crianza previa a la venta de los plantones varió ampliamente entre los establecimientos

prospectados y estuvo vinculado a las disponibilidades locales. La Tabla 2.5. describe para cada uno de los viveros prospectados el origen del sustrato empleado y las características analíticas más importantes de los mismos. Los análisis fueron realizados por el Laboratorio Agroalimentario, Delegación Provincial de Córdoba, Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Las determinaciones realizadas fueron las siguientes: capacidad de intercambio catiónico (CIC); porcentaje de materia orgánica oxidable; porcentaje de nitrógeno orgánico; pH en disolución 1/2,5 V/V suelo-agua destilada; textura (porcentajes de arcilla, arena y limo en fracción sólida mineral); y conductividad eléctrica.

**Tabla 2.5.** Origen y características analíticas de los sustratos empleados en los viveros estudiados<sup>a</sup>

Vivero	Origen del sustrato	Textura <sup>b</sup>	Materia orgánica <sup>c</sup> (%)	Nitrógeno orgánico <sup>d</sup> (%)	pH 1/2,5 <sup>e</sup>	Conductividad eléctrica (1/5) <sup>f</sup> (mmhos/cm)	Capacidad de intercambio catiónico <sup>g</sup> (meq/100 g)
101	Aluvión Río Guadalquivir	Arena franca	0,35	0,02	8,67	0,191	4,96
102	Aluvión Río Guadalquivir	Franco-Arenoso	0,52	0,02	8,36	0,251	5,30
103	Aluvión Río Guadalquivir	Franco-Arenoso	0,38	0,02	8,52	0,179	6,00
104	Aluvión Río Guadalquivir	Arena franca	0,42	0,02	8,44	0,163	6,00
105	Aluvión Río Guadalquivir	Arena franca	0,87	0,04	8,34	0,243	5,39
107	Aluvión Río Guadalquivir	Arena franca	0,21	0,01	8,43	0,199	5,13
110	Suelo de campiña	Franco	1,15	0,07	7,76	0,247	13,83
111	Suelo de campiña	Franco	1,60	0,10	8,40	0,229	15,39
113	Suelo de campiña	Franco	0,91	0,05	8,15	0,233	14,09
201	Suelo hortícola	n.d. <sup>h</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
202	Aluvión Río Guadalquivir	Franco-Arcilloso	1,85	0,10	7,97	0,787	22,43
203	Aluvión Río Guadalquivir	Franco-Arcilloso	2,16	0,13	7,89	0,781	16,87
301	Suelo campiña + turba + arena	Franco-Arenoso	1,15	0,09	8,20	0,493	10,78
302	Suelo campiña	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
303	Suelo campiña	Franco-Arcilloso	3,17	0,20	8,13	0,473	22,78
304	Aluvión Río Jandulilla	Franco-Arcilloso	1,46	0,09	8,18	0,940	16,09
305	Suelo campiña	Franco-Arcillo-Limoso	1,43	0,09	8,59	0,316	15,65
306	Suelo campiña	Franco	1,04	0,07	7,94	0,316	12,96

<sup>a</sup>Los análisis fueron realizados por el Laboratorio Agroalimentario de la Delegación Provincial Córdoba de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. <sup>b</sup>Estimada de acuerdo a los porcentajes de arcilla, limo y arena calculados por el método densimétrico. <sup>c</sup>Obtenido por método volumétrico. <sup>d</sup>Obtenido por método volumétrico. <sup>e</sup>Obtenido en una suspensión 1/2,5 V/V suelo/agua destilada. <sup>f</sup>Obtenida por método conductimétrico. <sup>g</sup>Obtenida por método fotométrico. <sup>h</sup>n.d.: no determinado

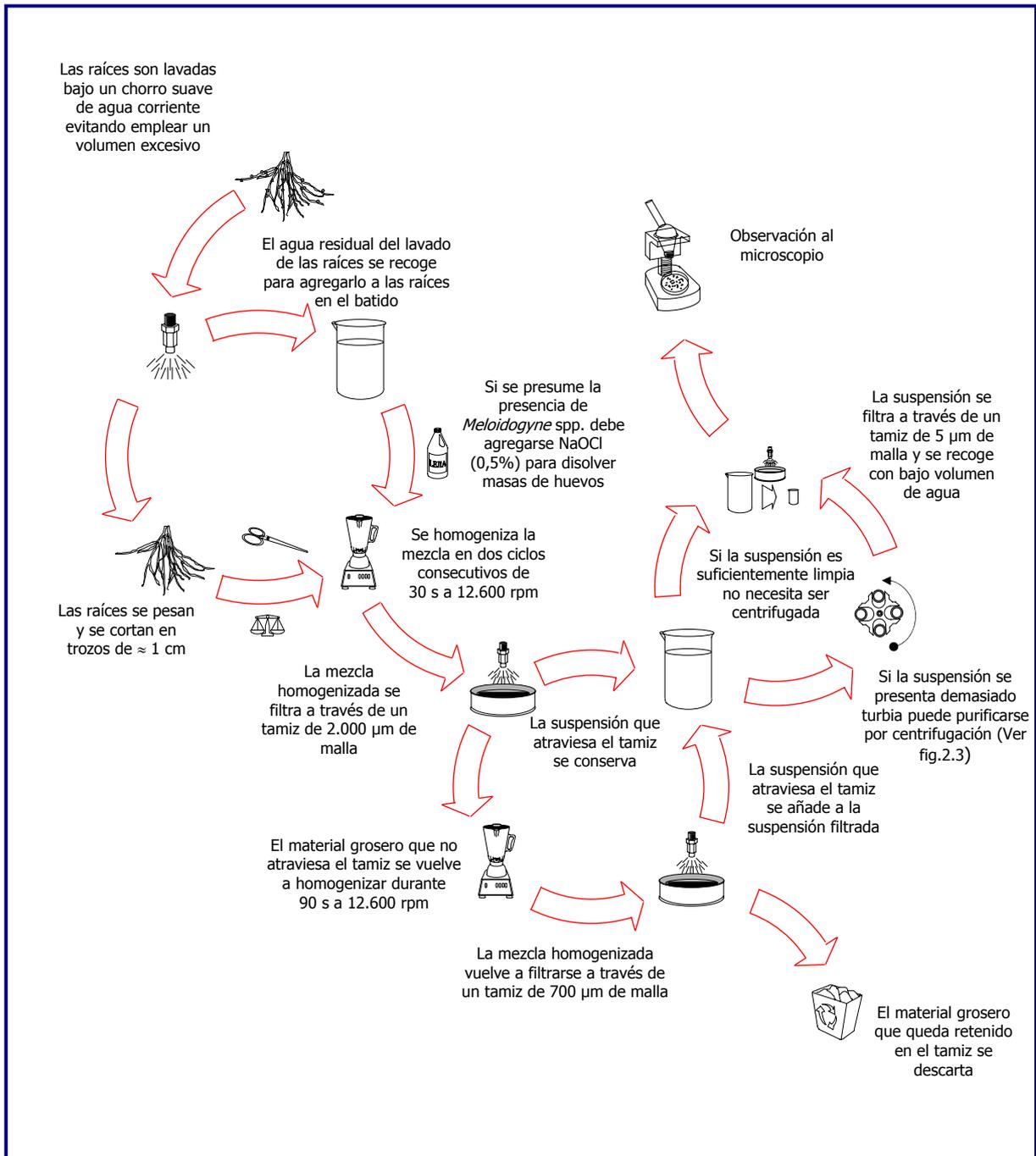
### **2.2.1.2. Recolección de las muestras**

En cada uno de los viveros las plantas se clasificaron según el cultivar y el grupo de edad (plantas de 6-8 y 12-18 meses de edad) y de cada combinación se recogieron tres plantas. El muestreo se realizó durante las primaveras de 1996 y 1997. Los cultivares incluidos en el muestreo en orden decreciente de importancia fueron: 'Picual', 'Arbequina', 'Hojiblanca', 'Manzanilla', 'Cornicabra', 'Ocal', 'Gordal' y 'Picolimón'.

## **2.2.2. ANÁLISIS NEMATOLÓGICO DE LAS MUESTRAS**

### **2.2.2.1. Extracción a partir de muestras de suelo y raíz**

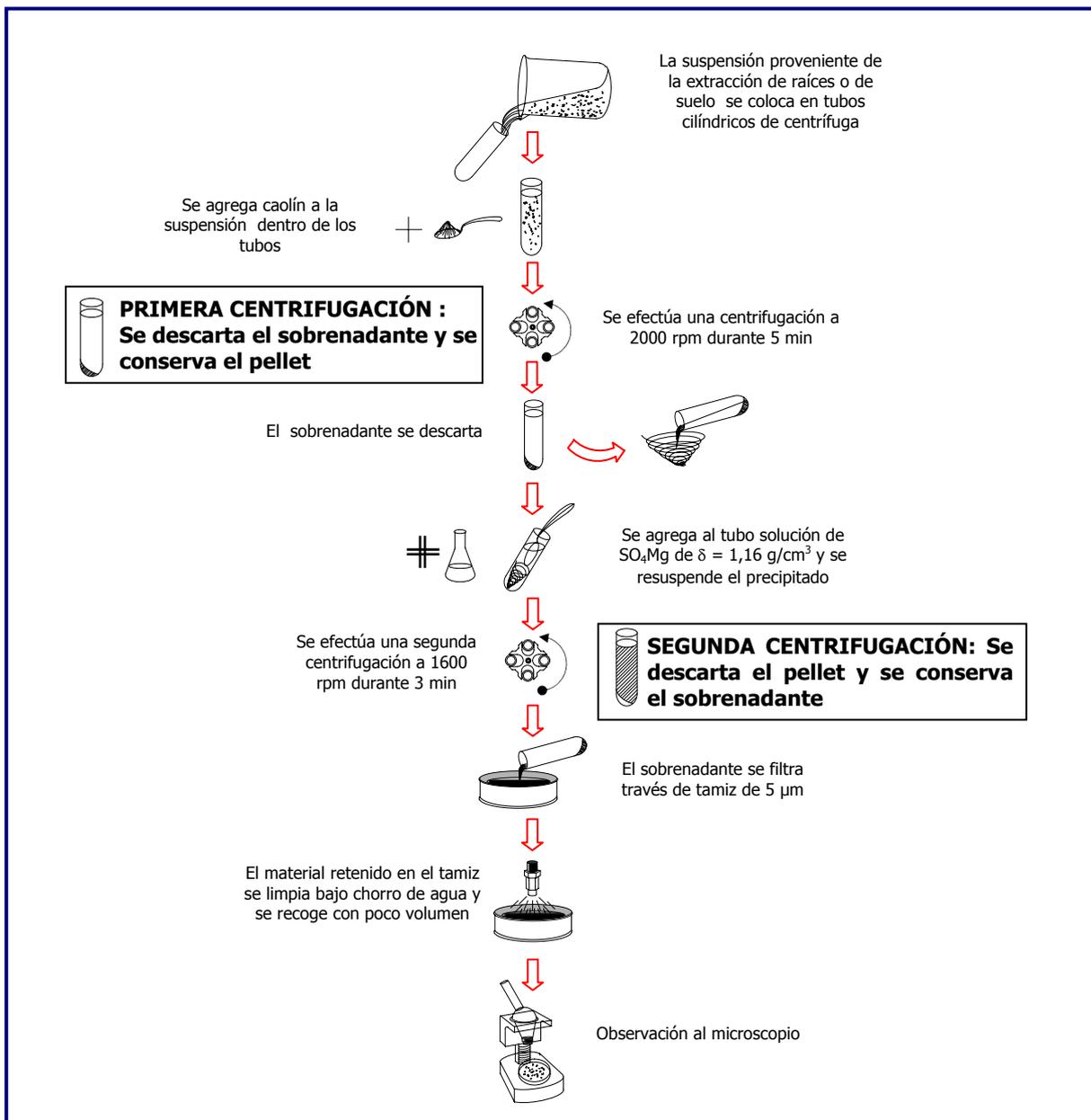
Con objeto de conocer la nematofauna fitoparásita presente en las muestras recolectadas se procedió a separar el suelo de las raíces. Una vez extraída la planta fuera de la bolsa correspondiente se retiraron los restos groseros de suelo adherido a las raíces. Las raíces se estudiaron macroscópicamente y se evaluó la presencia de nódulos o lesiones propias del parasitismo por nematodos noduladores y lesionadores, respectivamente. Posteriormente, se procedió a extraer los nematodos siguiendo el método de centrifugación descrito por Coolen (1979), con modificaciones (Fig. 2.2). La elección de este método de extracción se hizo teniendo en cuenta su rapidez, eficacia y ser independiente de la natural movilidad de los nematodos (Hooper, 1986). Para ello, la raíz se lavó bajo un suave chorro de agua corriente, se secó con papel de filtro para proceder a su pesado y, más tarde, se cortó en trozos de longitud no superior a 1 centímetro. El agua empleada en el lavado fue conservada ante la posibilidad de en la misma estuvieran presentes masas de huevos o ejemplares semiendoparásitos que pudieran haberse desprendido durante el lavado. Los trozos de raíz se colocaron en el vaso de una batidora junto con el agua residual del lavado. Cuando se sospechó la presencia de *Meloidogyne* spp. se agregó lejía comercial (50 g Cl<sub>2</sub>/L) hasta alcanzar una concentración de 10 % V/V (0,5% de NaOCl), con objeto de disolver las masas de huevos. Posteriormente, se procedió a efectuar dos etapas de homogenización de 15 s a 12.600 rpm separadas por un intervalo de 10 s. El homogenizado resultante se filtró a través de un tamiz de 2.000 µm. Se conservó la suspensión filtrada y los restos que quedaron retenidos fueron homogenizados nuevamente a 12.600 rpm durante 90 s. La mezcla obtenida se volvió a filtrar a través de la malla de 700 µm y la suspensión filtrada se reunió con la obtenida en la etapa previa. La suspensión resultante se filtró a través de un tamiz de 5 µm de diámetro de poro (que impide la pérdida de ningún estado o especie de nematodos fitoparásitos) y el material retenido se recogió y transfirió a los tubos de centrifuga.



**Fig. 2.2.** Preparación de la muestra de raíz para la extracción de nematodos mediante el método de centrifugación (Coolen, 1979) modificado para plantas leñosas.

Este material se trasvasó a tubos de centrífuga cilíndricos de fondo redondeado de 250 ml, se le agregó caolín y se sometió a centrifugación durante 5 min a 2.000 rpm (Fig. 2.3). El sobrenadante se descartó y el precipitado fue resuspendido en una solución de  $\text{SO}_4\text{Mg}$  ( $\delta$  . 1,16 g/cm<sup>3</sup>). La nueva suspensión se centrifugó durante 3 min a 1.600 rpm. El sobrenadante de esta segunda centrifugación fue concentrado por filtración a través de tamiz de 5  $\mu$ m de malla, se lavó para eliminar los restos de  $\text{SO}_4\text{Mg}$  y se recolectó en un vaso de

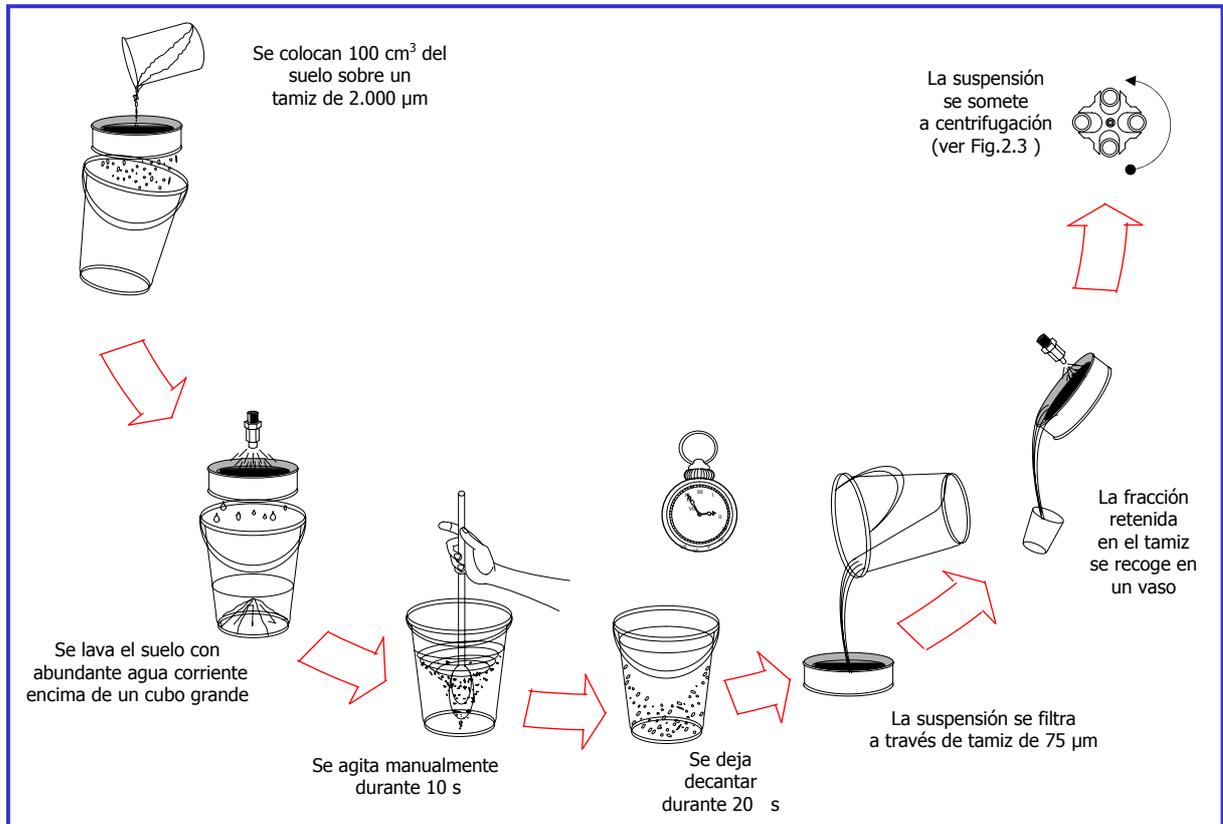
plástico para la identificación y conteo de los nematodos.



**Fig.2.3.** Extracción de nematodos en muestras de suelo o de raíces mediante centrifugación (Coolen, 1979).

La extracción de los nematodos presentes en el suelo se efectuó siguiendo el método propuesto por Coolen (1979), con algunas modificaciones. Sobre un tamiz de 26 cm de diámetro y 2 mm de apertura de malla se depositó una alícuota de  $100 \text{ cm}^3$  del suelo contenido en la bolsa o maceta. La muestra de suelo se lavó con abundante agua corriente hasta que la totalidad de la fracción de diámetro inferior a la apertura de la malla hubiese sido arrastrada y recogida en un recipiente de 12 L. El volumen de la suspensión en dicho recipiente se completó hasta alcanzar los 10 L y se procedió manualmente a su agitación durante 10 s. Transcurridos 20 s desde la interrupción de la agitación, la

suspensión se filtró a través de un tamiz de 75  $\mu\text{m}$ . El material recogido en el tamiz se traspasó a un vaso de precipitados y posteriormente se procedió a la centrifugación descrita anteriormente.



**Fig.2.4.** Extracción de nematodos en muestras de suelo (Coolen, 1979).

### **2.2.2.2. Identificación y recuento de los ejemplares**

Las suspensiones conteniendo los nematodos extraídos de raíz y suelo fueron observadas bajo microscopio estereoscópico Leica MSZ5 (40 x). En dichas suspensiones se atendió a los ejemplares fitoparásitos, que fueron reconocidos e identificados. Esta identificación se realizó hasta el nivel de especie en todos aquellos casos en que el material disponible fue suficiente y, en caso contrario, se completó hasta el nivel de género. Los ejemplares seleccionados para la observación se mataron con aplicación de suave calentamiento y luego fueron fijados en solución de formaldehído al 4 %. El montaje de los ejemplares se realizó siguiendo el método de la glicerina anhidra de Seinhorst (1959, 1962): los ejemplares se transfirieron desde la solución fijadora a pocillos de placa microtiter en los que previamente se había depositado una solución de etanol 96%, glicerina anhidra y agua destilada en proporción 20:1:79 v/v. Los pocillos se llevaron a una estufa en la cual previamente se había colocado alcohol con objeto de mantener una atmósfera saturada del mismo y se sometieron a 38-40° C durante 12-14 horas. Tras esta etapa, la solución se

reemplazó por una nueva conteniendo glicerina anhidra y etanol 96 % en proporción 5:95 v/v, y los pocillos se colocaron en la estufa a la misma temperatura durante un período de 4-6 h. Completada esta segunda etapa de calentamiento, los ejemplares se montaron en un portaobjetos sobre una gota de glicerina anhidra y se colocó un cubreobjetos encima de la misma con la precaución de aplicar en los bordes pequeñas tiras de lana de vidrio, a fin de evitar el aplastamiento de los nematodos.

Una vez realizado el montaje de los especímenes se procedió a la observación de los mismos bajo microscopio óptico Nikon Labophot con contraste interferencial-diferencial según Nomarski. Este último dispositivo permitió la observación de estructuras superficiales con carácter diagnóstico (anillos labiales, campos laterales, estrías longitudinales, fasmidios, etc.), difíciles de observar en campo claro.

Para la identificación de los nematodos fitoparásitos encontrados se utilizaron diferentes caracteres morfológicos como la estructura del esófago, forma de la región labial, forma de la cola, campos laterales, etc. Asimismo, se utilizaron caracteres morfométricos como los índices de De Man (1880), la longitud del estilete, la longitud total, la longitud de la cola, etc. (Southey, 1986). Para ello, los ejemplares montados se midieron mediante una escala micrométrica de ocular previamente calibrada con la escala micrométrica de un portaobjetos, y con la ayuda de un curvímeter milimétrico para estructuras curvas (longitud del cuerpo, posición relativa de la vulva, longitud del esófago, etc.) dibujadas en papel con la cámara clara.

Para la identificación específica de *Meloidogyne* spp., además de los caracteres mencionados anteriormente se estudiaron los juveniles de segunda edad (J<sub>2</sub>) y la morfología de los patrones perineales (altura del arco dorsal, presencia de campos laterales, forma y grosor de las estrías, etc.) (Hartman y Sasser, 1985; Jepson, 1987). Los nematodos identificados fueron clasificados de acuerdo con los criterios establecidos por Maggenti (1991).

Una vez realizada la identificación se completó el recuento del número de ejemplares de cada especie presente en cada una de las muestras. Los datos se sometieron a un análisis estadístico descriptivo que incluyó cálculo de la media, desviación estándar y el rango para cada especie por provincia y cultivar. La incidencia o frecuencia absoluta (Margalef, 1974) se calculó mediante la fórmula:

$$I_x (\%) = (N_x / N) \times 100;$$

Donde I<sub>x</sub> = incidencia de la especie "x" en la muestra; N<sub>x</sub> = número de muestras donde estaba presente la especie "x" y N = número de muestras totales

Asimismo, con objeto de discriminar grupos homogéneos en cuanto a la conformación de las comunidades fitonematológicas, se calculó el índice de similaridad entre las poblaciones correspondientes a cada combinación de provincia, vivero y cultivar. La similaridad entre viveros se calculó aplicando el índice de Jaccard (1908), basado en la comparación de matrices de presencia-ausencia de cada especie en cada vivero:

$$IS_j = c / (a + b + c);$$

Donde  $IS_j$  = índice de similaridad de Jaccard entre el área "a" y el área "b"; a = número de especies presentes sólo en el área "a"; b = número de especies presentes sólo en el área "b"; y c = número de especies comunes a ambas áreas.

Con los índices de similaridad obtenidos se realizó un análisis de agrupación jerárquica según el método secuencial, aglomerativo, jerárquico y anidado (SAHN) (Sneath y Sokal, 1973) mediante el programa estadístico NTSYS Applied Biostatistics, Inc. V-1.8. La representación gráfica de los agrupamientos se realizó mediante un dendrograma (Rohlf, 1975).

### **2.2.3. ESTUDIOS DE LAS ALTERACIONES HISTOLÓGICAS PROVOCADAS POR *MELOIDOGYNE* SPP. EN RAÍCES**

Con objeto de estudiar las alteraciones histológicas causadas por el parasitismo de *Meloidogyne* spp. se seleccionaron raíces noduladas provenientes de plantones naturalmente infectados de los cvs. Arbequina, Cornicabra, Hojiblanca, Manzanilla, y Picual. Las raíces se lavaron suavemente las raíces a fin de eliminar el suelo y los residuos adheridos, y se seleccionaron porciones de aspecto sano y porciones noduladas de cada combinación nematodo-planta huésped.

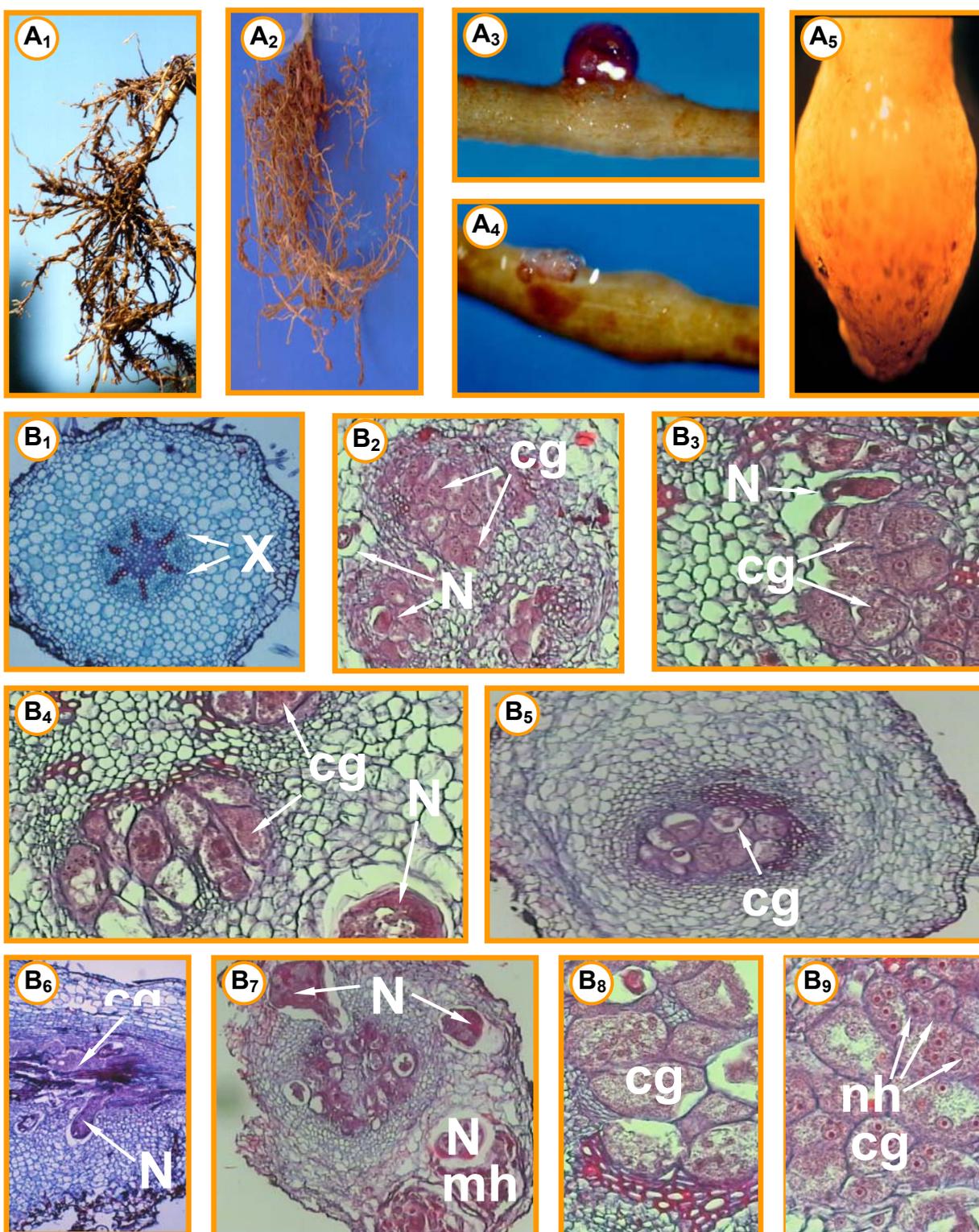
Los tejidos correspondientes a los trozos nodulados y no nodulados se fijaron en FAE (formaldehído : ácido acético : etanol 60 % = 2:1:17 v/v/v) durante un mínimo de 48 h., deshidratados en una serie consecutiva de concentración progresivamente creciente de soluciones de alcohol butírico terciario (40-70-85-90-100 %) y posteriormente se incluyeron en parafina. Los trozos de raíz incluidos en parafina se sometieron a cortes longitudinales y transversales con un micrótopo rotativo en secciones de 10-12  $\mu\text{m}$  de espesor. Las secciones cortadas se depositaron sobre portaobjetos y se tiñeron con ácido tánico, cloruro de hierro, safranina y colorante verde rápido y prolongado (fast-green) (modificado de Jensen, 1962). Posteriormente, se procedió a su montaje permanente y su observación con microscopio óptico. Las imágenes fueron recogidas y almacenadas en formato digital con un sistema de procesamiento de imagen Leica QW5001.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. SINTOMATOLOGÍA Y ALTERACIONES ANATÓMICAS E HISTOLÓGICAS

En ninguno de los plántones de olivo muestreados en los viveros comerciales de Andalucía (Córdoba, Jaén y Sevilla) se observaron síntomas aéreos que pudieran indicar posibles infecciones por nematodos fitoparásitos. Esta situación se confirmó tanto en plantas no infectadas como en aquéllas en las que posteriormente se diagnosticaron infecciones por nematodos fitoparásitos. Sin embargo, el examen de los sistemas radicales de todos los plántones de olivo reveló en algunos de ellos la existencia de determinados nódulos de morfología y tamaño variables, distribuidos de forma aislada o en grupos y rodeando por completo el perímetro de la raíz, en todos los cultivares estudiados. Los nódulos inducidos por *Meloidogyne* spp. presentaron forma y localización variadas pero habitualmente apical (Fig. 2.5). Sin embargo, también pudo observarse la presencia de nódulos irregulares de gran tamaño a lo largo del eje radical. El estudio de dichos nódulos mediante disección directa de la raíz reveló la infección de una a ocho hembras adultas de *Meloidogyne* spp. por nódulo radical, como ocurrió, por ejemplo en el caso de plántones de 'Cornicabra' infectados por *M. arenaria* (Neal) Chitwood. En ocasiones aisladas se halló una masa de huevos en la superficie radical, pero en la mayoría de los casos las masas se encontraban en el interior de los tejidos corticales de la raíz (Fig. 2.5).

El estudio histopatológico de dichos nódulos permitió conocer las alteraciones causadas en el tejido radical como consecuencia de la infección por dichos nematodos en olivo. El estudio comparativo de raíces sanas y raíces infectadas mostró alteraciones celulares en los tejidos de la corteza, la endodermis, el periciclo y el parénquima vascular inducidas por *Meloidogyne* spp. En los sitios permanentes de alimentación el nematodo indujo la formación de células gigantes multinucleadas en la estela, cerca de los tejidos vasculares, en todas las combinaciones cultivar-especie de nematodo nodulador estudiadas. La formación de estas estructuras condujo a distorsión y destrucciones parciales de los haces vasculares. Las células gigantes mostraron un citoplasma denso y un número variable (3-10) de núcleos hipertrofiados y nucleolos. Del mismo modo, se observó que la hiperplasia de los tejidos adyacentes a las células gigantes contribuyó a la formación de la nodulación (Fig. 2.5).



**Fig 2.5.:** Alteraciones anatómicas e histológicas causadas por *Meloidogyne* spp. en plantones de olivo de vivero. **A) Alteraciones morfológicas en raíz.** A<sub>1</sub>,A<sub>2</sub>) Vistas de aparatos radicales completos mostrando nodulaciones severas A<sub>3</sub>,A<sub>4</sub>) Detalles de nódulos mediales y masas de huevos A<sub>5</sub>) Nódulo apical. **B) Alteraciones histológicas** B<sub>1</sub>) Sección transversal de una raicilla sana de olivo: los haces sistémicos de la estela se encuentran separados por regiones de parénquima vascular formado por células pequeñas y regulares B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>) Secciones transversales de raíces de plantones de olivo (cv. Picual) infectados por *M. incognita* y *M. javanica* respectivamente; la alimentación por parte de la hembra del nematodo (N) ha estimulado la formación de células gigantes (cg) y ha colapsado el parénquima vascular B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>) Secciones transversales de raíces de plantones de olivo (cv. Arbequina) infectados por *M. incognita* y *M. javanica* respectivamente; obsérvese la presencia de parénquima vascular formado por células gigantes en la estela B<sub>6</sub>) Sección transversal de una raíces de un plantón de olivo (cv. Hojiblanca) infectado por *M. javanica*; obsérvense las células gigantes (cg) adyacentes a los tejidos vasculares y una hembra madura de nematodo (N) y células gigantes en la estela B<sub>7</sub>) Sección transversal de una raíces de un plantón de olivo (cv. Cornicabra) infectado por *M. arenaria*; hembras maduras de nematodos (N) han depositado masas de huevo (mh) dentro de la corteza de la raíz B<sub>8</sub>) Sección transversal de una raíces de un plantón de olivo (cv. Manzanilla) infectado por *M. javanica*; la formación de grandes células multinucleadas (cg) distorsiona y deforma el tejido xilemático B<sub>9</sub>) Sección transversal de una raíces de un plantón de olivo (cv. Hojiblanca) infectado por *M. incognita*; obsérvense células gigantes (cg) con el característico citoplasma denso y numerosos núcleos hipertrofiados (nh).



## 2.3.2 EVALUACIÓN GLOBAL DE LAS POBLACIONES DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS

### 2.3.2.1. *Especies identificadas*

Considerando la totalidad de las muestras analizadas, en las prospecciones realizadas se aislaron e identificaron 37 especies de nematodos fitoparásitos. En las Tablas 2.6, 2.7 y 2.8 se expone la relación de especies de nematodos fitoparásitos identificadas en viveros de olivo, agrupadas según los grupos tróficos a que pertenecen.

**Tabla 2.6.** Nematodos **ectoparásitos migratorios** aislados e identificados en la prospección de viveros de comerciales de olivo de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla.

**Phyllum:** Nemata

**Clase:** Adenophorea

**Subclase** Enoplia

**Superorden** Terrenoplica

**Orden:** Dorylaimida

**Suborden:** Dorylaimina

**Superfamilia:** Dorylaimoidea

**Familia:** Longidoridae

**Subfamilia:** Longidorinae

*Longidorus* sp.

**Subfamilia:** Xiphinematinae

*Xiphinema pachtaicum* (Tulaganov) Kirjanova

**Suborden:** Diphterophodrina

**Superfamilia:** Belondiroidea

**Familia:** Trichodoridae

**Subfamilia:** Trichodorinae

*Paratrichodorus minor* (Colbran) Siddiqi

*Paratrichodorus teres* (Hooper) Siddiqi

*Trichodorus giennensis* Decraemer, Roca, Castillo, Peña Santiago y Gómez Barcina

**Clase:** Secernentea

**Subclase:** Diplogasteria

**Orden:** Tylenchida

**Suborden:** Tylenchina

**Superfamilia:** Tylenchoidea

**Familia:** Belonolaimidae

**Subfamilia:** Telotylenchinae

*Amplimerlinius paraglobigerus* Castillo, Siddiqi y Gómez Barcina

*Merlinius brevidens* (Allen) SiddiqiMerlinius microdorus (Geraert) Siddiqi

*Tylenchorhynchus aduncus* de Guiran

*Tylenchorhynchus clarus* Allen

**Subfamilia:** Telotylenchinae

*Tylenchorhynchus dubius* (Bütschli) Filipjev

*Tylenchorhynchus huesingi* Paetzold

*Tylenchorhynchus mamillatus* Tobar-Jiménez

*Tylenchorhynchus* sp.

**Familia** Hoplolaimidae

**Subfamilia:** Hoplolaiminae

*Helicotylenchus digonicus* Perry, in Perry, Darling y Thorne

*Helicotylenchus dihystra* (Cobb) Sher

*Helicotylenchus pseudorobustus* (Steiner) Golden

*Helicotylenchus vulgaris* Yuen

*Rotylenchus* sp.

**Tabla 2.6 (continuación)** Nematodos **ectoparásitos migratorios** aislados e identificados en la prospección de viveros de comerciales de olivo de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla.

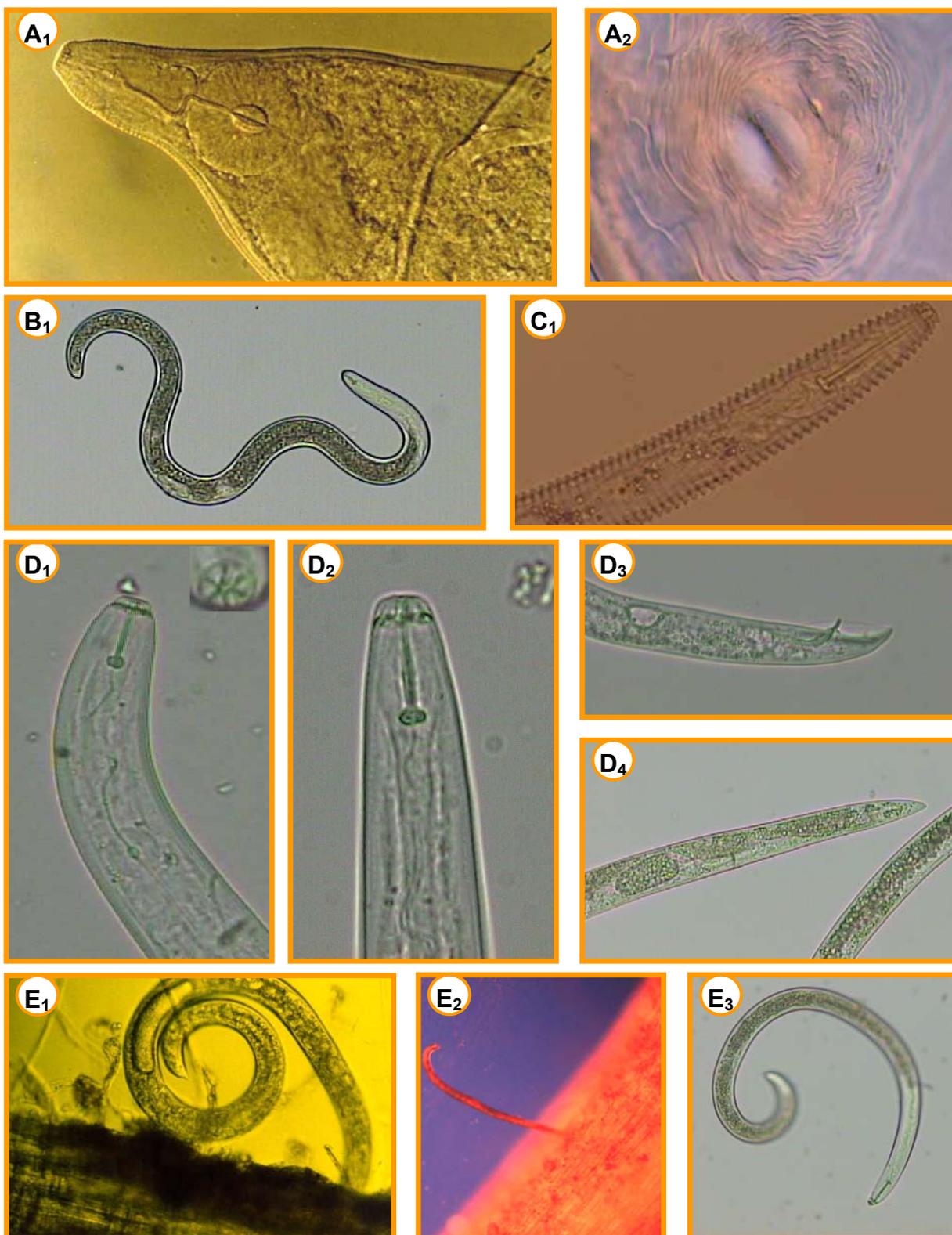
**Clase:** Secernentea  
**Subclase:** Diplogasteria  
**Orden:** Tylenchida  
**Suborden:** Tylenchina  
**Superfamilia:** Criconematoidea  
**Familia:** Criconematidae  
**Subfamilia:** Criconematinae  
*Criconemella xenoplax* (Raski) Luc y Raski  
*Criconemoides informis* (Micoletzky) Taylor  
**Subfamilia:** Hemicyclophorinae  
*Hemicyclophora* sp.  
**Familia:** Tylenchulidae  
**Subfamilia:** Paratylenchinae  
*Paratylenchus arcuatus* Luc y de Guiran  
*Paratylenchus microdorus* Andrásy

**Tabla 2.7.** Nematodos **endoparásitos migratorios** aislados e identificados en la prospección de viveros comerciales de olivo de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla.

**Phyllum:** Nemata  
**Clase:** Secernentea  
**Subclase:** Diplogasteria  
**Orden:** Tylenchida  
**Suborden:** Tylenchina  
**Superfamilia:** Tylenchoidea  
**Familia:** Pratylenchidae  
**Subfamilia:** Pratylenchinae  
*Pratylenchoides ritteri* Sher  
*Pratylenchus fallax* Seinhorst  
*Pratylenchus neglectus* (Rensch) Filipjev y Schuurmans Steekhoven  
*Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filipjev y Schuurmans Steekhoven  
*Pratylenchus thornei* Sher y Allen  
*Pratylenchus vulnus* Allen y Jensen  
*Zygotylenchus guevarai* (Tobar Jiménez) Braun y Loof

**Tabla 2.8.** Nematodos **endoparásitos sedentarios** aislados e identificados en la prospección de viveros de comerciales de olivo de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla.

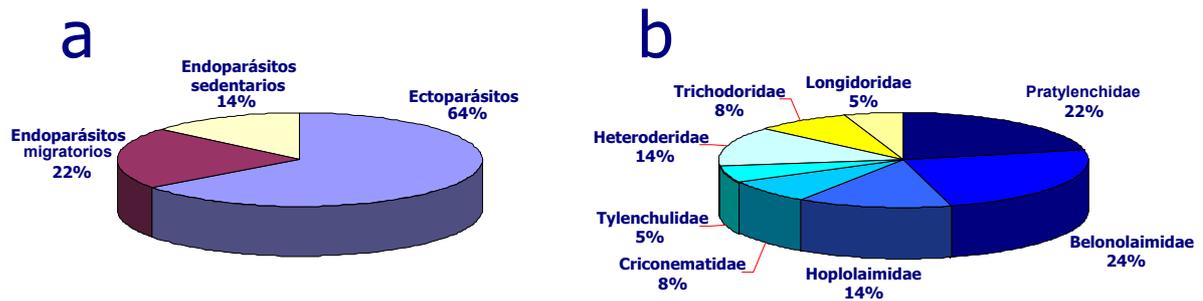
**Phyllum:** Nemata  
**Clase:** Secernentea  
**Subclase:** Diplogasteria  
**Orden:** Tylenchida  
**Suborden:** Tylenchina  
**Superfamilia:** Tylenchoidea  
**Familia:** Heteroderidae  
**Subfamilia:** Heteroderinae  
*Heterodera avenae* Wollenweber  
**Subfamilia:** Meloidogyninae  
*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood  
*Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood  
*Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood  
*Meloidogyne lusitanica* Abrantes y Santos



**Fig 2.6.:** Nematodos fitoparásitos del olivo hallados en la prospección de viveros. **A) *Meloidogyne* spp.** A<sub>1</sub>) Detalle de la región anterior de una hembra de *M. javanica*, A<sub>2</sub>) Patrón perineal de *M. incognita* **B) *Zygotylenchus* spp.** B<sub>1</sub>) Vista de una hembra de *Z. guevarai* **C) *Criconemella* spp.** C<sub>1</sub>) Detalle de la región anterior de *C. xenoplax* **D) *Pratylenchus* spp.** D<sub>1</sub>) y D<sub>2</sub>) Detalles de la región anterior de *P. vulnus* D<sub>3</sub>) Región posterior de un macho de *P. vulnus* D<sub>4</sub>) Región posterior de una hembra de *P. vulnus* **E) *Helicotylenchus* spp.** E<sub>1</sub>) Hembra de *H. pseudorobustus* alimentándose ectoparasíticamente sobre una raicilla de olivo E<sub>2</sub>) Ejemplar adulto de *H. vulgaris* alimentándose ectoparasíticamente sobre una raicilla de olivo E<sub>3</sub>) Vista de una hembra de *H. vulgaris*.



El grupo de los nematodos ectoparásitos migratorios, con 24 especies, domina ampliamente el conjunto de especies diagnosticadas, seguido por el de los endoparásitos migratorios, con ocho especies, y los endoparásitos sedentarios, con cinco especies (Fig. 2.7). La mayoría de las especies pertenecen al Orden Tylenchida, y dentro del mismo predominan los representantes de la superfamilia Tylenchoidea, la única que presenta especies dentro de los tres grupos tróficos mencionados. Solo cinco de las especies identificadas se clasifican dentro del orden Dorylaimida. En total están representadas ocho familias en la lista de las especies, siendo Belonolaimidae la más abundante (Fig. 2.7).



**Fig. 2.7.** Proporción de nematodos fitoparásitos encontrados en viveros de olivo en Andalucía pertenecientes a los tres grupos tróficos identificados (a) y familias a las que corresponden (b).

### **2.3.2.2. Incidencia y abundancia de las diferentes especies en la muestra total**

Aunque con frecuencia variable, las 37 especies identificadas estuvieron presentes en el suelo de muestreo y, en todos los casos, las especies que se extrajeron de muestras de raíz siempre se encontraron en las correspondientes muestras de suelo. Por este motivo, la incidencia en el suelo puede considerarse representativa de la incidencia general.

*M. brevidens*, presente en el 60,9 % de los plantones muestreados, fue la especie aislada con mayor frecuencia (Tabla 2.9). A continuación se encuentran *C. xenoplax*, *T. clarus*, ambas con una incidencia del 38,7 %, *H. pseudorobustus* (33,7 %) y *P. penetrans* (31,8 %). Las especies con menor incidencia en la prospección fueron *M. lusitanica* (0,38 %), *P. ritteri* (0,8 %), *C. informis* y *T. giennensis* (ambas con 1,2 %). Asimismo, el número medio de nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo varió entre un máximo de 1.205,2 (*M. lusitanica*) y un mínimo de 6,2 (*Hemicyclophora* sp.).

En las muestras de raíz se aislaron 15 especies de nematodos fitoparásitos. *P. penetrans*, que se halló infectando el 21,84 % de los sistemas radicales estudiados, fue la más frecuente. En el otro extremo, las especies con incidencia más baja fueron *M. lusitanica* y *H. vulgaris*. Ambas infectaron tan solo el 0,38 % de los sistemas radicales. El número medio de

nematodos/g raíz varió entre un máximo de 2.856 (*M. lusitanica*) y un mínimo de 0,5 (*P. thornei*).

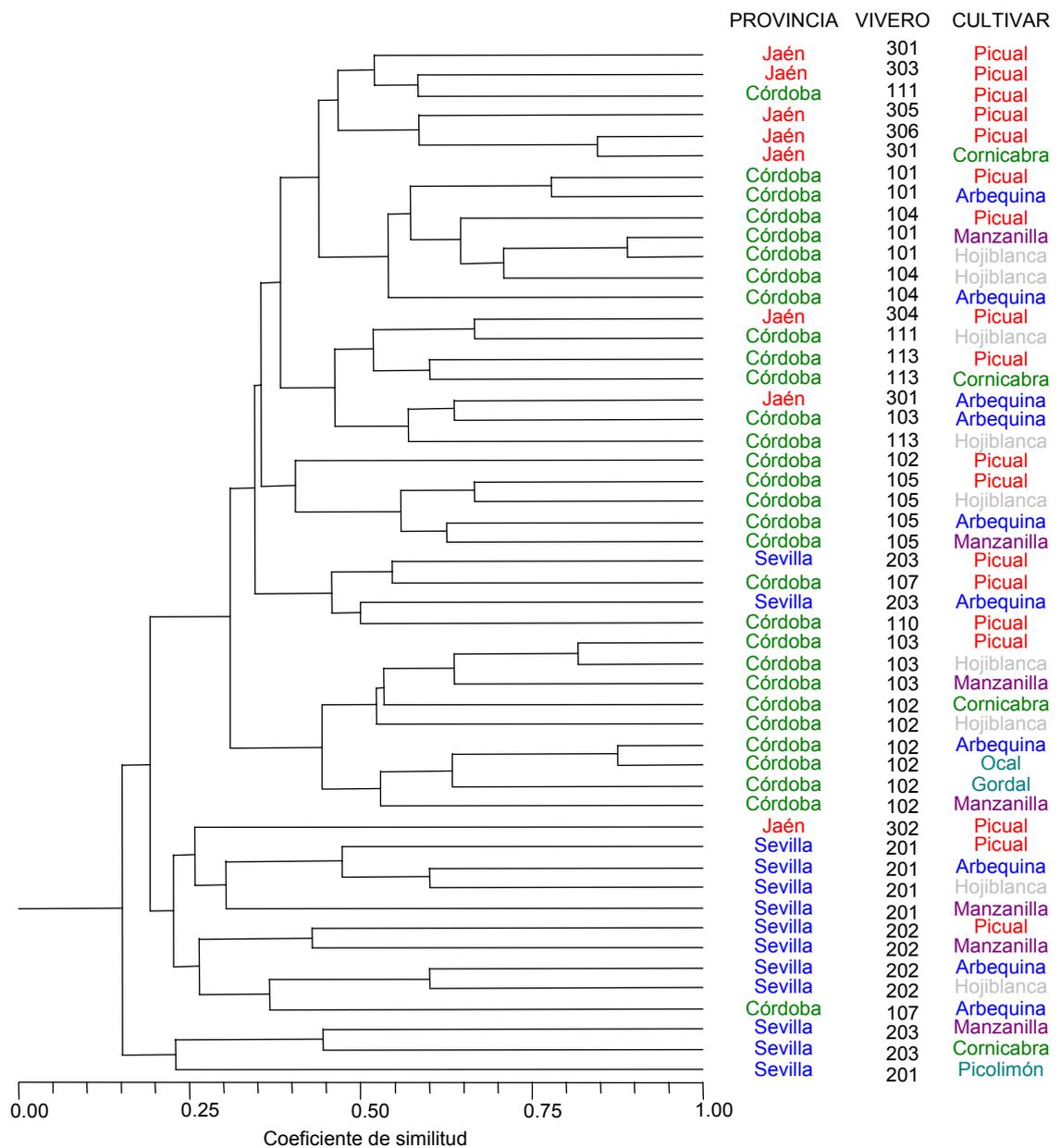
**Tabla 2.9.** Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plántulas de olivo en viveros en Andalucía<sup>a</sup>

Especie	Incidencia en el suelo <sup>b</sup> (%)	Nº Nematodos/100 cm <sup>3</sup> suelo		Incidencia en raíz <sup>b</sup> (%)	Nº Nematodos/g raíz	
		Media ± DE <sup>c</sup>	Rango <sup>d</sup>		Media ± DE <sup>c</sup>	Rango <sup>d</sup>
<i>Merlinius brevidens</i>	61,4	34,5 ± 2,3	10-189	0 <sup>e</sup>	0	- <sup>f</sup>
<i>Criconemella xenoplax</i>	39,0	396,5 ± 84,3	8-5.160	8,5	9,2 ± 3,2	0,5-54,6
<i>Tylenchorhynchus clarus</i>	39,0	79,1 ± 7,8	12-467	0	0	-
<i>Helicotylenchus pseudorobustus</i>	34,0	59,0 ± 6,2	8-352	0	0	-
<i>Pratylenchus penetrans</i>	32,1	93,6 ± 11,6	13-618	22,0	11,5 ± 2,4	0,5-92,6
<i>Paratylenchus microdorus</i>	27,4	70,5 ± 25,5	11-1.764	1,9	2,6 ± 1,6	0,5-9,0
<i>Pratylenchus vulnus</i>	25,5	66,3 ± 6,6	12-288	17,4	10,3 ± 3,0	0,5-100,6
<i>Pratylenchus thornei</i>	22,8	36,7 ± 4,8	8-184	6,2	5,7 ± 2,2	0,2-25,9
<i>Paratrichodorus teres</i>	20,1	47,7 ± 5,6	6-168	0	0	-
<i>Meloidogyne incognita</i>	14,7	248,0 ± 78,2	13-2.254	7,0	1.367,2 ± 642,0	2,0-1.1.681,0
<i>Paratylenchus arcuatus</i>	13,5	240,3 ± 73,8	7-1.932	2,7	47,9 ± 24,2	4,6-148,6
<i>Helicotylenchus digonicus</i>	13,1	100,6 ± 35,8	10-1.046	0	0	-
<i>Tylenchorhynchus dubius</i>	12,7	94,8 ± 23,6	8-704	0	0	-
<i>Tylenchorhynchus sp.</i>	12,0	87,3 ± 19,7	6-464	0	0	-
<i>Meloidogyne javanica</i>	11,2	191,6 ± 29,7	37-676	9,3	708,5 ± 181,7	2,5-3.124,4
<i>Paratrichodorus minor</i>	7,3	37,2 ± 7,5	9-123	0	0	-
<i>Tylenchorhynchus huesingii</i>	5,8	110,1 ± 25,2	13-339	0	0	-
<i>Xiphinema pachtaicum</i>	5,4	11,8 ± 3,1	2-45	0	0	-
<i>Tylenchorhynchus aduncus</i>	4,6	69,4 ± 31,9	12-414	0	0	-
<i>Pratylenchus neglectus</i>	4,2	104,8 ± 14,5	42-186	3,9	8,4 ± 2,8	0,5-24,0
<i>Helicotylenchus vulgaris</i>	3,9	154,1 ± 134,5	11-1.364	0,4	1,4	-
<i>Zygotylenchus guevarai</i>	3,9	21,9 ± 3,4	13-49	1,5	4,5 ± 1,9	0,19-7,86
<i>Merlinius microdorus</i>	3,5	74,8 ± 21,6	17-189	0	0	-
<i>Tylenchorhynchus mamillatus</i>	3,5	57,0 ± 13,7	30-138	0	0	-
<i>Meloidogyne arenaria</i>	2,7	1.205,2 ± 1.062,7	68-6.515	1,5	661,9 ± 519,3	30,5-2.200,0
<i>Pratylenchus fallax</i>	2,7	86,7 ± 19,9	35-168	1,5	1,5 ± 0,5	0,5-2,6
<i>Amplimerlinius paraglobigerus</i>	1,9	22,2 ± 6,2	10-42	0	0	-
<i>Longidorus sp.</i>	1,9	6,2 ± 1,2	4-11	0	0	-
<i>Heterodera avenae</i>	1,5	64,5 ± 49,0	6-211	0	0	-
<i>Criconemoides informis</i>	1,2	21,3 ± 5,5	12-31	0	0	-
<i>Helicotylenchus dihystra</i>	1,2	779,0 ± 668,7	79-2.116	0	0	-
<i>Hemicycliophora sp.</i>	1,2	7,0 ± 2,5	4-12	0	0	-
<i>Trichodorus giennensis</i>	1,2	28,3 ± 19,3	8-67	0	0	-
<i>Pratylenchoides ritteri</i>	0,8	14,5 ± 6,5	8-21	0	0	-
<i>Meloidogyne lusitanica</i>	0,4	643,0	-	0,4	2.856,0	-
<i>Rotylenchus sp.</i>	0,4	8,0	-	0	0	-

<sup>a</sup>Datos correspondientes a una prospección realizada entre los meses de junio de 1996 y mayo de 1998 sobre 150 muestras recogidas en nueve viveros de la provincia de Córdoba, 64 muestras recogidas en tres viveros de la provincia de Sevilla y 47 muestras recogidas en tres viveros de la provincia de Jaén. <sup>b</sup>Incidencia = porcentaje de muestras de suelo en las cuales fue hallada la especie del nematodo. <sup>c</sup>Media ± DE = media aritmética ± desviación estándar del número de nematodos de la especie presentes la alícuota considerada. <sup>d</sup>Valores máximo y mínimo, respectivamente, registrados en la muestra. <sup>e</sup>Indica ausencia de la especie en la muestra de raíz. <sup>f</sup>Dato no consignado

### 2.3.2.3. Análisis de la similitud entre los viveros estudiados

El análisis de la similitud entre los diferentes viveros estudiados, basado en la distribución de nematodos fitoparásitos identificados, muestra un dendrograma en el que se agrupan los viveros en función de la provincia a la que pertenecen, independientemente del genotipo de olivo que se considere (Fig. 2.8). El grupo más homogéneo y con mayor similitud (47%) está formado por cinco de los ocho viveros de la provincia de Jaén, junto con el vivero 111 de Córdoba correspondiente a las muestras de 'Picual'.



**Fig. 2.8.** Agrupación de los viveros estudiados en función de la similitud (índice de similitud de Jaccard) de los nematodos fitoparásitos identificados en cada uno de ellos.

### 2.3.3. ANÁLISIS DISCRIMINADO POR PROVINCIAS

#### 2.3.3.1. Provincia de Córdoba

Treinta especies de nematodos fitoparásitos fueron halladas en las muestras correspondientes a la provincia de Córdoba (Tabla 2.10). De forma similar a lo que se comprobó en las estadísticas globales, los datos muestran que *M. brevidens*, con una incidencia del 62 %, fue la especie presente en un mayor número de muestras, seguida por *C. xenoplax* y *T. clarus*, ambas con una incidencia del 52 %.

**Tabla 2.10.** Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plántulas de olivo en viveros de la provincia de Córdoba<sup>a</sup>

Especie	Incidencia en el suelo <sup>b</sup> (%)	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo		Incidencia en raíz <sup>b</sup> (%)	Nematodos/ g raíz	
		Media ± DE <sup>c</sup>	Rango <sup>d</sup>		Media ± DE <sup>c</sup>	Rango <sup>d</sup>
<i>Merlinius brevidens</i>	62,0	33,5 ± 25,2	10-134	0,7	1,2	- <sup>e</sup>
<i>Criconemella xenoplax</i>	52,0	437,6 ± 867,8	13-5.160	12,7	10,2 ± 15,7	0,5-54,6
<i>Tylenchorhynchus clarus</i>	52,0	91,5 ± 85,2	12-467	0 <sup>f</sup>	-	-
<i>Helicotylenchus pseudorobustus</i>	39,3	58,2 ± 53,9	8-224	0	-	-
<i>Paratrichodorus teres</i>	31,3	50,4 ± 41,7	6-168	0	-	-
<i>Paratylenchus microdorus</i>	29,3	53,4 ± 84,4	13-560	3,3	2,6 ± 3,6	0,5-9,0
<i>Pratylenchus vulnus</i>	28,0	56,8 ± 43,9	12-182	14,7	10,7 ± 18,4	0,5-80,8
<i>Pratylenchus thornei</i>	24,0	37,4 ± 37,6	8-168	1,3	0,3 ± 0,0	0,3-0,3
<i>Meloidogyne incognita</i>	20,7	294,7 ± 510,8	18-2.254	10,0	1.639,6 ± 2.921,0	17,4-11.681
<i>Meloidogyne javanica</i>	19,3	191,6 ± 160,2	37-676	16,0	708,5 ± 899,0	2,5-3.124,4
<i>Pratylenchus penetrans</i>	18,7	56,6 ± 39,3	19-147	4,7	1,5 ± 1,5	0,5-4,8
<i>Paratrichodorus minor</i>	12,0	37,5 ± 33,6	9-123	0	-	-
<i>Helicotylenchus digonicus</i>	11,3	50,9 ± 61,1	10-260	0	-	-
<i>Tylenchorhynchus dubius</i>	10,7	119,1 ± 178,4	14-704	0	-	-
<i>Paratylenchus arculatus</i>	7,3	329,2 ± 585,1	31-1.932	3,3	63,1 ± 71,5	4,6-148,6
<i>Tylenchorhynchus mamillatus</i>	6,0	57,0 ± 41,0	30-138	0	-	-
<i>Tylenchorhynchus sp.</i>	6,0	39,7 ± 43,4	6-136	0	-	-
<i>Pratylenchus fallax</i>	4,7	86,7 ± 52,5	35-168	2,7	1,5 ± 0,9	0,5-2,6
<i>Xiphinema pachtaicum</i>	4,0	7,0 ± 4,9	3-16	0	-	-
<i>Longidorus sp.</i>	2,7	6,5 ± 3,1	4-11	0	-	-
<i>Hemicycliophora sp.</i>	2,0	7,0 ± 4,5	4-12	0	-	-
<i>Heterodera avenae</i>	2,0	77,7 ± 115,6	6-211	0	-	-
<i>Pratylenchus neglectus</i>	2,0	109,0 ± 58,4	69-176	2,0	3,8 ± 4,3	0,5-8,7
<i>Tylenchorhynchus aduncus</i>	2,0	52,0 ± 34,9	12-76	0	-	-
<i>Helicotylenchus vulgaris</i>	1,3	11,5 ± 0,7	11-12	0	-	-
<i>Amplimerlinius paraglobigerus</i>	0,7	16,0	-	0	-	-
<i>Meloidogyne lusitanica</i>	0,7	643,0	-	0,7	2.856,0	-
<i>Pratylenchoides ritteri</i>	0,7	8,0	-	0	-	-
<i>Rotylenchus sp.</i>	0,7	8,0	-	0	-	-
<i>Zygotylenchus guevarai</i>	0,7	49,0	-	0	-	-

<sup>a</sup>Datos correspondientes a una prospección realizada entre los meses de junio de 1996 y mayo de 1998 sobre 150 muestras recogidas en nueve viveros de la provincia de Córdoba. <sup>b</sup>Incidencia = porcentaje de muestras de suelo en las cuales fue hallada la especie del nematodo <sup>c</sup>Media ± DE = media aritmética ± desviación estándar del número de nematodos de la especie presentes la alícuota considerada <sup>d</sup>Valores máximo y mínimo, respectivamente, registrados en la muestra. <sup>e</sup>Dato no consignado <sup>f</sup>Indica ausencia de la especie en la muestra de raíz.

*A. paraglobigerus*, *M. lusitanica*, *P. ritteri*, *Rotylenchus sp.* y *Z. guevarai*, estuvieron

**Tabla 2.11.** Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plántulas de olivo en viveros muestreados en la provincia de Córdoba discriminados según los diferentes cultivares<sup>a</sup>.

Especie	PICUAL			ARBEQUINA			HOJIBLANCA			MANZANILLA			CORNICABRA			GORDAL			OCAL		
	Inci- dencia <sup>b</sup>	Media ± DE (nn/cc suelo) <sup>c</sup>	Media ± DE (nn/gr raíz) <sup>d</sup>	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)
<i>Amplimerlinius paraglobigerus</i>	2,0	16,0	0	- <sup>e</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Criconebella xenoplax</i>	52,9	618,1 ± 240,8	9,0 ± 5,2	56,4	418,5 ± 138,6	6,9 ± 4,1	36,7	255,2 ± 160,1	0	66,7	472,5 ± 192	23,3 ± 15,9	33,3	58,7 ± 16,7	0	66,7	87,0 ± 1,0	0	100	118,0 ± 40,9	0
<i>Helicotylenchus digonicus</i>	13,7	72,4 ± 33,9	0	7,7	28,3 ± 6,8	0	6,7	37,5 ± 3,5	0	6,7	17	0	11,1	105,00	0	33,3	32,0	0	66,7	22,5 ± 1,5	0
<i>Helicotylenchus pseudorobustus</i>	35,3	40,5 ± 9,1	0	46,2	46,3 ± 11,5	0	40,0	91,5 ± 15,4	0	46,7	89,1 ± 31,6	0	44,4	37,5 ± 1,9	0	-	-	-	-	-	-
<i>Helicotylenchus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,2	11,50 ± 0,50	0	-	-	-	-	-	-
<i>Hemicycliophora</i> sp.	-	-	-	2,6	4,0	0	6,7	8,5 ± 3,5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Heterodera avenae</i>	2,0	6,0	0	2,6	16,0	0	3,3	211,00	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Longidorus</i> sp.	2,0	4,0	0	5,1	8,0 ± 3,0	0	3,3	6,00	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Meloidogyne incognita</i>	23,5	370,5 ± 198,0	4.297 ± 3692,7	18,0	142,7 ± 40,2	1.283 ± 584,1	23,3	392,7 ± 228,4	1.744,1 ± 312,7	33,3	188,4 ± 43,6	359,2 ± 168,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Meloidogyne javanica</i>	11,8	196,5 ± 57,2	469,3 ± 281,5	15,4	199,0 ± 50,9	421,0 ± 101,4	16,7	174,0 ± 77,0	89,2,4 ± 840,6	40,0	163,3 ± 68,7	1461,6 ± 643,1	22,2	467,5 ± 208,5	1.549,1 ± 478,0	33,3	102,0	243,3	100	98,3 ± 16,8	72,2 ± 22,7
<i>Meloidogyne lusitanica</i>	2,0	643,0	2856	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Merlinius brevidens</i>	68,6	30,6 ± 4,5	0	56,4	30,2 ± 4,1	0	53,3	41,9 ± 7,4	0	60,0	35,2 ± 9,4	0	88,9	35,6 ± 7,3	0	33,3	12,0	0	66,7	49,0 ± 27,0	0
<i>Paratrichodorus minor</i>	3,9	31,5 ± 10,5	0	23,1	23,3 ± 6,4	0	10,0	89,7 ± 27,1	0	26,7	33,3 ± 11,4	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paratrichodorus teres</i>	23,5	38,3 ± 12,2	0	38,5	62,3 ± 13,8	0	23,3	39,9 ± 10,9	0	53,3	57,1 ± 9,5	0	33,3	50,0 ± 20,7	0	33,3	6,0	0	33,3	80,0	0
<i>Paratylenchus arcuatus</i>	17,7	388,1 ± 212,4	63,1 ± 31,9	5,1	64,0 ± 33,0	0	-	-	-	40,0	37,7 ± 11,0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paratylenchus microdorus</i>	23,5	31,3 ± 5,9	0	30,8	84,9 ± 44,4	9,0	43,3	54,3 ± 10,6	1,0 ± 0,3	-	-	-	11,1	23,0	0	-	-	-	-	-	-
<i>Pratylenchoides ritteri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,1	8,0	0	-	-	-	-	-	-
<i>Pratylenchus fallax</i>	11,8	73,2 ± 17,2	1,4 ± 0,6	-	-	-	3,3	168	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pratylenchus neglectus</i>	-	-	-	-	-	-	10,0	109,0 ± 33,7	3,8 ± 2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pratylenchus penetrans</i>	31,4	53,4 ± 8,5	1,5 ± 0,7	20,5	41,5 ± 12,3	2,1	-	-	-	-	-	-	44,4	99,5 ± 23,2	0	-	-	-	-	-	-
<i>Pratylenchus thornei</i>	27,5	24,5 ± 3,2	0	12,8	31,8 ± 6,1	0,3	33,3	60,2 ± 18,4	0,3	13,3	18	0	55,6	41,2 ± 20,0	0	-	-	-	-	-	-
<i>Pratylenchus vulnus</i>	11,8	31,5 ± 8,1	2,3 ± 0,4	28,2	77,0 ± 12,1	12,1 ± 4,6	36,7	31,6 ± 9,4	2,2 ± 0,5	40,0	92,3 ± 23,4	25,6 ± 14,8	33,3	54,3 ± 35,9	0	100	36,7 ± 6,4	2,3 ± 0,9	66,7	88,0 ± 21,00	2,1 ± 1,6
<i>Rotylenchus</i> sp.	-	-	-	2,6	8,0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tylenchorhynchus aduncus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	52,0 ± 20,1	0	-	-	-
<i>Tylenchorhynchus clarus</i>	56,9	79,7 ± 10,3	0	30,8	67,7 ± 14,7	0	76,7	79,2 ± 15,1	0	53,3	58,9 ± 11,3	0	66,7	287,2 ± 47,7	0	-	-	-	-	-	-
<i>Tylenchorhynchus dubius</i>	2,0	14,0	0	10,3	235,3 ± 156,7	0	10,0	216,0 ± 72,5	0	40,0	24,3 ± 2,8	0	-	-	-	-	-	-	66,7	78,0 ± 11,0	0
<i>Tylenchorhynchus mamillatus</i>	-	-	-	23,1	57,0 ± 13,7	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tylenchorhynchus</i> sp.	3,9	33,5 ± 12,5	0	15,4	25,7 ± 11,8	0	-	-	-	6,7	136	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xiphinema pachtaicum</i>	-	-	-	5,1	10,5 ± 5,5	0	3,3	3,00	0	-	-	-	11,1	3,0	0	66,7	7,5 ± 0,5	0	-	-	-
<i>Zygotylenchus guevarai</i>	-	-	-	-	-	-	3,3	49,0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Datos correspondientes a una prospección realizada entre los meses de junio de 1996 y mayo de 1998 sobre 64 muestras recogidas en tres viveros de la provincia de Sevilla

<sup>b</sup>Incidencia = porcentaje de muestras de suelo en las cuales fue hallada la especie del nematodo

<sup>c</sup>Media ± DE (nn/cm<sup>3</sup> suelo) = media aritmética ± desvío estándar del número de nematodos de la especie presentes en 1 cm<sup>3</sup> de suelo

<sup>d</sup>Media ± DE (nn/gr raíz) = media aritmética ± desvío estándar del número de nematodos de la especie presentes en 1 gramo de raíz

<sup>e</sup>Indica ausencia de la especie en la muestra



presentes en una sola de todas las muestras de suelo evaluadas, con una incidencia del 0,7 % y constituyéndose, por tanto, en las especies menos frecuentes. La especie más abundante entre las muestras de suelo de los viveros de la provincia de Córdoba fue *M. lusitanica*, con una media de 643 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo. Le siguieron *C. xenoplax* y *P. arcuatus*, con unas medias de 436,6 y 329,2 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo, respectivamente. En el otro extremo, especies como *Longidorus* sp., con una abundancia de 6,5 nematodos por cada 100 cm<sup>3</sup> de suelo, y *X. pachtaicum* y *Hemicycliophora* sp., ambas con 7 nematodos/100 cm<sup>3</sup>, mostraron ser las más escasas entre las muestras de suelo de los viveros de la provincia.

Doce especies de nematodos fitoparásitos fueron aisladas de las muestras de raíz correspondientes a los viveros de la provincia de Córdoba. Entre estas especies se hallaron tres nematodos noduladores (*M. incognita*, *M. javanica* y *M. lusitanica*), cinco especies de nematodos lesionadores (*P. fallax*, *P. neglectus*, *P. penetrans*, *P. thornei* y *P. vulnus*) y cuatro nematodos ectoparásitos correspondientes a diferentes grupos (*M. brevidens*, *C. xenoplax*, *P. microdorus* y *P. arcuatus*). *M. javanica*, con una frecuencia del 16,0 %, fue la especie más frecuente, mientras que *M. lusitanica* y *M. brevidens*, ambas con una frecuencia del 0,7, fueron las especies menos habituales entre las muestras de raíz. Destacaron por su abundancia dos especies de nematodos noduladores: *M. lusitanica* y *M. incognita* que presentaron un número medio de nematodo por gramo de raíz de 2.856,0 y 1.639,6, respectivamente. Dos especies de nematodos lesionadores, *P. fallax* y *P. thornei*, se constituyeron, en cambio, en las especies menos abundantes, con unas medias de 1,5 y 0,3 nematodos por gramo de raíz, respectivamente.

El análisis de los datos correspondientes a los viveros de la provincia discriminado según cultivares mostró que de las 30 especies halladas en la muestra global tan solo cinco, *C. xenoplax*, *M. javanica*, *M. brevidens*, *P. teres* y *P. vulnus*, pudieron ser aisladas de todos los cultivares (Tabla 2.11). 'Arbequina', con 22 especies, fue el cultivar que presentó la mayor diversidad.

### **2.3.3.2. Provincia de Sevilla**

Veintiséis especies de nematodos fitoparásitos fueron encontradas en las muestras prospectadas en la provincia de Sevilla (Tabla 2.12). La especie más frecuente resultó ser *P. penetrans*, con una incidencia del 60,9 %, seguida por *M. brevidens* con una incidencia del 48,4 %. *C. informis*, *Longidorus* sp., *P. minor* y *P. ritteri*, todas con una incidencia del 1,6 %, fueron las especies menos frecuentes. De manera similar a lo que ocurrió en la provincia de

Córdoba, los nematodos noduladores destacaron por su abundancia. En efecto, la especie más abundante entre las muestras de suelo de los viveros de la provincia de Sevilla fue *M. arenaria*, con una media de 1.205,2 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo. Le siguió *H. dihystra*, con una media de 779,0 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo. Del mismo modo que ocurrió con las muestras de suelo de Córdoba *Longidorus* sp., con una abundancia media de 5,0 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo, resultó ser la especie menos frecuente.

**Tabla 2.12.** Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plantones de olivo en viveros de la provincia de Sevilla<sup>a</sup>

Especie	Incidencia en el suelo <sup>b</sup> (%)	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo		Incidencia en raíz <sup>b</sup> (%)	Nematodos/ g raíz	
		Media ± DE <sup>c</sup>	Rango <sup>d</sup>		Media ± DE <sup>c</sup>	Rango <sup>d</sup>
<i>Pratylenchus penetrans</i>	60,9	140,0 ± 136,4	15-618	56,3	15,5 ± 21,5	1,1-92,6
<i>Merlinius brevidens</i>	48,4	37,7 ± 38,9	10-189	0 <sup>e</sup>	- <sup>f</sup>	-
<i>Paratylenchus arcuatus</i>	37,5	199,8 ± 356,7	7-1.248	3,1	9,7 ± 2,7	7,8-11,6
<i>Tylenchorhynchus</i> sp.	32,8	111,3 ± 124,1	13-464	0	-	-
<i>Criconemella xenoplax</i>	25,0	353,1 ± 918,2	80-670	3,1	3,9 ± 4,0	1,1-6,8
<i>Pratylenchus vulnus</i>	18,8	85,4 ± 80,9	21-288	18,8	11,6 ± 28,2	1,0-100,6
<i>Tylenchorhynchus huesingi</i>	18,8	116,9 ± 108,8	13-339	0	-	-
<i>Pratylenchus thornei</i>	15,6	48,2 ± 50,8	12-184	11,0	9,4 ± 10,4	1,1-25,9
<i>Helicotylenchus digonicus</i>	12,5	280,6 ± 384,1	17-046	0	-	-
<i>Helicotylenchus pseudorobustus</i>	12,5	114,38 ± 108,4	31-352	0	-	-
<i>Helicotylenchus vulgaris</i>	12,5	189,8 ± 474,6	12-364	1,6	1,4	-
<i>Tylenchorhynchus aduncus</i>	12,5	77,3 ± 136,5	12-414	0	-	-
<i>Xiphinema pachtaicum</i>	12,5	15,4 ± 14,1	2-45	0	-	-
<i>Meloidogyne arenaria</i>	9,4	1.205,2 ± 2.603,1	68-515	6,3	661,9 ± 1.038,5	30,5-2.200,0
<i>Merlinius microdorus</i>	9,4	62,8 ± 60,2	17-164	0	-	-
<i>Paratrichodorus teres</i>	7,8	23 ± 16,3	8-42	0	-	-
<i>Helicotylenchus dihystra</i>	4,7	779,0 ± 1.158,3	79-116	0	-	-
<i>Paratylenchus microdorus</i>	4,7	13,3 ± 3,2	11-17	0	-	-
<i>Trichodorus giennensis</i>	4,7	28,3 ± 33,5	8-67	0	-	-
<i>Tylenchorhynchus clarus</i>	4,7	23,3 ± 15,5	12-41	0	-	-
<i>Tylenchorhynchus dubius</i>	4,7	18,0 ± 14,0	8-34	0	-	-
<i>Zygotylenchus guevarai</i>	3,1	18,0 ± 1,4	17-19	3,1	3,8 ± 5,1	0,2-7,4
<i>Criconemoides informis</i>	1,6	12,0	-	0	-	-
<i>Longidorus</i> sp.	1,6	5,0	-	0	-	-
<i>Paratrichodorus minor</i>	1,6	32,0	-	0	-	-
<i>Pratylenchoides ritteri</i>	1,6	21,0	-	0	-	-

<sup>a</sup>Datos correspondientes a una prospección realizada entre los meses de junio de 1996 y mayo de 1998 sobre 64 muestras recogidas en 3 viveros de la provincia de Sevilla. <sup>b</sup>Incidencia = porcentaje de muestras de suelo en las cuales fue hallada la especie del nematodo <sup>c</sup>Media ± DE = media aritmética ± desviación estándar del número de nematodos de la especie presentes la alícuota considerada <sup>d</sup>Valores máximo y mínimo, respectivamente, registrados en la muestra. <sup>e</sup>Indica ausencia de la especie en la muestra de raíz. <sup>f</sup>Dato no consignado

Ocho especies de nematodos fitoparásitos fueron aisladas de las muestras de raíz.

**Tabla 2.13.** Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plantones de olivo en viveros muestreados en la provincia de Sevilla discriminados según los diferentes cultivares<sup>a</sup>.

Especie	PICUAL			ARBEQUINA			MANZANILLA			HOJIBLANCA			CORNICABRA			PICOLIMÓN		
	Inci- dencia <sup>b</sup>	Media ± DE (nn/cc suelo) <sup>c</sup>	Media ± DE (nn/gr raíz) <sup>d</sup>	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)	Inci- dencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)
<i>Criconebella xenoplax</i>	5,6	8,0	0	33,3	877,5 ± 577,1	3,9 ± 2,8	33,3	19,3 ± 6,7	0	11,1	17,0	0	50,00	60,0 ± 34,7	0	100	102,0	0
<i>Criconemoides informis</i>	- <sup>e</sup>	-	-	-	-	-	8,3	12,0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helicotylenchus digonicus</i>	11,1	168,0 ± 58,0	0	22,22	39,6 ± 16,8	0	8,3	704,0	0	11,1	1046,0	0	-	-	-	-	-	-
<i>Helicotylenchus dihystra</i>	5,6	79,0	0				16,67	1.129,0 ± 987,0	0				-	-	-	-	-	-
<i>Helicotylenchus pseudorobustus</i>	5,6	69,0	0	27,77	92,6 ± 26,9	0	-	-	-	22,22	191,5 ± 160,5	0	-	-	-	-	-	-
<i>Helicotylenchus vulgaris</i>	16,67	22,7 ± 8,2	0	5,6	34,0	0	8,3	1364,0	1,4	-	-	-	33,3	19,0 ± 7,0	0	100	14,0	0
<i>Longidorus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	8,3	5,0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Meloidogyne arenaria</i>	5,6	68,0	0	5,6	160,0	30,5	8,3	68,0	0	-	-	-	50,00	2.311,7 ± 2102,7	872,4 ± 671,3	-	-	-
<i>Merlinius brevidens</i>	33,3	27,7 ± 4,3	0	83,3	37,3 ± 12,2	0	50,00	56,0 ± 17,8	0	44,44	27,3 ± 10,0	0	-	-	-	-	-	-
<i>Merlinius microdorus</i>	11,1	73,5 ± 35,5	0	-	-	-	-	-	-	11,1	31,0	0	50,00	66,3 ± 48,8	0	-	-	-
<i>Paratrichodorus minor</i>	5,6	32,0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paratrichodorus teres</i>	5,6	10,0	0	5,6	39,0	0				33,3	22,0 ± 10,3	0	-	-	-	-	-	-
<i>Paratylenchus arcuatus</i>	33,3	43,8 ± 12,4	0	38,88	364,7 ± 169,3	9,7 ± 1,9	25,00	23,3 ± 8,1	0	66,7	313,2 ± 195,1	0	33,3	14,5 ± 3,5	0	-	-	-
<i>Paratylenchus microdorus</i>	-	-	-	-	-	-	25,00	13,3 ± 1,86	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pratylenchoides ritteri</i>	-	-	-	5,6	21,0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pratylenchus penetrans</i>	66,7	173,9 ± 45,0	19,4 ± 7,9	61,1	98,5 ± 23,3	19,4 ± 9,0	75,00	123,8 ± 32,5	13,2 ± 3,5	77,77	167,7 ± 79,1	5,5 ± 3,1						
<i>Pratylenchus thornei</i>	11,1	34,5 ± 19,5	7,8 ± 6,6	5,6	184,0	25,9	16,67	22,0 ± 10,0	1,5	33,3	40,7 ± 14,8	19,3	16,7	37,0	1,1	100	26,0	1,9
<i>Pratylenchus vulnus</i>	33,3	94,5 ± 39,7	21,7 ± 15,9	11,1	115,5 ± 78,5	1,2 ± 0,2	8,3	49,0	1,1				50,00	59,3 ± 33,4	2,1 ± 0,5			
<i>Trichodorus giennensis</i>	5,6	67,0	0	-	-	-	16,67	9,0 ± 1,0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tylenchorhynchus aduncus</i>	-	-	-	5,6	31,0	0	33,3	133,0 ± 93,7	0	-	-	-	50,00	18,3 ± 4,1	0	-	-	-
<i>Tylenchorhynchus clarus</i>	-	-	-	5,6	12,0	0	16,67	29,0 ± 12,0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tylenchorhynchus dubius</i>	16,67	18,0 ± 8,1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tylenchorhynchus huesingi</i>	22,2	210,5 ± 66,0	0	16,7	50,7 ± 23,3	0	25,00	31,3 ± 9,2	0	22,22	157,5 ± 18,5	0	-	-	-	-	-	-
<i>Tylenchorhynchus sp.</i>	33,3	49,3 ± 5,5	0	50,0	54,1 ± 11,7	0				66,7	259,0 ± 61,7	0	-	-	-	-	-	-
<i>Xiphinema pachtaicum</i>	5,6	45,0	0	-	-	-	16,67	5,0 ± 2,0	0	44,44	16,5 ± 3,0	0	-	-	-	100	2,0	0
<i>Zygotylenchus guevarai</i>	11,1	18,0 ± 1,0	3,8 ± 3,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Datos correspondientes a una prospección realizada entre los meses de junio de 1996 y mayo de 1998 sobre 64 muestras recogidas en tres viveros de la provincia de Sevilla

<sup>b</sup>Incidencia = porcentaje de muestras de suelo en las cuales fue hallada la especie del nematodo

<sup>c</sup>Media ± DE (nn/cm<sup>3</sup> suelo) = media aritmética ± desvío estándar del número de nematodos de la especie presentes en 1 cm<sup>3</sup> de suelo

<sup>d</sup>Media ± DE (nn/gr raíz) = media aritmética ± desvío estándar del número de nematodos de la especie presentes en 1 gramo de raíz

<sup>e</sup>Indica ausencia de la especie en la muestra



El grupo trófico representado en mayor número fue el de los endoparásitos migratorios, en particular los lesionadores de raíz, con cuatro especies (*P. penetrans*, *P. thornei*, *P. vulnus*, y *Z. guevarai*). Asimismo, pudo recuperarse de las muestras de raíz a una única especie de nematodo nodulador, ausente en la prospección efectuada en Córdoba (*M. arenaria*) y tres especies de ectoparásitos migratorios (*C. xenoplax*, *P. microdorus* y *H. vulgaris*). Destacaron por su frecuencia los nematodos lesionadores *P. penetrans* y *P. vulnus* que encabezaron la lista con una incidencia del 56,3 y 18,8 %, respectivamente. *H. vulgaris*, en cambio, sólo estuvo presente en una de las muestras (1,6 % de incidencia). Nuevamente, un nematodo nodulador, *M. arenaria*, se constituyó en la especie más abundante en las muestras de raíz con número medio de 661,9 ejemplares por gramo de raíz. *H. vulgaris* fue la especie menos abundante, con una media de 1,6 nematodos por gramo de raíz.

Sólo dos especies de las 26 que fueron identificadas en la provincia, *C. xenoplax* y *P. thornei*, estuvieron presentes en las muestras correspondientes a cada uno de los seis cultivares prospectados (Tabla 2.13). 'Picual', con 20 especies, fue el cultivar que albergó la mayor diversidad.

### **2.3.3.3. Provincia de Jaén**

De la prospección en la provincia de Jaén se identificaron 20 especies de nematodos fitoparásitos (Tabla 2.14). La especie más frecuente fue *M. brevidens* presente en el 77,8 % de las muestras. Le siguieron *P. microdorus* y *H. pseudorobustus*, con unas incidencias del 53,3 % y el 46,7 %, respectivamente. *H. avenae*, *T. aduncus* y *Tylenchorhynchus* sp., todas con una incidencia del 2,2 % fueron las especies menos frecuentes. Como regla general se comprobaron valores de abundancia media inferiores a los registrados en las otras dos provincias y *P. microdorus*, con un promedio de 109,1 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo, fue la especie más abundante. *Tylenchorhynchus* sp., con 12,0 ejemplares/ 100 cm<sup>3</sup> de suelo fue la especie que arrojó el número medio más bajo de nematodos en el suelo.

Siete especies de nematodos fitoparásitos fueron aisladas de las muestras de raíz. La hegemonía en diversidad verificada para las otras dos provincias por parte de los lesionadores de raíz vuelve a repetirse, ya que este grupo trófico con cinco representantes (*P. neglectus*, *P. penetrans*, *P. thornei*, *P. vulnus*, y *Z. guevarai*), es el más numeroso. Similarmente a lo que ocurrió en la provincia de Sevilla, tan solo una especie de nematodo nodulador pudo ser aislada y fue, en este caso, *M. arenaria*. Por último, también se aisló de las muestras de raíz *C. xenoplax*. Repitiendo otra condición ya verificada en la provincia de Sevilla las especies más frecuentes en las muestras de raíz fueron los nematodos lesionadores *P. penetrans* y *P. vulnus* con una incidencia de 31,1 % y 24,4 %, respectivamente. *C. xenoplax*, presente en una sola de las muestras con una incidencia de 2,2 %, fue la especie de menor frecuencia.

La abundancia con que se presentaron las especies en las muestras de raíz fue, en términos generales, muy inferior a la que se había verificado en las otras dos provincias. *P. neglectus* fue la especie más abundante con número medio de 10,4 ejemplares por gramo de raíz. *C. xenoplax* mostró ser no sólo la menos frecuente, sino que con una media de solo 0,5 nematodos por gramo de raíz resultó ser también la menos abundante.

De las 20 especies que estuvieron presentes en las muestras de la provincia de Jaén hubo cinco que pudieron recuperarse de los tres cultivares que conformaron la muestra y fueron *H. pseudorobustus*, *M.brevidens*, *P. thornei*, *P. vulnus*, *T. clarus* y *T. dubius* (Tabla 2.15). 'Picual' fue el cultivar que presentó mayor número de especies ya que solo una, *T. aduncus*, no pudo ser recuperada en las muestras correspondientes a esta variedad.

**Tabla 2.14.** Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plantones de olivo en viveros de la provincia de Jaén<sup>a</sup>

Especie	Incidencia en el suelo <sup>b</sup> (%)	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo		Incidencia en raíz <sup>b</sup> (%)	Nematodos/ g raíz	
		Media ± DE <sup>c</sup>	Rango <sup>d</sup>		Media ± DE <sup>c</sup>	Rango <sup>d</sup>
<i>Merlinius brevidens</i>	77,8	34,4 ± 26,7	12-112	0 <sup>e</sup>	- <sup>f</sup>	-
<i>Paratylenchus microdorus</i>	53,3	109,1 ± 353,3	11-1.764	0	-	-
<i>Helicotylenchus pseudorobustus</i>	46,7	40,1 ± 20,6	21-118	0	-	-
<i>Tylenchorhynchus clarus</i>	44,4	39, 2 ± 20,2	81-87	0	-	-
<i>Pratylenchus penetrans</i>	35,6	45,2 ± 28,6	13-98	31,1	6,1 ± 6,3	0,5-20,0
<i>Tylenchorhynchus dubius</i>	31,1	83,4 ± 78,1	22-101	0	-	-
<i>Pratylenchus thornei</i>	28,9	26 ± 19,4	10-68	15,6	3,7 ± 7,3	0,2-20,0
<i>Pratylenchus vulnus</i>	26,7	80,5 ± 49,9	32-178	24,4	7,9 ± 12,0	1,0-40,0
<i>Helicotylenchus digonicus</i>	20,0	34,4 ± 14,1	15-61	0	-	-
<i>Pratylenchus neglectus</i>	17,8	103,3 ± 48,1	42-186	15,6	10,4 ± 10,0	1,0-24,0
<i>Criconemella xenoplax</i>	15,6	31,4 ± 32,1	10-99	2,2	0,5	-
<i>Zygotylenchus guevarai</i>	15,6	19,1 ± 6,3	13-31	4,4	5,3 ± 3,7	2,7-7,9
<i>Meloidogyne incognita</i>	13,3	47,8 ± 42,8	13-128	6,7	5,4 ± 4,3	2,0-10,2
<i>Amplimerlinius paraglobigerus</i>	8,9	23,8 ± 15,4	10-42	0	-	-
<i>Merlinius microdorus</i>	6,7	98,7 ± 80,6	34-189	0	-	-
<i>Tylenchorhynchus huesingi</i>	6,7	83 ± 3,5	13-252	0	-	-
<i>Criconemoides informis</i>	4,4	26,0 ± 7,1	21-31	0	-	-
<i>Heterodera avenae</i>	2,2	25,0	-	0	-	-
<i>Tylenchorhynchus aduncus</i>	2,2	59,0	-	0	-	-
<i>Tylenchorhynchus sp.</i>	2,2	12,0	-	0	-	-

<sup>a</sup>Datos correspondientes a una prospección realizada entre los meses de junio de 1996 y mayo de 1998 sobre 47 muestras recogidas en seis viveros de la provincia de Jaén. <sup>b</sup>Incidencia = porcentaje de muestras de suelo en las cuales fue hallada la especie del nematodo <sup>c</sup>Media ± DE = media aritmética ± desviación estándar del número de nematodos de la especie presentes la alícuota considerada <sup>d</sup>Valores máximo y mínimo, respectivamente, registrados en la muestra. <sup>e</sup>Indica ausencia de la especie en la muestra de raíz. <sup>f</sup>Dato no consignado

**Tabla 2.15:** Incidencia y densidades de población de nematodos fitoparásitos en suelo y raíces de plantones de olivo en viveros muestreados en la provincia de Jaén discriminados según los diferentes cultivares<sup>a</sup>.

Especie	PICUAL			ARBEQUINA			CORNICABRA		
	Incidencia <sup>b</sup>	Media ± DE (nn/cm <sup>3</sup> suelo) <sup>c</sup>	Media ± DE (nn/gr raíz) <sup>d</sup>	Incidencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)	Incidencia	Media ± DE (nn/cc suelo)	Media ± DE (nn/gr raíz)
<i>Amplimerlinius paraglobigerus</i>	9,1	21,3 ± 10,3	0	- <sup>e</sup>	-	-	16,7	31,0	0
<i>Criconemella xenoplax</i>	18,2	34,7 ± 13,8	0,5	-	-	-	16,7	12,0	0
<i>Criconemoides informis</i>	6,1	26,0 ± 5,0	0	-	-	-	-	-	-
<i>Helicotylenchus digonicus</i>	27,3	34,4 ± 4,7	0	-	-	-	-	-	-
<i>Helicotylenchus pseudorobustus</i>	42,4	42,4 ± 6,2	0	50,00	34,3 ± 13,3	0	66,7	36,3 ± 2,2	0
<i>Heterodera avenae</i>	3,0	25,0	0	-	-	-	-	-	-
<i>Meloidogyne incognita</i>	15,2	54,8 ± 19,6	7,2 ± 3,1	-	-	-	16,7	13,0	2,0
<i>Merlinius brevidens</i>	81,8	36,0 ± 5,8	0	66,7	27,8 ± 6,1	0	66,7	30,0 ± 0,9	0
<i>Merlinius microdorus</i>	9,1	98,7 ± 46,5	0	66,7	45,0 ± 12,4	0	-	-	-
<i>Paratylenchus microdorus</i>	51,51	34,2 ± 5,6	0	-	-	-	66,7	475,8 ± 429,6	0
<i>Pratylenchus neglectus</i>	24,24	103,2 ± 17,0	10,4 ± 3,8	-	-	-	-	-	-
<i>Pratylenchus penetrans</i>	42,4	47,0 ± 8,1	6,2 ± 1,9	-	-	-	33,33	32,5 ± 6,5	4,1
<i>Pratylenchus thornei</i>	33,33	27,0 ± 6,3	4,2 ± 3,2	16,7	23,0	0,2	16,7	18,0	0
<i>Pratylenchus vulnus</i>	12,1	79,5 ± 31,9	11,1 ± 9,7	66,7	74,5 ± 16,8	3,3 ± 0,9	66,7	87,5 ± 31,0	9,8 ± 5,2
<i>Tylenchorhynchus aduncus</i>	-	-	-	-	-	-	16,7	59,0	0
<i>Tylenchorhynchus clarus</i>	39,4	38,0 ± 5,6	0	83,33	41,8 ± 11,5	0	33,33	40,0 ± 8,0	0
<i>Tylenchorhynchus dubius</i>	30,3	87,0 ± 27,3	0	16,7	42,0	0	50,0	85,3 ± 41,4	0
<i>Tylenchorhynchus huesingi</i>	9,1	83,0 ± 2,0	0	-	-	-	-	-	-
<i>Tylenchorhynchus sp.</i>	3,0	12,0	0	-	-	-	-	-	-
<i>Zygotylenchus guevarai</i>	18,2	20,2 ± 2,6	5,3 ± 2,6	-	-	-	16,7	13,0	0

<sup>a</sup>Datos correspondientes a una prospección realizada entre los meses de junio de 1996 y mayo de 1998 sobre 47 muestras recogidas en seis viveros de la provincia de Jaén

<sup>b</sup>Incidencia = porcentaje de muestras de suelo en las cuales fue hallada la especie del nematodo

<sup>c</sup>Media ± DE (nn/cm<sup>3</sup> suelo) = media aritmética ± desvío estándar del número de nematodos de la especie presentes en 1 cm<sup>3</sup> de suelo

<sup>d</sup>Media ± DE (nn/gr raíz) = media aritmética ± desvío estándar del número de nematodos de la especie presentes en 1 gramo de raíz

<sup>e</sup>Indica ausencia de la especie en la muestra



## **2.4. DISCUSIÓN**

### **2.4.1 ASPECTOS ECOLÓGICOS**

#### **2.4.1.1. Hábitat y distribución de los nematodos encontrados**

Las especies de nematodos fitoparásitos encontradas en las prospecciones son componentes usuales de la nematofauna presente en suelos agrícolas y ambientes naturales en Andalucía y/o España (Castillo *et al.*, 1985; Castillo, 1988; Gómez Barcina *et al.*, 1989; Jiménez Guirado *et al.*, 1976), a excepción de *M. lusitanica*, *P. ritteri* y *T. aduncus*. Gran parte de las especies pertenecientes al orden Tylenchida se han citado previamente asociadas a ambientes naturales (i.e., *A. paraglobigerus*, *C. informis*, *H. vulgaris*, *P. fallax*, *P. microdorus*, *T. clarus*, *T. dubius*), debido a que éstos presentan una nematofauna asentada y generalmente más diversificada que los suelos agrícolas (Yeates y Bongers, 1999). Sin embargo, otras se han citado frecuentemente en suelos agrícolas asociadas a diferentes cultivos herbáceos y/o leñosos (i.e., *C. xenoplax*, *H. digonicus*, *H. dihystra*, *H. pseudorobustus*, *M. brevidens*, *M. microdorus*, *Meloidogyne* spp., *P. neglectus*, *P. thornei*, *P. vulnus*, *T. mamillatus*, *Z. guevarai*, etc.) (Bello, 1979; Gómez Barcina *et al.*, 1989; Talavera y Tobar Jiménez, 1997; Tobar Jiménez, 1984).

Asimismo, las cuatro especies de longidóridos también han sido citadas en Andalucía y/o España, en ambientes naturales (i.e., *T. giennensis*, *P. teres*) (Decraemer *et al.*, 1993) o en suelos cultivados (i.e., *P. minor* y *X. pachtaicum*) (Arias *et al.*, 1985; Navas *et al.*, 1988).

Tres de las especies halladas en las prospecciones no habían sido citadas previamente en España, si bien existía constancia de su presencia en ambientes circunmediterráneos y de Europa meridional. *M. lusitanica* fue descrita originalmente infectando olivo en Portugal (Abrantes y Santos, 1991), y desde entonces no ha habido mención acerca de su presencia en ningún otro país. Asimismo, *T. aduncus* fue citada por primera vez en el área suboccidental de Francia y, desde entonces, ha sido hallada en diversas áreas cultivadas y naturales de Italia (Vovlas y Cham, 1981). *P. ritteri* fue aislada en ambientes naturales y tierras cultivadas situados en regiones meridionales de Francia e Italia, respectivamente (Vovlas y Inserra, 1978).

En este estudio y sin excepción, cuando una determinada especie se halló provocando infección en raíz, la misma estaba presente en el sustrato que acompañaba al plantón. Este hecho resulta previsible para aquellos plantones propagados por

enraizamiento de estacas leñosas. El único origen posible para las poblaciones de nematodos endoparásitos que pudieran hallarse en el interior de las raíces previamente al comienzo de la crianza son las formas infectivas presentes en el sustrato viverístico utilizado para la implantación de la estaca. Hasta ese momento, la estaca no ha tenido contacto con ningún otro sustrato y, como se señaló anteriormente, ningún nematodo fitoparásito del olivo está presente en órganos aéreos. Los plantones obtenidos por estaquillado semileñoso, en cambio, antes de la crianza pasan por una etapa de enraizamiento en perlita y una, facultativa, de endurecimiento, generalmente en turba (ver 2.1.1.1). Aunque no existe documentación suficiente sobre infestaciones de nematodos fitoparásitos en turba, habitualmente se asume que tales sustratos no los contienen. Trabajos recientes realizados en nuestro laboratorio confirman esa presunción. En efecto el aislamiento de nematodos sobre turba proveniente de plantones de olivo en etapa de endurecimiento en viveros comerciales solo permitió la identificación de especies de nematodos saprofitos de los géneros *Acrobeles* sp., *Eucephalobus* sp., *Plectus* sp., *Rhabditis* sp., (Castillo, *datos no publicados*).

#### **2.4.1.2. Distribución proporcional por taxones**

La clasificación en órdenes de las especies de nematodos fitoparásitos halladas en la presente prospección arroja una proporción de un 13 % correspondiente al orden Dorylaimida y un 87 % correspondiente al orden Tylenchida. Esta distribución proporcional de las especies fitoparásitas entre los dos grupos taxonómicos principales resulta bastante coincidente con la registrada en prospecciones realizadas en ambientes similares en Andalucía. Peña-Santiago (1990) en una prospección de la nematofauna en olivares adultos de la provincia de Jaén encuentra que el 9,3 % de los nematodos fitoparásitos pertenecía al orden Dorylaimida, mientras que el resto (90,7%) pertenecía al orden Tylenchida. Asimismo, Talavera *et al.* (1999) en una prospección en el suelo asociado a plantones de especies forestales en un vivero de Andujar (Jaén), encontró que el 12,5 % de las especies encontradas pertenecía al orden Dorylaimida.

Análogamente, la distribución proporcional por familias registrada en la prospección efectuada por Talavera *et al.* (1999) resultó, muy similar a la que se comprobó en nuestro trabajo. Estos autores citan ocho especies pertenecientes a siete familias, cuyo porcentaje de incidencia es el siguiente: Pratylenchidae (25 %), Belonolaimidae (12,5 %), Criconematidae (12,5 %), Heteroderidae (12,5 %), Hoplolaimidae (12,5 %), Longidoridae (12,5 %) y Tylenchulidae (12,5 %). Podemos observar que todas las familias encontradas

en la prospección de Talavera *et al.* (1999) estuvieron presentes a su vez en la efectuada en el presente trabajo.

#### **2.4.1.3. Agrupación jerárquica por agregados de comunidades**

El dendrograma que ilustra la agrupación jerárquica por agregados según el índice de similaridad de Jaccard (Fig. 2.9) muestra que entre los distintos viveros considerados existe una separación incompleta, pero manifiesta, de acuerdo con la provincia de origen. Asimismo, esto sugiere que la composición nematológica, considerada en términos cualitativos de ausencia-presencia, se encuentra influida de alguna manera por el origen de los sustratos viverísticos utilizados en cada caso. Asimismo, la composición nematológica de cada sustrato de origen depende de factores relacionados con las características edáficas y climáticas propias de cada ambiente (Yeates, 1999), o bien estar vinculada a la historia agrícola de los lotes a partir de los cuales fueron recogidos los sustratos. En cualquier caso, estas condiciones están asociadas con el origen del sustrato y podrían explicar la discriminación por provincias observada. Sin embargo, este patrón de segregación no pudo observarse considerando los diferentes cultivares que se presentaban en cada provincia. Esto puede sugerir que no existen grandes diferencias de susceptibilidad entre los cultivares de olivo estudiados, o simplemente que las infestaciones de los sustratos viverísticos son homogéneas y se mantienen en los diferentes lotes de sustrato utilizados por cada vivero.

### **2.4.2. NEMATODOS FITOPARÁSITOS PRESENTES EN LA PROSPECCIÓN Y SU RIESGO POTENCIAL EN OLIVO**

#### **2.4.2.1. Especies de hábito ectoparasítico**

*M. brevidens*, con una incidencia del 61,4, fue el nematodo más frecuente en nuestras prospecciones. Ésta especie, junto con otras de los géneros *Merlinius* y *Tylenchorhynchus* y otras pertenecientes a la subfamilia Telotylenchinae forman el grupo conocido bajo la denominación común de "**stunt nematodes**" (Siddiqi, 2000). Se trata de especies polífagas y cosmopolitas que forman parte de la nematofauna habitual de praderas, bosques y tierras cultivadas. Su presencia se ha asociado con reducciones de crecimiento en tréboles (Hasan y Jain, 1987), cebada (Jones, 1979), maíz (Griffin, 1964), tabaco (Shepherd y Barker, 1990), crucíferas hortícolas (Khan, 1969) y plantas forestales de vivero (Riffle, 1972). El hábito alimenticio de *M. brevidens* ha sido estudiado para comprobar que su penetración nunca va más allá de las células epidérmicas (Bridge y Hague, 1974). Su

capacidad patogénica ha sido comprobada en gramíneas (Upadhyaya y Swarup, 1981; Griffin y Assay, 1996). Si bien la abundancia media con que la especie fue recuperada de las muestras en la presente prospección (34,5 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo) supera ampliamente la que fue necesaria para provocar reducciones de crecimiento sobre *Agropyron* spp. en condiciones experimentales (2 nematodos/cm<sup>3</sup> de suelo, Griffin y Assay, 1996), no cabe esperar que, aún en esas condiciones, pudiera provocar ninguna reducción significativa del vigor en plantas leñosas, independientemente de la edad de las mismas. La bibliografía nematológica en ningún caso permite identificar a esta especie como un posible patógeno de importancia en especies frutales (Cohn y Duncan, 1990; Nyczepir y Halbrendt, 1993, Nyczepir y Ole Becker, 1998). Similares consideraciones pueden realizarse al evaluar el riesgo nematológico de *T. clarus*, *T. dubius*, o *T. huesingi*, por tratarse de especies muy próximas entre sí, tanto desde el punto de vista filogenético como ecológico.

*C. xenoplax*, constituyó otra especie especialmente destacable en nuestra prospección ya que, con una incidencia del 39,0%, se constituyó la segunda más frecuente. Se trata de una especie de amplia distribución (Nyczepir y Halbrendt, 1993) que, si bien puede sobrevivir parasitando plantas herbáceas, se reproduce fundamentalmente sobre especies leñosas (Zehr *et al.*, 1990a). *C. xenoplax* pertenece al grupo de los "ring nematodes" o "**nematodos anillados**" y parasita un número muy amplio de frutales. Se ha indicado como agente responsable de reducciones de vigor y predisposición a otros factores de estrés en nogal (Lownsbery *et al.*, 1978), ciruelo (Mojtahedi y Lownsbery, 1975) y almendro (McKenry, 1985). Asimismo, se ha mostrado particularmente virulento en melocotonero, donde causa (en asociación con otros factores) el síndrome complejo denominado "*Peach Tree Short Life*" (Nyczepir *et al.*, 1983). La revisión de los antecedentes no permite especular sobre la existencia de una estrecha asociación entre esta especie y el olivo. Prospecciones efectuadas sobre raíz o rizosfera del cultivo han permitido detectar la presencia de otras especies del género *Criconemella*, tales como *C. informis* y *C. sphaerocephala* (Peña-Santiago, 1990), y *C. sicula* (Vovlas, 1982). También se han hallado, con relativa frecuencia, especies pertenecientes a otros géneros de la subfamilia Criconematinae, tales como *Criconemoides* spp. (Jiménez Millán *et al.*, 1965; Hirschmann *et al.*, 1966; Diab y El-Eraki, 1968; Sconamiglio *et al.*, 1968; Gallo y Giménez, 1976; Fiume, 1978; Vlachopoulos, 1991), *Criconema* spp. (Mehta y Raski, 1971; Peña-Santiago, 1990; Vlachopoulos, 1991) y *Ogma* spp. (Mehta y Raski, 1971; Inserra y Vovlas, 1981; Abrantes *et al.*, 1987). Sin embargo la única cita de *C. xenoplax* es de Hashim (1983a) que encuentra a esta especie en olivares adultos de la región de Kerak (Jordania). La circunstancia de que la especie no haya sido encontrada con frecuencia asociada al olivo no resulta, por sí sola,

suficiente para excluirla del complejo que pudiera significar un riesgo nematológico para el olivo. La abundancia media con que esta especie se presenta en nuestra prospección induce a pensar que, bajo condiciones apropiadas, la infección podría ocasionar perjuicios en el crecimiento y desarrollo del olivo. Ritchie (1986) comprobó que densidades de población de entre 38 y 83 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo pueden dar lugar a la muerte de plantas de melocotonero. La abundancia media encontrada en nuestra prospección supera en más de cuatro veces el límite máximo de ese rango. Por otra parte, la patogenicidad de otro nematodo anillado, *Ogma rhombosquamatum* (Mehta y Raski) Andrassy ha sido demostrada sobre olivo (Vovlas y Inserra, 1981). *C. xenoplax*, una especie de hábitos fundamentalmente ectoparasíticos, puede comportarse ocasionalmente de forma diferente. Ciancio y Grasso (1998), estudiando el parasitismo de esta especie en nogal demuestran que además del típico hábito ectoparasítico, en esta combinación nematodo-planta huésped es muy frecuente el hábito semiendoparasítico (también citado ocasionalmente por otros autores, i.e., Wescott y Hussey, 1992). Asimismo, indican que el tipo de parasitismo de *C. xenoplax* probablemente dependa de la estructura y rigidez de las raíces de la planta huésped. La incidencia relativamente elevada con que este nematodo se detectó en muestras de raíz en nuestra prospección (8,43 %), confirma este tipo de comportamiento también en olivo. Además, otro motivo que alerta sobre el potencial patogénico de las especies de la subfamilia Criconematinae, es la posibilidad de que interactúen sinérgicamente con hongos patógenos de suelo. Esta circunstancia ha sido comprobada en pecán (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch), para el nematodo *Criconemoides quadricornis* (Kirjanova) Raski, y los hongos fitopatógenos *Fusarium solani* (Mar.) Sacc. y *Pythium irregulare* Buisman (Hsu y Hendrix, 1973).

Otro grupo con una elevada incidencia en las prospecciones realizadas corresponde a los "**nematodos espirales**" ("*spiral nematodes*"), constituido por especies de los géneros *Helicotylenchus*, *Rotylenchus*, *Scutellonema* y otros. Se trata también de nematodos ectoparásitos, aunque muestran un mayor grado de evolución y adaptación al parasitismo que las especies anteriores. Juveniles y adultos penetran el tejido radical intracelularmente, utilizando para ello su estilete moderadamente robusto. Generalmente en su penetración llegan hasta el tejido cortical y mantienen la parte anterior del cuerpo dentro de la raíz, si bien no llegan a establecer sitios permanentes de alimentación (Siddiqi, 2000). En plantas herbáceas (i.e., maíz) la penetración en los tejidos más tiernos puede llegar a ser más profunda, y algunos autores lo consideran un hábito semiendoparasítico (Windham, 1998). La infestación de suelo con elevadas poblaciones de *H. pseudorobustus* ha sido asociada con decaimiento y pérdida de vigor en ciertas plantas leñosas como plátano, *Platanus occidentalis*

L. (Churchill y Ruehle, 1971) y granado, *Punica granatum* L. (Hashim, 1983b). Por otra parte, la capacidad patogénica de otras especies del género *Helicotylenchus* sobre el olivo ha sido comprobada en condiciones de campo y controladas. Graniti (1955) observó en Italia que *H. erithrynae* (Zimmerman) Golden causaba necrosis de las raíces del olivo y atribuyó a este daño una clorosis gradual que observó en los ápices de las hojas. Diab y El-Eraki (1968) comprobaron que la exposición de plantones de olivo durante 6 meses a *H. dihystra* (Cobb) Sher inducía un retraso en el crecimiento y una reducción en el desarrollo del sistema radical. Inserra *et al.* (1979a) observaron que *H. oleae* Inserra, Vovlas y Golden presentaba un parasitismo endoparasítico sobre raíces de olivo y que provocaba lesiones necróticas sobre las raíces funcionales. Aunque en la literatura nematológica no existen antecedentes experimentales sobre la capacidad reproductiva de *H. pseudorobustus* en olivo como para poder establecer una asociación entre la planta y el parásito, esta especie ha sido aislada previamente de raíces y rizosfera de plantas de olivo implantadas en regiones circunmediterráneas. Hirschmann *et al.* (1966) la encontraron en olivo en Grecia y Hashim (1983a) lo cita también sobre olivo en Jordania. Cabe destacar, por otra parte, que si bien *H. pseudorobustus* no estuvo presente en la prospección realizada en Jaén por Peña-Santiago (1990), otra especie del mismo género, *H. digonicus*, resultó la más abundante en su investigación. Todos estos antecedentes explorados nos conducen a considerar a *H. pseudorobustus*, como una especie de riesgo potencial moderado para el olivo.

Un parasitismo similar al descrito para los grupos anteriormente mencionados es el causado por el grupo comúnmente conocido como "**nematodos alfiler**" ("*pin nematodes*"). A este grupo pertenecen todas las especies de la subfamilia Paratylenchinae, que incluye a los géneros *Paratylenchus* Micoletzky, *Cacopaurus* Raski, y *Gracilacus* Thorne (Siddiqi, 2000). Se trata de nematodos extremadamente pequeños de hábito típicamente ectoparásito que, dependiendo de la longitud de su estilete, pueden alimentarse sobre las células epidérmicas o sobre las células del tejido cortical. La presencia de estos nematodos ha sido citada con frecuencia sobre especies leñosas. *P. neoamblycephalus* Geraert parasita manzano, albaricoquero y melocotonero en Australia, Europa y América del Norte (Fisher, 1967). *G. epacris* (Allen y Jensen) Goodey ha sido implicada en una enfermedad del nogal negro en California (Allen y Jensen, 1950) y *P. capitatus* (Adams y Eichenmuller) Siddiqi y Goodey ha sido asociada con la muerte de robles en Virginia (Adams y Eichenmuller, 1962). *Cacopaurus pestis* Thorne es uno de los principales nematodos del nogal implantado sobre pie *Juglans regia* L. (Nyczepir y Halbrendt, 1993). Otras especies leñosas huéspedes de esta especie son el naranjo amargo, el álamo, el rosal y la lila (Scotto La Massese, 1972). Sconamiglio *et al.* (1968) citan varias poblaciones del género *Paratylenchus* (no identificadas específicamente) y

*Gracilacus* sp., asociadas con plantas adultas de olivo en la región centro-este de Italia, con una incidencia del 82 y 8 %, respectivamente en muestras de suelo. En una prospección de características similares en Calabria (Sur de Italia) Fiume (1978) encuentra una incidencia de *Paratylenchus* spp. del 23 %. Inserra y Vovlas (1981) citan a *G. peratica* en diversas provincias olivareras del centro y sur de Italia. Este mismo nematodo, junto con *Paratylenchus vandenbrandei* De Grise formaba parte de la lista de especies que Inserra *et al.* (1976) habían identificado como asociadas con el decaimiento de olivos adultos en provincias del sur de Italia. En España, Peña-Santiago (1990) en una prospección sobre olivos adultos en la provincia de Jaén citó *Paratylenchus baldaccii* Rasky y *P. microdorus* con incidencias moderadas (10,1 y 13,2%, respectivamente). No existen evidencias experimentales que permitan anticipar una patogenicidad severa de *Paratylenchus* spp. sobre el olivo. Observaciones histopatológicas sobre raíces de olivo naturalmente infectadas por *G. peratica* (Inserra *et al.*, 1976), sugieren un hábito semiendoparásito que debería ser considerado en estudios de patogenicidad. Asimismo, nuestros resultados indican que *P. microdorus* pudo aislarse en muestras de raíz, lo que confirma las especulaciones sobre el comportamiento semiendoparasítico de las especies de este género. No obstante, la literatura nematológica indica que habitualmente los nematodos de este grupo sólo ocasionan daños severos cuando alcanzan densidades de población elevadas. Sharma y Sharma (1987), comprobaron que para provocar reducciones de crecimiento en melocotonero era necesaria la inoculación con poblaciones iniciales de *Paratylenchus prunii* Sharma, Sharma y Khan de 2.000 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo, y estos niveles de inóculo solo podrían alcanzarse muy excepcionalmente en olivo. Sconamiglio *et al.* (1968) únicamente pudieron verificarlo en una de las 50 muestras que conformaron su prospección. El niveles medio de inóculo detectado en nuestro estudio (79,1 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo) resulta significativamente inferior al nivel mencionado como necesario para provocar una patogenicidad mensurable e incluso la máxima (1.764 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo). Por esta razón, este grupo de nematodos puede ser considerado de importancia menor o leve para el olivo.

Finalmente debemos considerar las cinco especies pertenecientes al orden **Dorylaimida** que, con frecuencias relativamente bajas, estuvieron presentes en nuestra prospección: *Longidorus* sp., *X. pachtaicum*, *P. minor*, *P. teres* y *T. giennensis*. Estas especies se consideran, por regla general, como parásitos importantes de los árboles frutales, no tanto por el daño directo que pueden ocasionar como por su participación potencial en la transmisión de virus fitopatógenos (Taylor y Brown, 1997). Cuatro nepovirus han sido citados en olivo: i.e., el nepovirus del mosaico del Arabis (ArMV) (Savino *et al.*, 1979), el nepovirus de la mancha anular latente de la fresa (SLRV) (Marte *et al.*, 1986), el

nepovirus del enrollamiento de la hoja del cerezo (CLRV) (Savino y Gallitelli, 1981) y nepovirus de la mancha anular latente del olivo (OLRV) (Savino *et al.*, 1983). No se ha podido comprobar experimentalmente la responsabilidad de ninguna especie de nematodo en la transmisión de estas virosis en olivo, sino que la misma se infiere a partir del conocimiento recogido para otras especies, en el caso de ArMV, CLRV y SLRV (Lamberti, 1981), y de analogías estructurales en el caso de OLRV. La transmisión de ArMV, CLRV y SLRV ha sido atribuida fundamentalmente a *X. diversicaudatum* (Micoletzky) Thorne, cuya presencia ha sido citada en el norte y el centro de España (Navas *et al.*, 1988). Hasta el momento no se ha comprobado la responsabilidad del único nematodo daga presente en nuestra prospección (*X. pachtaicum*) en la transmisión de virus al olivo. Sin embargo esta especie se incluye en el grupo de especies conocido como *Xiphinema americanum sensu lato* (Di Silvestro y Tacconi, 1998), asociados a la transmisión de virosis de importancia económica en frutales. Además, el carácter latente que presentan estas infecciones y la dificultad de detectarlas advierten sobre la posibilidad de que esta especie pudiera transmitir virosis potencialmente severas. Del mismo modo, otra circunstancia que sugiere no despreciar la potencialidad patogénica de este nematodo en el olivo es la cita de Diab y El-Eraki (1968) sobre el daño directo ocasionado en olivo por *X. elongatum* Schuurmans Steekhoven y Tenuissen.

#### **2.4.2.2. Especies de hábito endoparasítico migratorio**

Diversas especies de **nematodos lesionadores de raíz** ("root-lesion nematodes") pertenecientes a los géneros *Pratylenchoides*, *Pratylenchus*, y *Zygotylenchus* fueron encontradas en nuestra prospección con incidencia variable. *P. penetrans* y *P. vulnus*, se detectaron en el 31,8 % y el 25,3 % de los plantones estudiados, respectivamente. Las restantes especies de este grupo (i.e., *P. ritteri*, *P. fallax*, *P. neglectus*, *P. thornei*, y *Z. guevarai*) se aislaron con una escasa incidencia en raíz (Tabla 2.6). Este grupo está formado por nematodos endoparasitos migratorios que presentan adaptaciones morfológicas adecuadas a penetrar y alimentarse sobre los tejidos internos de las raíces (Siddiqi, 2000). Entre estas adaptaciones figura la dotación de una región labial ensanchada y fuertemente esclerotizada, y la presencia de un estilete muy robusto. Muchos representantes de la familia Pratylenchidae constituyen un problema fitopatológico limitante en diversas plantas leñosas de importancia económica. Un complejo formado por varias especies del género *Pratylenchus*, entre las que destaca *P. coffeae*, constituye un gravísimo problema fitopatológico en el cafeto, al cual ataca tanto en vivero como en la plantación establecida, llegando a provocar en ataques severos la muerte de la planta (Campos *et al.*, 1990). *P.*

*coffaeae* constituye igualmente la especie de mayor importancia económica dentro del complejo de nematodos lesionadores que atacan a los cítricos y, en condiciones controladas, se ha comprobado que provoca reducciones de crecimiento de hasta un 38 % (Duncan y Cohn, 1990). Muchas especies de árboles frutales de clima templado se ven del mismo modo afectadas seriamente por el parasitismo de los nematodos lesionadores. Cuatro especies del género *Pratylenchus* (*P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. penetrans* y *P. vulnus*) son consideradas de importancia económica en este sentido. De las cuatro especies que forman este grupo, *P. penetrans* es la que está más ampliamente distribuida y probablemente sea la más conocida y difundida de todos los nematodos lesionadores que atacan frutales (Nyczepir y Halbrecht, 1993). De cualquier forma, la mayoría de los trabajos sobre patogenicidad sugieren que esta especie constituye un problema sólo en zonas de clima frío. Asimismo, *P. vulnus* presenta una distribución geográfica muy amplia y ocupa el segundo lugar en importancia, entre los nematodos lesionadores que atacan a los frutales de clima templado. A diferencia de *P. penetrans*, se asume que *P. vulnus* constituye un problema fitopatológico para frutales en zonas de clima moderadamente cálido (Corbett, 1974), y Pinochet *et al.* (1991) lo han calificado como el más importante de los nematodos lesionadores que atacan a los árboles frutales en la región mediterránea.

La patogenicidad de *P. penetrans* ha sido ampliamente verificada con evidencias experimentales y observaciones en campo, tanto de reducción del crecimiento como de alteraciones anatómo-histopatológicas en frutales de hueso (Szczygiel y Danek, 1976; Mai y Parker, 1967) y frutales de pepita (Abawi y Mai, 1990; Townshend, 1990). Asimismo, evidencias experimentales de la patogenicidad de *P. vulnus* también han sido obtenidas para frutales de hueso (Pinochet *et al.*, 1993a, 1996a; Hernández-Dorrego *et al.*, 1999) y de pepita (Fernández *et al.*, 1992). Tanto *P. penetrans* como *P. vulnus* han sido encontradas parasitando olivo en múltiples ocasiones. La referencia más incontrovertible de una asociación entre el olivo y el género *Pratylenchus*, probablemente sea la aportada por Sconamiglio *et al.* (1968), que en una prospección de olivares adultos efectuada en provincias del centro-este de Italia señalaron una incidencia del 100 %. En otra prospección en provincias meridionales de Italia sobre olivos de edad media, Inserra *et al.* (1976) encuentran que *P. vulnus* resultó la especie más importante, tanto por frecuencia como por abundancia, e indican que *P. vulnus* puede ser una amenaza para la olivicultura de la Región Mediterránea. Análogamente, esta especie también ha sido detectada en olivo en regiones más septentrionales de Italia como Toscana y Umbria (Inserra y Vovlas, 1981), en Argelia (Lamberti *et al.* 1975) y Estados Unidos (Serr y Day, 1949). *P. penetrans* también estuvo presente en la prospección efectuada por Inserra *et al.* (1976) en el sur de Italia, si bien con

una frecuencia y abundancia inferior a la registrada para *P. vulnus*. Hashim (1983a) encontró a *P. penetrans* en una prospección que realizó en olivares implantados de Jordania. Por último, esta especie fue también asociada al olivo en la provincia de Jaén por Peña-Santiago (1990).

La patogenicidad de *P. vulnus* sobre olivo fue demostrada, en condiciones controladas por Lamberti y Baines (1969b) e Inserra *et al.* (1981). Por otra parte existen evidencias experimentales sobre la existencia de una interacción sinérgica entre *P. penetrans* y *V. dahliae*, el agente causal de la Verticilosis del olivo. Dicha interacción fue comprobada para *P. penetrans* en fresa *Fragaria vesca* L. (McKinley y Talboys, 1979) y patata *Solanum tuberosum* L. (Rowe *et al.*, 1985; Riedel *et al.*, 1985; Wheeler y Riedel, 1994). Asimismo, también se ha documentado la existencia de una interacción sinérgica entre otro hongo del mismo género, *V. albo-atrum* Reinke y Berthold, y tanto *P. penetrans* como *P. vulnus* en el árbol del bálsamo *Myroxylon balsamum* (L.) Harms (Müller, 1977). Por todo ello, con los antecedentes expuestos *P. penetrans* y *P. vulnus* deben ser considerados como nematodos con un claro riesgo potencial para el crecimiento y establecimiento de futuras plantaciones de olivo.

Sin embargo, la capacidad patogénica de las restantes cinco especies de nematodos lesionadores de raíz (*P. ritteri*, *P. fallax*, *P. neglectus*, *P. thornei* y *Z. guevarai*) con escasa incidencia en raíces de plántones de olivo ha sido demostrada únicamente en patosistemas que implican especies herbáceas. Algunos ejemplos documentados son: trigo-*P. fallax* (Bocquet, 1975), cebada-*P. neglectus* (Wolny, 1989) y garbanzo-*P. thornei* (Castillo *et al.*, 1998a, 1998b). No obstante, algunas de estas especies han sido citadas en asociación con el olivo, i.e., *P. neglectus* en Grecia (Hirschmann *et al.*, 1966), Italia (Inserra *et al.*, 1976) y Jordania (Hashim, 1983a) y España (Peña-Santiago, 1990); *P. thornei*, en Jordania (Hashim, 1983a); y *Z. guevarai* en España (Peña-Santiago, 1990). Los resultados obtenidos en nuestra prospección indican que este grupo de nematodos son capaces de penetrar en las raíces del olivo (a excepción de *P. ritteri*, todas las especies fueron aisladas en muestras de raíz). Sin embargo, no existen datos sobre su capacidad reproductiva en olivo que nos permitan predecir la condición del olivo para mantener e incrementar poblaciones de estos patógenos. La presencia de estas especies entre las muestras estudiadas parece deberse a poblaciones residuales originadas en el ambiente de donde provienen los diferentes sustratos que pudieron ocasionar infecciones ocasionales en las raíces jóvenes de los plántones sin haber podido continuar su ciclo reproductivo con normalidad. Además, en algunos casos, las poblaciones podrían haberse visto incrementadas como consecuencia de su reproducción en huéspedes herbáceos que acompañaban al plantón de olivo en los contenedores. La

literatura nematológica relacionada con frutales no permite especular sobre un importante potencial patogénico de estas especies en los mismos. Por lo tanto, este grupo de nematodos lesionadores debe ser considerado de importancia menor para el crecimiento del olivo, aunque previamente habría que demostrar su capacidad reproductiva sobre plantones de olivo en condiciones controladas.

### **2.4.2.3. Especies de hábito endoparasítico sedentario**

Evaluaremos a continuación la importancia potencial para el olivo de los **nematodos noduladores de raíz** ("root-knot nematodes"), que forman un grupo de gran relevancia económica, fundamentalmente en regiones tropicales y subtropicales donde parasitan un grupo muy extenso de plantas cultivadas. Este grupo de nematodos muestra el grado más sofisticado de adaptación al parasitismo. Se trata de típicos endoparásitos sedentarios que inducen sitios permanentes de alimentación en torno a los tejidos vasculares de la raíz y provocan transformaciones histológicas, anatómicas y citológicas que garantizan el aporte de nutrientes necesario para completar el ciclo reproductivo y la protección mecánica de los huevos. Algunas de estas especies pueden representar un riesgo potencial tan grave que merecen ser consideradas en el presente trabajo, a pesar de que su incidencia en las muestras estudiadas haya mostrado valores relativamente bajos. Cuatro especies de este grupo, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. lusitanica* han sido encontradas en nuestra prospección con incidencias del 14,6, 11,1, 2,7 y 0,4 %, respectivamente. *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*, son las tres especies más importantes del género y constituyen un grupo homogéneo que destaca por su amplio rango de huéspedes herbáceos y leñosos y su extenso ámbito geográfico de dispersión (Jepson, 1987). Las tres o al menos alguna de ellas han sido citadas en España y el resto del mundo sobre una amplia gama de frutales que incluye granado, guayabo, higuera, kiwi, litchi, manzano, morera, nogal, palmera, papaya, peral y todas las especies cultivadas de los géneros *Prunus* y *Citrus* (Bello, 1983; Nyczepir y Halbrendt, 1993; Nyczepir y Ole Becker, 1998). *M. incognita* y *M. javanica* probablemente constituyan las dos especies asociadas al olivo de forma más cosmopolita, ya que entre las dos reúnen citas que agotan prácticamente la totalidad del área de dispersión del cultivo. *M. incognita* ha sido encontrada en Italia (Inserra y Vovlas, 1981), India (Sethi *et al.*, 1988), Jordania (Hashim, 1979), Líbano (Saad y Nienhaus, 1969), Libia (Edongali, 1989), Argentina (Doucet *et al.* 1997) y Australia (McLeod *et al.*, 1997). *M. javanica* fue citada en asociación con el olivo en Chile (Jiménez, 1982), China (Yang y Zhong, 1980), Egipto (Diab y El-Eraki, 1968), Grecia (Hirschmann *et al.*, 1966), Italia (Inserra y Vovlas, 1981), Jordania (Hashim, 1979) y Estados Unidos (Lamberti y Lownsbery, 1968). *M. arenaria* parece

presentar un grado menor de asociación con el olivo. Su presencia ha sido citada únicamente en dos países olivareros: Chile (Jiménez, 1982) y China (Yang y Zhong, 1980). Aunque no existe ninguna cita previa a este trabajo que mencione la presencia de *Meloidogyne* spp. sobre olivo en España, esta circunstancia de ninguna manera debe considerarse un atenuante del posible riesgo nematológico de estas especies en España, sino más bien una consecuencia de la escasez de estudios nematológicos sobre olivo y la falta de análisis exhaustivos del sistema radical en los realizados. Sin embargo, las prospecciones efectuadas previamente en otros países y la llevada a cabo en este trabajo demuestran que el olivo es un huésped favorable para la reproducción de los nematodos noduladores más cosmopolitas. Por tanto, la posibilidad de encontrar infecciones en olivares implantados o en plantas de vivero dependerá del origen e historia agrícola del suelo utilizado para su implantación, que podría haber estado cultivado con huéspedes susceptibles a estos nematodos y haber incrementado su población. Observaciones efectuadas sobre la composición nematológica de ambientes naturales andaluces (Jiménez Guirado *et al.*, 1976; Castillo, 1988) indican que *Meloidogyne* spp. no suele encontrarse en suelos sin historia previa de explotación agrícola. Las prospecciones nematológicas realizadas en España sobre olivo (S. Jacob *et al.*, 1959; Jiménez-Millán *et al.*, 1965; Peña-Santiago, 1990) probablemente han sido realizadas sobre olivares antiguos implantados en terrenos vírgenes o en los cuales no se había desarrollado otro cultivo susceptible que pudiera incrementar la población de *Meloidogyne* spp. Sin embargo, la expansión de las fronteras del olivo hacia terrenos de campiña no marginales, el uso de aguas de riego de superficie potencialmente contaminadas y el empleo de terreno agrícola como sustrato viverístico, permite auspiciar un incremento continuado en el tiempo de las infestaciones de suelos en olivar.

La patogenicidad de *Meloidogyne* spp. sobre olivo ha sido verificada en trabajos experimentales previos. Lamberti y Lownsberry (1968) observaron reducciones en el peso de plántones de olivo de los cultivares 'Ascolano' y 'Manzanillo' infectados artificialmente por *M. javanica*. Lamberti y Baines (1969a) ampliaron los resultados de esta investigación incluyendo otra variedad ('Sevillano') y otras dos especies (*M. arenaria* y *M. hapla*) para confirmar reducciones de vigor en los plántones, comprobar respuestas diferenciales en los diferentes cultivares y verificar que las dos especies añadidas al estudio resultaban menos patogénicas que *M. incognita* y *M. javanica*. Inserra *et al.* (1981) comprobaron la reproducción de *M. incognita* sobre seis cultivares diferentes de olivo y verificaron la presencia de alteraciones histopatológicas en raíz debidas al parasitismo de este nematodo. Abrantes *et al.* (1992) profundizaron en el conocimiento acerca de las alteraciones anatómicas e histológicas que provoca *M. javanica* sobre el olivo. Recientemente, Sasanelli

*et al.* (1997) confirmaron la patogenicidad de *M. incognita* y *M. javanica* sobre olivo y la presencia de reacciones diferenciales entre diferentes cultivares. Todos estos antecedentes indican que *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* deben ser consideradas como especies de nematodos que pueden limitar potencialmente el crecimiento y desarrollo del olivo.

*M. lusitanica* es un nematodo nodulador que se describió a partir de una población aislada en olivares de Portugal (Abrantes y Santos, 1991). Posteriormente Abrantes *et al.* (1992) comprobaron la patogenicidad de la especie sobre el olivo al evaluar las relaciones huésped-parásito que se establecían. La imposibilidad de incrementar poblaciones en un huésped habitualmente apropiado para la reproducción de las especies polífagas de *Meloidogyne* spp., como es el tomate, (Abrantes y Santos, 1991), sugiere la existencia de un parasitismo específico en olivo. Aunque no se dispone de antecedentes acerca de la capacidad reproductiva de este nematodo sobre el olivo ni acerca de su potencial de provocar reducciones de vigor sobre este cultivo, su parasitismo específico sobre el olivo sugiere un cierto grado de coevolución de la relación huésped-parásito. Por este motivo, aunque la incidencia en nuestra prospección haya sido casi insignificante y por más que no existan pruebas consistentes que acrediten la dispersión de la especie en el territorio español, es un nematodo que debe ser considerado.

#### **2.4.2.4. Nematodos fitopatógenos en olivo no detectados en la prospección**

La revisión de la literatura nematológica relacionada con la presencia de nematodos fitoparásitos del olivo a nivel mundial nos permite comprobar que algunas especies que se mencionan como patógenos potenciales importantes del olivo, no se aislaron en suelo o raíces en nuestra prospección. En particular, debemos destacar a *Tylenchulus semipenetrans* Cobb y a *Rotylenchulus macrodoratus* Dasgupta, Raski y Sher.

*T. semipenetrans*, el **nematodo de los cítricos** o "*citrus nematode*", es una especie de hábito semiendoparasítico altamente especializado que afecta a los cítricos en todas las zonas del mundo en que éstos son cultivados. Este nematodo provoca en los cítricos el síndrome conocido como "*slow decline*" o declive lento, que origina importantes pérdidas de cosecha. En su parasitismo, el nematodo introduce la porción anterior de su cuerpo en el interior de los tejidos de la raíz hasta una profundidad de varias capas de células donde termina estableciendo un sitio permanente de alimentación. Allí provoca modificaciones en unas pocas células situadas alrededor de la región labial que se transforman para suministrar nutrientes al nematodo hasta que éste complete su ciclo, por lo que se denominan "células nodriza". Este nematodo presenta una cierta especialización

parasítica en el rango de huéspedes que ha conducido al establecimiento de tres biotipos o razas fisiológicas. Inserra *et al.* (1980) establecen la diferenciación de los biotipos, incluyendo el biotipo *citrus*, que se reproduce sobre varios géneros de la familia Rutaceae, olivo, vid y kaki; el biotipo *mediterráneo*, que se reproduce sobre los mismos huéspedes con excepción del olivo; y el biotipo *Poncirus*, que se reproduce sobre *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., especies del género *Citrus* y vid.

En California *T. semipenetrans* constituye un patógeno importante del olivo y por la magnitud del daño que provoca, se ha equiparado a *Pratylenchus* spp. y *Meloidogyne* spp. (McKenry, 1994). Su incidencia es mayor en áreas donde el olivo convive con cítricos y vid, y puede ser predominante en una amplia variedad de suelos, incluidos aquellos de textura fina, con porcentajes de arcilla por encima del 50%. *T. semipenetrans* también se ha citado en olivo en Australia (McLeod *et al.*, 1994). Asimismo, se ha aislado de plantas de olivo en países de la Cuenca Mediterránea como Italia, donde Inserra y Vovlas (1981) aíslan varias poblaciones pertenecientes al biotipo *Citrus* en olivares del norte del país y Grecia (Vlachopoulos, 1991). El biotipo *Citrus* de *T. semipenetrans* no se encuentra presente en España y, en primera instancia, esto llevaría a suponer poco probable encontrar al nematodo parasitando plantas de olivo en el país. En efecto, algunos autores consideran que la ausencia de un determinado biotipo en un área explica que no se encuentren infestaciones sobre los huéspedes susceptibles exclusivos. Inserra y Vovlas (1981), por ejemplo, atribuyen no haber encontrado al nematodo de los cítricos en las prospecciones efectuadas en regiones meridionales de Italia al hecho de que en esa zona sólo está documentada la presencia del biotipo mediterráneo. Verdejo *et al.* (1997), en cambio, afirman que la aparición de todos los biotipos en España sólo es cuestión de tiempo, considerando que la distribución de las razas fisiológicas está determinada por la presencia de los huéspedes, más que por factores climáticos, edáficos o ambientales de otra clase. Si nos atenemos a este criterio la aparición del nematodo de los cítricos en viveros de Andalucía podría ser inminente, sobre todo en aquellas zonas donde coexisten los cítricos, la vid y el olivo, huéspedes del biotipo *Citrus*.

*R. macrodoratus* forma parte de los denominados "**nematodos reniformes**" o "**reniform nematodes**". Se trata de especies que constituyen un estadio transicional entre los nematodos ectoparásitos vermiformes y los endoparásitos sedentarios con formas globosas (Siddiqi, 2000). Las hembras maduras, aunque se comportan semiendo-parasíticamente pueden penetrar con sus estiletes hasta tejidos relativamente profundos como el periciclo y el floema, donde provocan transformaciones en las células próximas a la región labial con objeto de convertirlas en sumideros metabólicos que aporten todos los nutrientes necesarios para completar el ciclo reproductivo. A diferencia de los nematodos reniformes de mayor

importancia económica, *Rotylenchulus reniformis* Linford y Oliveira y *R. parvus* (Williams) Sher, que tienen dispersión mundial, el hábitat de *R. macrodoratus* se encuentra restringido al área mediterránea (Inserra y Vovlas, 1980). Se ha citado en Francia (Scotto La Massese, 1973), Israel (Cohn y Mordechai, 1976), Grecia, Italia y Malta (Inserra y Vovlas, 1974) y por esta razón, recibe el nombre común de "nematodo reniforme del mediterráneo". En Italia *R. macrodoratus* se reconoce como uno de los nematodos asociados con mayor frecuencia al olivo desde que Inserra *et al.* (1976) identificaran esta especie en olivares del sur con una incidencia del 20 %. Asimismo, Inserra y Vovlas (1981) aislaron nuevamente varias poblaciones de *R. macrodoratus* en la totalidad de las áreas olivareras italianas, con excepción de Cerdeña. La condición del olivo como huésped apropiado para esta especie fue confirmada por Inserra *et al.* (1981) que consiguieron reproducirlo adecuadamente en la raíz de siete cultivares de olivo de amplia difusión en Italia (i.e., 'Ascolana', 'Frantoio' y 'Leccino'). Similarmente, Vovlas (1983) estudió las alteraciones histopatológicas producidas por *R. macrodoratus* en otro frutal susceptible como el pistacho. Si bien este nematodo no ha sido detectado sobre olivo en España, recientes estudios en nuestro laboratorio han identificado una población de una especie afín, *R. macrosoma* Dasgupta, Raski y Sher., asociada con acebuche en la provincia de Cádiz (Castillo, *datos no publicados*).

### **2.4.3. CONSIDERACIONES FINALES**

En la introducción del presente capítulo hemos destacado la importancia de la exclusión como medida paliativa del riesgo en la protección vegetal. En este sentido y en el caso particular del olivo, la elección de plantones sanos es la primera medida de la que dispone el olivicultor para evitar el establecimiento de ciertos agentes fitopatógenos en el olivar establecido. Cuando existe un programa de certificación sanitaria implementado adecuadamente el olivicultor puede proveerse de material vegetal con garantía de cumplir estándares mínimos de calidad en lo que respecta a la presencia de determinados organismos fitopatógenos. En España la posibilidad de adquirir plantones de olivo con certificación y pasaporte fitosanitario está contemplada por el Reglamento Técnico de Control y Certificación de plantas de vivero de frutales (RD 929/1995) y las modificaciones impuestas al mismo por el RD 1678/1999 (ver 2.1.3.2). Sin embargo, en la práctica, la aplicación de las normas previstas en los decretos mencionados encuentra serias dificultades de aplicación que determinan que, según nuestro conocimiento, en Andalucía no existan viveros adheridos a dicho programa. Por otra parte, la existencia de la norma no ha tenido la difusión necesaria para que los olivicultores conozcan su existencia y de esta manera exijan a los viveristas la producción de plantas certificadas.

Aún suponiendo que la adhesión al Programa de Certificación de plantones de olivo fuese una práctica habitual entre los viveristas, resta considerar si las normas específicas dispuestas en el reglamento para los nematodos fitoparásitos resultan, por un lado, aplicables y, por otro, útiles a los propósitos que se plantea el documento. En efecto, las normas de certificación sanitaria para el olivo se realizaron siguiendo las indicaciones efectuadas a nivel del Organismo Europeo y Mediterráneo para la Protección de las Plantas (OEPP, 1988), que consideró fundamentalmente el resultado de prospecciones efectuadas en Italia y en Portugal, no suficientemente contrastadas en España (Chomé Fuster, 1998). La norma impone, por ejemplo, que tanto el terreno de plantación como el sustrato empleado en cada una de las etapas de la producción del material certificado deberán estar "libres de *Verticillium dahliae* y nematodos transmisores de virus". Esta recomendación resulta claramente ambigua. El empleo de estos términos genéricos sugiere que existe más de una especie involucrada en la transmisión de nepovirus en olivo, mientras que el esquema donde la OEPP publica sus recomendaciones menciona solo a *X. diversicaudatum*, tal como cabe indicar a partir de lo que se recoge en la literatura nematológica. Por otra parte, tampoco está demostrada la responsabilidad de esta especie en particular en la transmisión del SRLV, el AMV y el CLRV al olivo, ya que, hasta la fecha, han fallado todos los intentos para encontrar un vector específico de suelo involucrado en la transmisión de estos nepovirus en olivo (Barba, 1993). Ante esta escasez de información necesaria para la elaboración de una norma adecuada, un criterio de exclusión podría incluir, por ejemplo, a cualquier especie del género *Xiphinema*, pero en ningún caso parece apropiado hacerla extensiva a un grupo tan amplio y diverso como el que se sugiere con "nematodos transmisores de virus". El carácter esporádico y leve con que se presentan estas virosis en las zonas olivareras, y particularmente en las españolas, parece desaconsejar claramente aplicar un criterio tan amplio y restrictivo. En otro sentido, la norma impone que para que el material de propagación logre la condición de CAC (*conformis agrarias communitatis*) debe presentarse sustancialmente libre, entre otros patógenos, de *Meloidogyne* spp. Los resultados de nuestra prospección y los antecedentes recogidos sugieren hacer extensiva esta condición a *P. vulnus* y *P. penetrans*.

Ante una situación como la que se presenta en España, donde el número de viveros productores de plantas de olivo adheridos al Programa de Certificación es escaso o nulo, otros criterios basados en la selección de los establecimientos de acuerdo a su prestigio empresarial o a la observación de normas de calidad en el proceso de producción podrían resultar útiles a los fines de la exclusión. En efecto existen establecimientos comerciales que adoptan, de forma voluntaria y a título particular, programas de control de la calidad sanitaria de los plantones que producen (Pinochet, 1998). Sin embargo los resultados

obtenidos en la presente prospección sugieren que no existe ningún criterio que, entre los viveros andaluces, permita orientar al olivicultor de forma apropiada en la elección de plantones con un nivel aceptable de calidad sanitaria. La muestra incluida en nuestra prospección abarcó toda la diversidad existente de establecimientos y, aún así, la incidencia en viveros de los cinco nematodos endoparásitos con elevado riesgo potencial (*M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, *P. penetrans* y *P. vulnus*) fue muy elevada: el 94,4 % de los viveros presentó infestaciones de al menos una de esas cinco especies. Esto sugiere que, en Andalucía y para las condiciones vigentes hasta la fecha, la elección de un vivero en función de estándares subjetivos de calidad no constituye una garantía de provisión de plantas sanas.

El Reglamento Específico para la Producción Integrada del Olivar (ver 2.1.3.2) representa una oportunidad para introducir la exclusión como práctica fitosanitaria entre los olivicultores o al menos entre los que se adhieren al programa. Sin embargo, para esta norma en particular, se deben considerar las mismas apreciaciones realizadas hasta aquí sobre la necesidad de adecuar la norma en lo referente a la elaboración de la lista de especies a excluir. Por otra parte, los sistemas de certificación pueden fracasar debido a problemas en la aplicación práctica de los sistemas de inspección. En este sentido cabe recomendar que las normas sean suficientemente claras, que se estipulen protocolos de laboratorio de aplicación sencilla y que se garantice la capacitación de los inspectores, sobre todo en lo referente a la identificación de los patógenos a excluir.

Además de constituirse en un factor que puede determinar reducciones de vigor en los plantones y diseminar patógenos en el terreno de plantación, la presencia de nematodos fitoparásitos en el material de propagación representa un elemento de riesgo desde la perspectiva del sector viverista exportador. En efecto, la presencia de ciertas especies puede no representar una amenaza desde el punto de vista fitopatológico en el caso particular del olivo, pero, en cambio, puede repercutir en el fracaso de operaciones comerciales dada su condición de especies de cuarentena en los países hacia los que los viveros españoles dirigen sus exportaciones. Algunas de las especies de nematodos encontradas en la presente prospección, por ejemplo, figuran entre la lista de especies de cuarentena A1 (plagas y enfermedades de importancia económica potencial para el área protegida y aun no presentes en las mismas) provista por el COSAVE (Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur). Tal es el caso de *P. fallax*, especie de cuarentena A1 para el área completa del COSAVE y *P. penetrans*, especie de cuarentena A1 en Chile (COSAVE, 1999).



# Capítulo III: Patogenicidad de nematodos fitoparásitos en plantones de olivo

---

## 3.1. INTRODUCCIÓN

Las prospecciones que se han descrito en el capítulo anterior dieron lugar a la identificación de las especies de nematodos fitoparásitos que infestan los sustratos y/o infectan el sistema radical de plantones de olivo en viveros comerciales de Andalucía. Posteriormente, el análisis de los antecedentes experimentales en la literatura fitonematológica nos ha conducido a determinar las especies que podrían representar el mayor riesgo para el crecimiento de los plantones durante la fase de crianza en vivero y su posterior desarrollo en las nuevas plantaciones de olivar. En este sentido debemos destacar los nematodos noduladores, *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, y los lesionadores de raíz, *Pratylenchus penetrans* y *P. vulnus*, que aparecen como las especies que podrían provocar mayor perjuicio o pérdidas del vigor sobre los plantones de olivo. Otras especies, entre las que se incluye el nematodo anillado *Criconebella xenoplax*, los nematodos espirales del género *Helicotylenchus* y nematodos lesionadores de raíz pertenecientes a otras especies diferentes a las mencionadas anteriormente, podrían catalogarse como nematodos fitoparásitos de riesgo potencial moderado.

La literatura fitonematológica recoge alguna información sobre la capacidad de ciertas especies de nematodos fitoparásitos para establecer relaciones compatibles de parasitismo en el olivo y causar reducciones de crecimiento en el mismo (Lamberti y Baines, 1969a y b; Sasanelli *et al.*, 1997). Sin embargo, este tipo de información no se encuentra disponible de forma exhaustiva para todas las especies de nematodos fitoparásitos que se han diagnosticado de interés como consecuencia de las prospecciones realizadas en el presente trabajo. El trabajo experimental correspondiente al presente capítulo pretende responder de forma sistemática a interrogantes relativos a la patogenicidad de estas especies sobre olivo, incluyendo la compatibilidad huésped-parásito y el efecto del parasitismo del nematodo sobre el crecimiento del huésped.

Para responder a estos interrogantes en el presente capítulo se han planteado los siguientes objetivos particulares:

1. **Evaluar la capacidad reproductiva de determinadas especies de**

**nematodos fitoparásitos sobre plántones de olivo 'Arbequina' y 'Picual',**

- 2. Determinar la capacidad patogénica de poblaciones de nematodos noduladores (*Meloidogyne* spp.) y lesionadores de raíz (*Pratylenchus* spp.) sobre plántones de olivo 'Arbequina' y 'Picual'.**

### **3.1.1. CONCEPTO DE PATOGENICIDAD EN NEMATOLOGÍA**

El término patogenicidad se emplea habitualmente en Patología Vegetal para expresar la capacidad de un organismo de inducir enfermedad o bien la cantidad de perjuicio fisiológico causado al huésped por la presencia de un microorganismo patógeno (Shaner *et al.*, 1992). Si bien persiste la controversia acerca de si los nematodos que atacan a las plantas deben ser considerados como microorganismos parásitos o patógenos, la Nematología aplica la terminología utilizada por la Fitopatología para hongos y bacterias (Triantaphyllou, 1987). Por esa razón el término "patogenicidad", en el ámbito de la Nematología, conserva una significación ambivalente que expresa por un lado un concepto cualitativo (caracterización de la capacidad de una especie dada para establecer una relación huésped-parásito compatible con una planta determinada) y por otro un concepto cuantitativo (definición de diferencias en la expresión del perjuicio causado en la planta). A fin de establecer una diferenciación entre los conceptos que convergen en la definición se recomienda, en Nematología, distinguir entre *patogenicidad* propiamente dicha (mayor o menor capacidad de un nematodo fitoparásito de reducir el crecimiento de una planta huésped) y *agresividad* (capacidad de una población o raza de nematodo fitoparásito para reproducirse sobre el huésped) (Shaner *et al.*, 1992). Esta última definición enlaza el concepto de agresividad con el de "capacidad reproductiva", término vinculado estrechamente con el concepto clásico de patogenicidad en nematología y que describiremos posteriormente con más precisión.

En conclusión, podemos decir que el concepto amplio de patogenicidad en Nematología involucra el establecimiento de una relación parasítica en el huésped y la puesta en marcha de fenómenos propios del parasitismo que desembocan en un perjuicio de la fisiología de la planta huésped. Por tanto, a continuación consideraremos los aspectos nematológicos generales que se encuadran dentro del término amplio de patogenicidad, como son el concepto de capacidad reproductiva y las bases citológicas y fisiológicas asociadas a la reducción del crecimiento y el rendimiento de la planta.

### **3.1.2. COMPATIBILIDAD PLANTA HUÉSPED - NEMATODO FITOPARÁSITO Y CAPACIDAD REPRODUCTIVA**

#### **3.1.2.1. Concepto de capacidad reproductiva: significación biológica y su empleo en nematología en frutales**

Tal como se ha mencionado en el apartado 3.1.1, en Nematología "patogenicidad" implica, en primer lugar, considerar el establecimiento de una relación huésped-parásito compatible. Es decir, podemos afirmar que una especie o población de nematodo fitoparásito puede considerarse patógena de una determinada especie o cultivar de planta sólo cuando entre ambos se establece una relación huésped-parásito compatible. Por otra parte, hablamos de compatibilidad cuando la asociación entre ambos organismos, planta y nematodo, permite al parásito desarrollarse y reproducirse de forma considerable en el huésped (Lewis, 1986). De esta forma, la capacidad reproductiva de un nematodo dado en una planta se convierte en una medida del grado de resistencia o susceptibilidad de la planta huésped sobre la que establece la relación de parasitismo (Seinhorst, 1969; Taylor, 1971; Wescott y Zehr, 1991).

El parámetro que se utiliza habitualmente para medir la capacidad reproductiva de un nematodo determinado sobre cierto huésped es el "índice" o "tasa de reproducción" (Rf). Este parámetro resulta de calcular el cociente entre las poblaciones final (Pf) e inicial (Pi) del nematodo en la planta. Dada su utilidad para definir el grado de resistencia de una planta el valor Rf resulta una herramienta muy apropiada en los programas de mejora genética vegetal a la hora de evaluar el comportamiento de diferentes genotipos de la planta huésped frente a la infección por nematodos (Fassuliotis, 1979). Asimismo, la tasa de reproducción resulta igualmente apropiada en ciertos nematodos como *Meloidogyne* spp., para definir la gama de huéspedes de una especie o raza fisiológica (Sasser, 1979).

Si bien existe un acuerdo acerca de que la tasa de reproducción Rf es un indicador numérico adecuado de la compatibilidad huésped-parásito, en fitonematología no existen escalas que permitan de un modo inequívoco y universal otorgar una calificación en el intervalo de "agresivo-no agresivo" o "susceptible-resistente" a partir del valor de la tasa de reproducción. No obstante, es evidente que factores reproductivos inferiores a la unidad conducen necesariamente a la desaparición de la población del nematodo a corto o medio plazo y que factores reproductivos superiores a la unidad llevan a un incremento de dicha población. En frutales, Marull y Pinochet (1991) sugieren calificar como de "no huésped" a aquellas especies o cultivares que determinen un  $Rf < 1$ , "huésped pobre" a aquellas con un  $1 < Rf < 1,5$ ; y de "huésped" a aquellas con un  $Rf > 1,5$ .

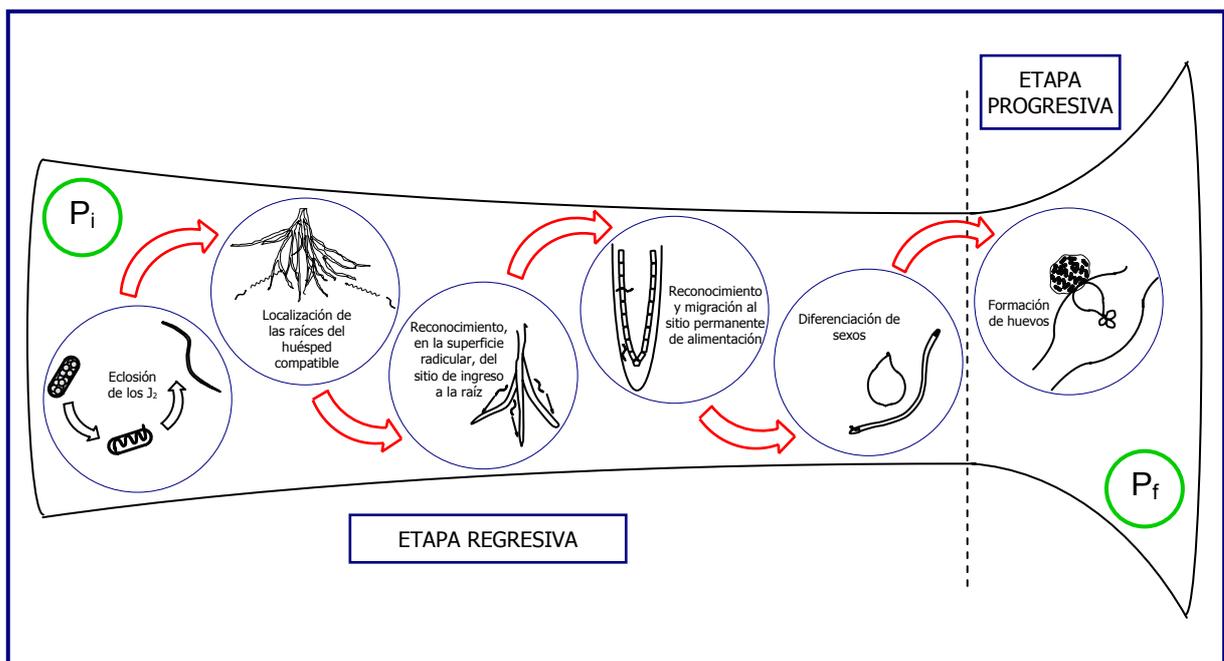
La tasa de reproducción ha resultado un parámetro muy útil en estudios de Nematología de árboles frutales. En este sentido cabe mencionar su inclusión sistemática en múltiples investigaciones para la evaluación del comportamiento de diferentes porta-injertos frente a nematodos noduladores y lesionadores de raíz (Marull *et al.*, 1990, 1991; Marull y Pinochet, 1991; Pinochet *et al.*, 1989, 1991, 1992b, 2000). Asimismo, este parámetro ha sido empleado para determinar la capacidad de *Prunus* spp. y *Pyrus communis* L. de comportarse como huéspedes susceptibles de los nematodos lesionadores de raíz *P. vulnus*, *P. neglectus* y *P. thornei*. (Pinochet *et al.*, 1991) y para definir el rango de huéspedes de *P. vulnus* entre una serie de porta-injertos correspondientes a diferentes árboles frutales (Pinochet *et al.*, 1992c).

En los trabajos mencionados anteriormente se utilizó la capacidad reproductiva del nematodo fundamentalmente para caracterizar variantes culturales o específicas del huésped. Sin embargo, en otras áreas de la Nematología de frutales la tasa de reproducción ha tenido el propósito básico de caracterizar variantes patogénicas dentro de una misma especie de nematodo. Éste ha sido el caso del plátano, donde diversas poblaciones de *Radopholus similis* han sido evaluadas en su comportamiento patogénico por su capacidad reproductiva en la planta (Sarah *et al.*, 1993; Fallas *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 1996). En términos estrictos, la capacidad reproductiva de un nematodo sólo vale para interpretar la patogenicidad cuando se la refiere a su huésped específico. Sin embargo, en el caso del cultivo de plátano se ha encontrado que existe una buena correlación entre la capacidad patogénica de diferentes aislados de *R. similis* y la tasa de reproducción de los mismos en cultivos axénicos sobre discos de zanahoria (Fallas y Sarah, 1995; Stoffelen *et al.*, 1999).

### **3.1.2.2. La compatibilidad planta-nematodo a través de las diferentes etapas del parasitismo y su vinculación con la capacidad reproductiva**

El ciclo de infección de un nematodo fitoparásito, considerando el transcurso de una generación completa, puede concebirse como una sucesión de fases. Cada una de estas fases está mediada por los mecanismos propios de la interrelación huésped-parásito, sobre todo en aquellas especies más evolucionadas de nematodos endoparásitos sedentarios (Lewis, 1986). Podemos concebir que el cociente entre el número de individuos al comienzo de una fase y el número de individuos al final de la misma depende de una tasa variable de acuerdo con las características de cada uno de los organismos que conforman el patosistema. Al cabo de un ciclo de infección o del período que se haya establecido, el balance de la totalidad de las fases se traduce en un resultado que nos da la medida de la compatibilidad entre planta y nematodo y cuya expresión numérica es la tasa de reproducción.

En la figura 3.1 se presenta un ejemplo de esquema de las diferentes fases de un ciclo de infección, en un ejemplo aplicable básicamente a *Meloidogyne* spp.. En el mismo, el período que transcurre entre el estado de huevo y la diferenciación sexual se considera como "etapa regresiva". En efecto, sólo una fracción de los huevos que conforman el inóculo a partir del cual se inicia el ciclo de infección (parámetro  $P_i$  en la fórmula de  $R_f$ ), llegará a convertirse en hembras fértiles. A su vez, hasta llegar a este último estado, el número remanente de individuos será cada vez menor, según se pase de una fase a la sucesiva. Una vez que ha tenido lugar la diferenciación sexual, comienza en las hembras la reproducción propiamente dicha, con o sin fecundación según la biología de cada especie: se producen los huevos que, como tales o una vez eclosionados, conformarán el inóculo de la segunda generación o ciclo de infección (parámetro  $P_f$  de la fórmula de  $R_f$ ). En esta fase de reproducción es donde tiene lugar la ganancia neta en términos de población, y por eso nos referimos a ella como "etapa progresiva".



**Fig. 3.1.** Fases sucesivas en el ciclo de infección de un nematodo fitoparásito y su vinculación con la capacidad reproductiva.

Como hemos dicho, cada una de las fases descritas en el esquema está mediada por la interrelación planta-nematodo. Las fases que anteceden al ingreso del nematodo a la raíz (eclosión de los huevos, localización de la raíz y reconocimiento de la superficie radical) parecen estar influidas en particular por el estímulo que ejercen los exudados radicales, sobre todo en nematodos formadores de quistes. En muchas especies la eclosión de las formas juveniles infectivas obedece al estímulo de exudados radicales específicos (Perry, 1987) y este mecanismo explica una mayor o menor amplitud de la gama de huéspedes.

Esto se verifica especialmente en *Heterodera* spp. (Tefft y Bone, 1985), aunque ha podido comprobarse también en otras especies como *M. hapla* (Brzeski y Hendricks, 1971) y *Rotylenchulus reniformis* (Khan, 1985a). La localización de la raíz por el nematodo también responde al estímulo de sustancias aleloquímicas o a señales físicas (Perry y Aumann, 1998) que pueden explicar fenómenos de especificidad parasítica. Lee y Evans (1973) señalan en este sentido que, si bien el fenómeno suele ser no específico, en ocasiones la atracción que las raíces de una planta determinada ejercen sobre el parásito está correlacionada con la capacidad de aquélla de servir como huésped. Aparentemente, aquellas especies con un rango de huéspedes más amplio responden a estímulos menos específicos. En el caso, por ejemplo, de *M. incognita*, un nematodo con muy baja especialización parasítica, el movimiento de los juveniles de segunda edad (J<sub>2</sub>) hacia las raíces parece responder a gradientes de temperatura (Dusenberry, 1989) y de concentración de CO<sub>2</sub> (Dusenberry, 1986; Pline y Dusenberry, 1987). En forma similar, una serie de estímulos físicos y químicos determinan el reconocimiento de la superficie radical y la elección del sitio de ingreso a la raíz. Posteriormente, la migración hacia los tejidos donde habrá de establecerse el sitio de alimentación, también obedece al reconocimiento, por parte del parásito, de características particulares que presenta el huésped compatible en tales tejidos.

La última fase de la etapa regresiva, la diferenciación sexual de los juveniles, presenta en muchas especies de nematodos fitoparásitos una fuerte vinculación con aspectos relacionados con la compatibilidad huésped-parásito. En efecto, al contrario de lo que ocurre con la mayoría de los animales, en muchas especies de nematodos la determinación del sexo está gobernada por factores ambientales. Una de las circunstancias que ha mostrado tener mayor influencia en este sentido es la disponibilidad de nutrientes (Poinar Jr., 1983). Bajo condiciones de deficiencia nutricional, tal como la que puede presentarse cuando un nematodo parasita a un huésped inadecuado, existe una tendencia al predominio de machos respecto de hembras en la población. Esta circunstancia se ha verificado en *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens (Trudgill, 1967) y en *R. reniformis* (Khan, 1985b). Del mismo modo, se ha observado que en poblaciones de *Meloidogyne* spp. que crecen sobre plantas resistentes, el desarrollo de las hembras se ve disminuido de forma considerable y esto termina por afectar la proporción de sexos (Hansen y Hansen, 1988). Las carencias nutricionales propias de la alimentación sobre un huésped no compatible también pueden conducir al desarrollo de hembras estériles o a la incapacidad de alcanzar la madurez sexual.

El déficit nutricional también puede tener efecto sobre el rendimiento de la etapa progresiva del ciclo de infección. La fecundidad, medida como el número de huevos

producido por una hembra fértil, se ve disminuida ante la carencia de determinados nutrientes esenciales (Bolla, 1979). Estos efectos se han comprobado fundamentalmente sobre nematodos saprófitos o fungívoros (Fisher, 1969; Bottjer *et al.*, 1985), pero la evidencia recogida por Duncan y Eissenstat (1993) en experimentos llevados a cabo con *T. semipenetrans* sugiere que factores nutricionales afectan la fecundidad también en nematodos fitoparásitos.

### **3.1.3. MECANISMOS ASOCIADOS A LA REDUCCIÓN DE CRECIMIENTO EN PLANTAS PARASITADAS POR NEMATODOS**

#### **3.1.3.1. Aspectos generales**

El efecto más aparente del parasitismo de nematodos sobre la planta es una reducción general del crecimiento (Dropkin, 1989). Los mecanismos que explican esta disminución, y la merma consecuente en los rendimientos, son de naturaleza múltiple y compleja y afectan tanto a las células directamente expuestas al parasitismo como a la planta entera. Según Sidhu y Webster (1981), los nematodos reducen el crecimiento de las plantas debido a que destruyen la estructura de las células y consumen o eliminan sus contenidos, interfieren en los procesos fisiológicos normales y modifican la expresión genética en el huésped.

La naturaleza de las alteraciones que los nematodos causan a nivel citológico, histológico y fisiológico está determinada fundamentalmente por su hábito parasítico. Por tal entendemos el comportamiento que, desde el momento en que se produce el contacto con los tejidos radicales, adopta cada especie con el fin de proveerse de los nutrientes que le suministra la planta huésped. Por este motivo el término "hábito parasítico" se asimila muchas veces a "estrategia de alimentación" y las especies que comparten características similares en estos aspectos se reúnen en "grupos tróficos". Resumiendo conceptos que se adelantaron anteriormente (ver 2.4.2), recordaremos que dentro de los nematodos que atacan a las raíces podemos distinguir los siguientes grupos tróficos: ectoparásitos migratorios, ectoparásitos sedentarios (semiendoparásitos), endoparásitos migratorios y endoparásitos sedentarios. El efecto del parasitismo de los nematodos puede dividirse entre el efecto perjudicial a nivel celular y el que se produce a nivel de procesos fisiológicos de planta entera. Inicialmente nos referiremos a los aspectos citopatológicos. Para ello, dirigiremos nuestra atención en particular al estudio de tales aspectos en plantas infectadas por *Meloidogyne* spp., dentro de los endoparásitos sedentarios, y a *Pratylenchus* spp., dentro de los endoparásitos migratorios.

### **3.1.3.2. Bases citológicas asociadas a la reducción de crecimiento en plantas parasitadas por nematodos**

A través de su evolución, los nematodos fitoparásitos sedentarios han desarrollado relaciones nutricionales muy especializadas y complejas con sus huéspedes. Esto atiende a la circunstancia de que, para satisfacer de las demandas inherentes al desarrollo de su aparato genital y a su reproducción, estos nematodos deben proveerse de los nutrientes suministrados por una o por unas pocas células. En efecto, los cambios morfológicos que el nematodo sufre cuando llega al sitio permanente de alimentación determinan una pérdida de movilidad que será, en el caso de las hembras, permanente. Estos sitios de alimentación deberán soportar prolongadamente la sustracción de nutrientes por parte del parásito, lo cual sólo se hace posible mediante la aparición de los llamados "cambios adaptativos" en la célula (Dropkin, 1969). El éxito de la relación parasítica exige un balance entre la satisfacción de las necesidades metabólicas de la célula y la provisión de los nutrientes requeridos para completar el ciclo vital del nematodo que, generalmente, nunca es inferior a los 2 meses (Jones, 1981). La penetración en las raíces la realizan J<sub>2</sub> a través de algún punto de la zona subapical donde la endodermis presenta escaso desarrollo y no constituye, por tanto, una barrera física para el ingreso hacia el interior (Wyss *et al.*, 1992). El nematodo avanza hasta el tejido cortical y una vez allí la migración continúa intercelularmente hasta llegar al cilindro vascular en diferenciación (Sijmons *et al.*, 1991). El avance a través del espacio intercelular se realiza recurriendo a la separación de la laminilla media por medios mecánicos a través de golpes de estilete, sin haberse precisado hasta la fecha si también concurren mecanismos enzimáticos en el proceso. Cada juvenil establece su sitio permanente de alimentación una vez que alcanza el cilindro vascular (Hussey y Williamson, 1998). Este sitio consiste en un conjunto de grandes células modificadas llamadas "células gigantes", caracterizadas por la presencia de muchos núcleos de gran tamaño, altamente lobulados, con nucleolos prominentes, un alto número de orgánulos, citoplasma denso con altas tasas metabólicas y paredes engrosadas e invaginadas. Los nematodos absorben los nutrientes del citoplasma directamente o a través de tubos de alimentación sintetizados con tal propósito mediante las secreciones procedentes de las glándulas subesofágicas dorsales (Hussey y Mims, 1991).

El efecto que el hábito parasítico de los nematodos endoparásitos migratorios provoca a nivel citológico e histológico es bien diferente. Los nematodos del género *Pratylenchus* penetran en la raíz mediante perforaciones realizadas por el estilete que atraviesan una célula epidérmica y su cortical adyacente (Zunke, 1990). La penetración también puede ocurrir a través del punto de emergencia de raicillas laterales o del punto por

donde ingresaron previamente otros nematodos. Una vez dentro de la raíz, el nematodo migra intracelularmente a través del tejido cortical perforando las paredes celulares con sucesivos golpes del estilete. Los nematodos pueden ir alimentándose brevemente de las células que van alcanzando con su estilete antes de pasar a través de ellas, pero la provisión de nutrientes tiene lugar fundamentalmente al llegar a determinadas células donde la succión puede durar varias horas. Los cambios que se producen en la célula y que al final desembocan inevitablemente en su muerte, incluyen pérdida de turgencia e incremento gradual en el tamaño del núcleo. Las células adyacentes al cilindro cortical también se ven alteradas, y en las mismas puede observarse que ocurre una deposición de taninos, se pierde la integridad de las membranas y se degeneran los orgánulos (Townshend *et al.*, 1989). Este efecto es más pronunciado en la endodermis pero puede alcanzar a las células de la estela. Los nematodos lesionadores nunca penetran hasta llegar al cilindro vascular (Castillo *et al.*, 1998b). La endodermis ofrece resistencia a ser traspasada por *Pratylenchus* spp. y se ha especulado que este fenómeno obedece a una barrera física o la poca capacidad que tiene este tejido de proveer de nutrientes a los nematodos (Thomason *et al.*, 1976).

### **3.1.3.3. Bases fisiológicas asociadas a la reducción de crecimiento en plantas parasitadas por nematodos**

Los nematodos endoparásitos provocan también alteraciones sobre los procesos fisiológicos que involucran a la planta entera. A menudo, tales procesos están interrelacionados de tal manera que es difícil caracterizar la secuencia precisa de eventos que resultan en un efecto perjudicial sobre el crecimiento de la planta. De cualquier manera, se puede afirmar que todos los efectos del parasitismo del nematodo derivan del daño directo que se realiza al sistema radical y, por tanto, todos los perjuicios sobre las funciones a nivel de planta entera se originan a partir de los desórdenes verificados en la fisiología de la raíz. Por ello, además de la disminución en el crecimiento, los síntomas asociados al parasitismo por nematodos a menudo son marchitez temporal y signos de deficiencias nutricionales en las hojas, manifestaciones de alteración en dos funciones radicales básicas como son la absorción de agua y la nutrición mineral, respectivamente.

Las funciones fisiológicas alteradas de forma más dramática por el parasitismo de nematodos son aquellas vinculadas al mantenimiento de relaciones hídricas adecuadas dentro de la planta. Los nematodos provocan una reducción en la absorción de agua debido a la destrucción mecánica que provocan en las raíces y a la consiguiente pérdida de biomasa funcional (Evans *et al.*, 1977; Meon *et al.*, 1978; Fatemy y Evans, 1982). Sin embargo, se

sabe que las relaciones hídricas en la planta se ven afectadas en etapas tempranas de la infección cuando el parasitismo aún no ha originado destrucción de tejidos ni ha reducido la relación raíz/parte aérea (Meon *et al.*, 1978). El parasitismo origina interrupciones en la corriente transpiratoria, caso particularmente pertinente en el caso de aquellos nematodos que afectan a células ubicadas dentro del cilindro vascular. Por otra parte, como respuesta defensiva de la planta pueden aparecer engrosamientos o deposiciones de metabolitos secundarios en la pared de las células epidérmicas y endodérmicas que reducen la permeabilidad de la raíz al agua. Esta situación se ha verificado en particular en nematodos lesionadores de raíz, *Pratylenchus* spp. (Shafiee y Jenkins, 1963). Como consecuencia de los fenómenos señalados la conductividad hidráulica disminuye en raíces sometidas al parasitismo de nematodos, tal como lo confirman estudios llevados a cabo con *Meloidogyne* spp. (Meon *et al.*, 1978; Wilcox-Lee y Loria, 1986) y con *Pratylenchus* spp. (Kaplan *et al.*, 1976; Kimpinsky, 1979; Kotcon y Loria, 1986).

Las alteraciones en la relación agua-planta a nivel radical se traducen en desórdenes hídricos que se verifican en la parte aérea, como son la caída del potencial hídrico de las hojas y alteraciones en los valores normales de conductividad estomática, transpiración y eficiencia hídrica. La reducción en el potencial hídrico de las hojas pudo ser comprobada en plantas inoculadas con *Meloidogyne* spp. en múltiples experimentos y siempre en etapas tempranas de la infección (Meon *et al.*, 1978; Wilcox-Lee y Loria, 1986, 1987a). Esta reducción del potencial hídrico en las hojas no pudo comprobarse en etapas tempranas de infección artificial con *Pratylenchus* spp. (Kotcon y Loria, 1986), debido probablemente a la hipótesis señalada previamente según la cual los endoparásitos sedentarios provocan más tempranamente caídas en el potencial hídrico a causa del efecto de cavitación o embolia a nivel del cilindro vascular.

A pesar de que la conductividad estomática es una cualidad sujeta a múltiples condiciones ambientales de control y, por tanto, resulta muy difícil cuantificar el efecto que sobre la misma tiene un factor aislado, parece existir un patrón generalizado de reducción en las plantas infectadas por nematodos (Wilcox-Lee y Loria, 1987b). El efecto de la infección artificial con nematodos sobre el volumen de agua transpirada y sobre la eficiencia hídrica (cantidad de materia seca producida por unidad de agua transpirada) no está determinado aún con total certeza y los resultados de las diferentes investigaciones en este campo han sido contradictorios. La naturaleza compleja de estos fenómenos seguramente explica las controversias encontradas en este aspecto. Sin embargo, podemos concluir que el efecto de los nematodos sobre las relaciones hídricas de la planta huésped puede considerarse un mecanismo importante de patogénesis. Hay unanimidad en atribuir a nematodos

endoparásitos de raíz una reducción en el potencial hídrico de la hoja y se acepta que el estrés hídrico moderado reduce severamente el crecimiento vegetativo, en particular de la parte aérea (Wilcox-Lee y Loria, 1987b), con lo cual queda abierta una vía irrefutable para establecer un vínculo causal entre ambos fenómenos.

Otra función del sistema radical que sufre el efecto perjudicial del parasitismo de los nematodos es la nutrición mineral. La magnitud de la alteración varía ampliamente de acuerdo con la especie de nematodo que se considere, el huésped, las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido desde el comienzo de la infección (Hussey, 1985; Melakerberhan y Webster, 1993). La reducción en la absorción de nutrientes minerales obedece fundamentalmente a que la superficie activa para la misma se ve reducida tanto por el daño mecánico directo, como por la disminución de emisión de raíces laterales y la elongación de las ya existentes. El perjuicio causado por los nematodos a la nutrición mineral no se restringe al proceso de absorción, sino que afecta igualmente a la traslocación de los mismos hacia la parte aérea. Este fenómeno es particularmente notable en el caso de aquellas especies que se alojan en el cilindro vascular, i.e., *Meloidogyne* spp. (Hussey y Williamson, 1998). En algunos casos, esta circunstancia determina un comportamiento diferencial entre los diversos elementos minerales esenciales y un desajuste entre los mismos. Así, aquellos nutrientes cuya vía de traslocación es preferentemente simplástica, sufren de manera particular este efecto y terminan, de esta manera, concentrándose en la raíz y haciendo sentir su deficiencia en la parte aérea. Esto permitiría explicar por qué N y K son elementos particularmente sensibles al parasitismo por nematodos noduladores, según se demuestra en diversas investigaciones (Melakerberhan *et. al.*, 1985, 1987). Sin embargo, otros elementos como Ca no se ven tan afectados o incluso se ven favorecidos en términos proporcionales comparados con otros elementos (Melakerberhan *et al.*, 1987).

Como se ha indicado anteriormente, las desviaciones fisiológicas sobre los procesos fisiológicos normales que tienen lugar con el parasitismo de los nematodos, y que explican la reducción en el rendimiento de las plantas afectadas, no se limitan a las funciones radicales sino que abarcan igualmente a procesos que ocurren en órganos aéreos o a nivel de planta entera. Wallace (1987), adoptando un punto de vista sistémico para el problema, sugiere que las alteraciones provocadas por el parasitismo de los nematodos modifican el proceso regulador que deriva en la estabilidad u homeostasis, característica de las plantas sanas. La alteración en determinados procesos normales desata reacciones en las rutas metabólicas y mecanismos fisiológicos que tienen lugar a continuación y dependen de ellos. Esta sucesión de alteraciones en mecanismos consecutivos y mutuamente dependientes es lo que se conoce como "efecto cascada" (Kuc, 1978). El parasitismo de los nematodos causa efectos

perjudiciales igualmente sobre la fotosíntesis, como ha quedado documentado en algunas revisiones realizadas al respecto (Melakerberhan y Webster, 1993; Hussey y Williamson, 1998). De cualquier manera, la información experimental reunida es aún limitada e insuficiente. La reducción en la cantidad total de CO<sub>2</sub> asimilado ha sido demostrada en patosistemas que involucran a nematodos noduladores tal como tomate-*M. javanica* (Loveys y Bird, 1973; Wallace, 1974; Meon *et al.*, 1978), vid-*M. incognita* (Melakerberhan y Ferris, 1989; Melakerberhan *et al.*, 1990) y judía-*M. incognita* (Melakerberhan *et al.*, 1984, 1985). Por otra parte se comprobó que la reducción en la asimilación de CO<sub>2</sub> es proporcional a la duración de la infección y a la densidad de inóculo empleada (Melakerberhan *et al.*, 1986). Al no existir un contacto directo entre los nematodos noduladores y lesionadores de raíz y los órganos aéreos involucrados en la fotosíntesis es lícito suponer que la reducción en la producción neta de fotoasimilados responde a mecanismos indirectos, esto es, que existen procesos intermedios cuya alteración es la que determina, en última instancia, la disfunción de la fotosíntesis normal. En efecto, la reducción en la función fotosintética obedece, entre otras razones, a la reducción del área foliar (Poskuta *et al.*, 1986), a una menor concentración de clorofila como consecuencia del déficit de N (Melakerberhan *et al.*, 1985) y a la reducción de las tasas de intercambio gaseoso como consecuencia del estrés hídrico y alteraciones en la función estomática normal (Fatemy *et al.*, 1985; Saeed *et al.*, 1997).

### **3.1.4. PATOGENICIDAD DE NEMATODOS SOBRE FRUTALES DE CLIMA TEMPLADO**

#### **3.1.4.1. Las pruebas de patogenicidad en especies frutales**

El objetivo final de las ciencias auxiliares de la agronomía es incrementar el rendimiento y mejorar la calidad de los productos de cosecha, así como aumentar la eficiencia económica de las empresas dedicadas a la producción de estos productos (Rouse, 1988). Situada dentro de este marco, la Nematología pretende, a través de las pruebas de patogenicidad, responder en última instancia a la siguiente pregunta: ¿en qué medida se reducirá el crecimiento del cultivo de interés ante la infección por un nematodo fitoparásito? Evidentemente, la estrategia que parece más adecuada para responder a esta inquietud es diseñar experimentos con inoculación artificial, en condiciones controladas, donde el rendimiento sea uno de los parámetros de la evaluación final. Esto resulta bastante asequible en plantas herbáceas anuales, donde el efecto del parasitismo sobre el rendimiento puede evaluarse al cabo de períodos relativamente cortos y con relativamente pocos recursos. La Fitonematología de especies perennes leñosas, particularmente la de

árboles frutales chocha, en cambio, con el inconveniente de los prolongados periodos que transcurren hasta poder evaluar adecuadamente el rendimiento, a los que se suman las mayores exigencias de superficie, insumos y mano de obra que demanda realizar experimentos con estos cultivos.

Si bien existen algunos antecedentes de pruebas de patogenicidad plurianuales con inoculación artificial sobre frutales realizadas en microparcels (Hernández-Dorrego *et al.*, 1999; Nyczepir *et al.*, 1997), en muy raras ocasiones han incluido el rendimiento como parámetro de evaluación (O'Bannon y Tomerlin, 1973; Huettel y Hammerschlag, 1993). Las estimaciones del efecto de los nematodos sobre el rendimiento de los frutales son imprecisas y responden a sondeos realizados sobre una base regional y en condiciones poco rigurosas. El empleo de nematicidas ha permitido, por ejemplo, comprobar las diferencias que ocurrían en la producción, bajo condiciones ecológicas similares, en terrenos infestados naturalmente con y sin tratamiento de productos nematicidas. Este tipo de aproximaciones constituye la base del cálculo de las pérdidas económicas debidas a los nematodos en frutales (McKenry, 1989a). Los ensayos plurianuales que aprovechan la infestación natural de los suelos para comprobar la eficiencia de los tratamientos nematicidas (Abawi y Mai, 1978; Sharpe *et al.*, 1993) constituyen la aproximación más rigurosa a la inclusión del rendimiento en un prueba de patogenicidad, si bien el elevado error experimental hace que sean poco extrapolables.

En vista de las dificultades que presenta incluir el rendimiento como parámetro de evaluación, las pruebas de patogenicidad de nematodos sobre frutales recurren a otra serie de medidas que reflejan el grado en que la actividad normal de la planta está afectada y que, directa o indirectamente, se vinculan a la producción. Las pruebas de patogenicidad en Nematología de árboles frutales pueden incluir, en su evaluación, variables de las siguientes clases:

1. Alteraciones anatómicas causadas directamente por el parasitismo: se incluye aquí la medida de la severidad de los síntomas hiperplásicos provocados en raíz por *Meloidogyne* spp., registrada a través del índice de nodulación (Marull y Pinochet, 1991)

2. Alteraciones histológicas causadas directamente por el parasitismo: muchos estudios de patogenicidad exploran los cambios ocurridos en los tejidos como consecuencia del parasitismo (Pitcher *et al.*, 1960; Kaplan y Timmer, 1982; Marull y Pinochet, 1991; Fernández *et al.*, 1992).

3. Alteraciones en las funciones fisiológicas normales causadas por el parasitismo:

anteriormente se han citado algunas de las múltiples disfunciones que acarrea el parasitismo de los nematodos (ver 3.1.3.3). Muchas de las pruebas de patogenicidad efectuadas en frutales registran variables asociadas a la desviación de funciones fisiológicas normales, tales como la absorción de nutrientes y agua. En este sentido se incluyen, por ejemplo, análisis foliares de minerales (Nasr *et al.*, 1980; Pinochet *et al.*, 1996a; Hernández-Dorrego *et al.*, 1999), análisis de acumulación y partición de diferentes del productos del metabolismo, (Nasr *et al.*, 1980; Nyczepir *et al.*, 1987), la duración de los períodos de dormancia (Pinochet *et al.*, 1993a), etc..

4. Evaluación de mortalidad: en ciertos casos, el síndrome originado por el parasitismo de los nematodos en árboles frutales resulta en la muerte de los mismos. Un ejemplo típico lo constituye el complejo denominado PTSL (Peach Tree Short Life o muerte súbita del melocotonero), causado por *C. xenoplax* en combinación con otros agentes fitopatógenos (ver 2.4.2.1). En estos casos, la evaluación de la incidencia de la mortalidad constituye un parámetro ineludible en las pruebas de patogenicidad (Nyczepir *et al.*, 1997).

5. Reducciones en las tasas de crecimiento de la planta en general o en algún otro órgano diferente al de cosecha: tradicionalmente, se asume que síntomas hipoplásicos como el enanismo o la disminución de tamaño de diferentes órganos están presentes en toda ocasión que exista parasitismo por parte de nematodos. Por otro lado, se admite como un hecho general y dentro de un modelo con algunas restricciones, que existe una relación directa entre la biomasa total de la planta y la biomasa de los productos de cosecha, es decir, el rendimiento. Esta relación resulta muy clara y evidente en cultivos anuales herbáceos. Su interpretación se vuelve más difícil de definir en los cultivos perennes leñosos, donde gran parte de la biomasa total cumple funciones exclusivamente estructurales. Sin embargo, la facilidad con que pueden obtenerse las medidas, sumada a la sensibilidad para detectar el efecto del parasitismo en periodos de tiempo relativamente cortos, hace que estos parámetros de crecimiento se empleen de forma habitual en las pruebas de patogenicidad de nematodos sobre árboles frutales.

Dentro de los parámetros de crecimiento empleados más habitualmente en las pruebas de patogenicidad sobre frutales encontramos los siguientes: reducción del peso fresco de la planta entera y la raíz con respecto a un testigo no inoculado (Radewald *et al.*, 1971), longitud del tallo (Hernández-Dorrego *et al.*, 1999), diámetro del tronco (Nyczepir *et al.*, 1997), peso seco de la raíz (O'Bannon *et al.*, 1976), volumen de copa o "canopy" (O'Bannon y Tomerlin, 1973), etc.

### **3.1.4.2. Pruebas de patogenicidad de nematodos sobre olivo: Antecedentes**

La exploración de los antecedentes bibliográficos nos revela la existencia de escasas referencias acerca de pruebas de patogenicidad realizadas sobre el olivo en condiciones controladas. La gran mayoría de ellas han sido mencionadas en la discusión del capítulo precedente con objeto de explicar el riesgo potencial de las especies encontradas en nuestra prospección. A continuación efectuaremos una reseña sistemática sobre aspectos metodológicos de las mismas.

En nuestra revisión hemos sometido a análisis crítico 10 experimentos:

- a) Evaluación de la reacción de diferentes variedades de olivo al nematodo nodulador *M. javanica* (Lamberti y Lownsbery, 1968)
- b) Experimento de la patogenicidad de poblaciones de *Helycotylenchus dihystra*, *Xiphinema elongatum* y *M. javanica* aislados de olivo en Egipto (Diab y El-Eraki, 1968).
- c) Efecto de *P. vulnus* sobre el crecimiento de dos variedades de olivo ('Ascolano' y 'Manzanillo') en invernadero (Lamberti y Baines, 1969a).
- d) Patogenicidad de cuatro especies de *Meloidogyne* spp. sobre tres variedades de olivo (Lamberti y Baines, 1969b).
- e) Evaluación del comportamiento del olivo como huésped de *Xiphinema americanum* (Lamberti, 1969c).
- f) Patogenicidad de tres biotipos de *Tylenchulus semipenetrans* sobre dos variedades de olivo (Lamberti y Baines, 1970).
- g) Comportamiento de algunos cultivares de olivo frente a la infección por *P. vulnus*, *Rotylenchulus macrodoratus*, *M. incognita* y *T. semipenetrans* (Inserra *et al.*, 1981).
- h) Reacción de diferentes cultivares de olivo al parasitismo por *Meloidogyne* spp. (Sassanelli *et al.*, 1997).
- i) Relaciones entre nematodos parásitos y *Veticillium dahliae* en olivo (Lamberti *et al.*, 2001).
- j) Respuesta enzimática de diferentes variedades de olivo al parasitismo por *Xiphinema index* Thorne y Allen (Ridolfi *et al.*, 2001).

Incluimos, en esta revisión un undécimo ensayo, que si bien no puede considerarse

estrictamente una prueba de patogenicidad ya que explora básicamente aspectos de control, responde en su planteamiento metodológico a una típica prueba de patogenicidad, por realizarse mediante inoculación artificial en condiciones controladas e incorporar parámetros de evaluación propios de tales experimentos:

k) Estudio del efecto de fertilizantes nitrogenados sobre el crecimiento del olivo en relación con infestaciones de *R. reniformis* (Badra y Khattab, 1980).

El análisis de la literatura enunciada precedente nos permite comprobar que un total de 12 especies de nematodos fitoparásitos han sido evaluadas en condiciones controladas en relación a su potencial patogénico sobre el olivo. En este grupo se incluyen cuatro especies de nematodos noduladores (*M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* y *M. javanica*), tres especies de nematodo daga (*X. americanum*, *X. elongatum* y *X. index*), dos especies de nematodos reniformes (*R. macrodoratus* y *R. reniformis*), un nematodo espiral (*H. dihystra*) y el nematodo de los cítricos (*T. semipenetrans*). Las especies estudiadas con mayor frecuencia han sido *M. javanica* y *M. incognita*, ambas incluidas en cuatro trabajos, seguidas por *P. vulnus*, cuya patogenicidad se estudió desde diferentes perspectivas en tres de los experimentos recogidos en la lista y *T. semipenetrans*, incluida en dos experimentos. Las restantes especies resultaron incluidas en uno solo de los trabajos.

Confirmando las apreciaciones genéricas referidas a los frutales en el apartado anterior, nuestra exploración permite descubrir que ninguna de las pruebas de patogenicidad efectuadas presenta carácter plurianual y que en ningún caso se evalúa el rendimiento. El período más largo durante el cual las plantas ensayadas se mantuvieron expuestas al parasitismo de los nematodos antes de ser evaluadas fue de dieciocho meses (Lamberti y Baines, 1970; Inserra *et al.*, 1981; Lamberti *et al.*, 2001).

La reproducción, considerada como factor reproductivo o como población final, fue evaluada en todos las pruebas de patogenicidad, con excepción de cuatro (Lamberti y Lownsbery, 1968; Lamberti y Baines, 1969b, 1970; Ridolfi *et al.*, 2001). El análisis de la evolución del diseño experimental a lo largo del tiempo permite comprobar una progresión sostenida desde las primeras pruebas de patogenicidad, que enfatizaban excesivamente en criterios subjetivos de apreciación de las alteraciones morfológicas e incluían el peso fresco final como único parámetro de crecimiento (Lamberti y Lownsbery, 1968; Diab y El-Eraki, 1968; Lamberti, 1969; Lamberti y Baines, 1969a, 1969b, 1970), hasta las pruebas más recientes, que, o bien incluyen una serie más compleja de determinaciones de parámetros de crecimiento (Badra y Kattab, 1980; Sassanelli *et al.*, 1997; Lamberti *et al.*, 2001), o bien

exploran aspectos más particulares relativos al efecto del parasitismo sobre la bioquímica del huésped (Badra y Kattab, 1980; Ridolfi *et al.*, 2001). Las alteraciones histológicas verificadas en la raíz son examinadas en uno de los trabajos como uno de los aspectos interesantes en la descripción de la relación huésped-parásito (Inserra *et al.*, 1981). Del mismo modo el registro de la nodulación mediante escalas objetivas de severidad constituyó un parámetro ineludible en casi todas aquellas pruebas que incluyeron a *Meloidogyne* spp. en la evaluación (Lamberti y Lownsbery, 1968; Lamberti y Baines, 1969b; Sassanelli *et al.*, 1997; Lamberti *et al.*, 2001). Otra escala de evaluación de la alteración morfológica del sistema radical fue empleada para *X. index* (Ridolfi *et al.*, 2001).

Otros aspectos relevantes del parasitismo que han sido escasamente considerados en las pruebas de patogenicidad desarrolladas sobre el olivo, es el comportamiento diferencial de distintos cultivares frente al parasitismo de una misma especie de nematodo (Lamberti y Lownsbery, 1968; Lamberti y Baines, 1969a, 1969b, 1969b; Inserra *et al.*, 1981; Sassanelli *et al.*, 1997; Lamberti *et al.*, 2001; Ridolfi *et al.*, 2001) y el efecto de la interacción entre nematodos y hongos fitopatógenos (Lamberti *et al.*, 2001). La relación dosis-respuesta es un aspecto que permanece bastante inexplorado en el estudio de los patosistemas olivo-nematodo, si bien muchas de las pruebas incluidas en el presente análisis han considerado niveles variables de inóculo en sus diseños experimentales (Lamberti y Lownsbery, 1968; Lamberti y Baines, 1969a, 1969b; Ridolfi *et al.*, 2001).

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. SELECCIÓN Y MANTENIMIENTO DE POBLACIONES DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS**

Con objeto de desarrollar los experimentos contenidos en el presente capítulo, algunas de las poblaciones identificadas en las prospecciones descritas en el Capítulo II se aislaron, se multiplicaron como cultivos puros y se conservaron en la colección de nematodos del Laboratorio de Fitonematología del IAS-CSIC. Los materiales y métodos empleados para cada una de estas especies difirieron en función del grupo trófico y son los que se detallan a continuación.

#### **3.2.1.1. Aislamiento y multiplicación de *Meloidogyne* spp.**

Se seleccionó una población de cada una de las tres especies de *Meloidogyne* spp.

consideradas de mayor importancia en las prospecciones, *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, y las tres poblaciones se aislaron y multiplicaron como cultivos puros. El origen de de las poblaciones referidas fue el siguiente: *M. arenaria*, aislada de raíces infectadas de un plantón de olivo cv. Cornicabra procedente de un vivero en Villaverde del Río (Sevilla); *M. incognita*, aislada de raíces infectadas de un plantón de olivo cv. Manzanilla procedente de un vivero en Alcolea (Córdoba); y *M. javanica*, aislada de raíces infectadas de un plantón de olivo cv. Picual procedente de un vivero en Córdoba.

Los cultivos puros de *Meloidogyne* spp. se obtuvieron según la técnica descrita por Jepson (1987): plántulas de tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill.) mantenidas en sustrato estéril se inocularon con una única masa de huevos de la población deseada de *Meloidogyne* spp. Las masas de huevos se aislaron de las raíces de plantones de olivo infectados siguiendo técnicas habituales de disección directa (Shurtleff y Averre, 2000).

Las plántulas de tomate se obtuvieron de semillas del cv. susceptible Tres Cantos (Semillas Fitó, S.A., Barcelona); las semillas se desinfestaron superficialmente en una suspensión de NaOCl al 20 % al durante 3 min, se lavaron en agua destilada estéril y se pregerminaron en cámaras húmedas a 25° C, en oscuridad, durante 72 h. Posteriormente, las semillas germinadas se sembraron en pequeños cubiletes de plástico de 50 cm<sup>3</sup> ("jiffies", 1 semilla por cada uno) conteniendo vermiculita esterilizada, y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 25 ± 1° C, 60-90% de humedad relativa, y un fotoperiodo de 12 h de luz blanca fluorescente y próxima a la UV de 360 ± 24,7 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, durante 25-30 días. En este momento, cuando las plantas presentaban tres hojas verdaderas, se efectuó el transplante a macetas de arcilla de 500 cm<sup>3</sup> conteniendo una mezcla estéril de arena y limo en proporción 2:1 v/v.

Para la inoculación, se efectuó un orificio de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y 2-4 cm de profundidad en el sustrato de las macetas con ayuda de una varilla de vidrio. La masa de huevos se disolvió en NaOCl 0,5% y los huevos liberados se inocularon en el fondo del orificio. Sesenta días después de esta inoculación se procedió a la renovación del cultivo con objeto de mantener e incrementar el inóculo. Para ello, las plantas de tomate se extrajeron de la maceta y de ellas se separaron las raíces para proceder a la extracción de los huevos, siguiendo el método descrito por Hussey y Barker (1973). Las raíces infectadas se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm que se colocaron en un frasco de 1 L y a los mismos se les agregó una suspensión de NaOCl al 0,5 % hasta cubrirlos totalmente. El frasco se agitó enérgicamente durante 2 m y su contenido se filtró a través de un tamiz de 21 cm de diámetro y 75 μm de malla encajado sobre otro tamiz de igual diámetro y 5 μm de

malla. De esta forma, los restos vegetales groseros se retuvieron en el primer tamiz, mientras que en el segundo quedaron conservados los huevos y juveniles junto con los restos vegetales más finos. El contenido del primer tamiz se eliminó tras ser lavado sobre el tamiz fino con abundante agua corriente, y el material retenido en el tamiz fino (huevos + J<sub>2</sub>) se centrifugó y utilizó para inocular plantas de tomate cultivadas en suelo estéril similares a las empleadas anteriormente. Estas operaciones de extracción de inóculo y reinoculación fueron repetidas de forma continuada cada 60 días con objeto de mantener e incrementar las poblaciones de *Meloidogyne* spp..

### **3.2.1.2. Identificación específica y racial de *Meloidogyne* spp. sobre huéspedes diferenciales**

Una vez garantizada la disponibilidad de suficiente cantidad de inóculo, una fracción de las poblaciones de *Meloidogyne* spp. incorporadas a la colección se utilizó para la inoculación de huéspedes diferenciales, en la prueba comúnmente conocida como "Test de Sasser" (Hartman y Sasser, 1985). Esta inoculación se efectuó con objeto de confirmar los resultados de la identificación morfológica a nivel específico y de determinar las razas patogénicas en *M. incognita* y *M. arenaria*. Para ello, siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente para la obtención de plántulas de tomate, se obtuvieron plántulas sanas de las siguientes especies vegetales y cultivares: tomate cv. Rutgers, pimiento (*Capsicum annum* L.) cv Early California Wonder, cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) cv. Florunner, sandía (*Citrullus lanatus* Tunb.) cv. Charleston Gray y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) cv. Deltapine 61. Cuando las plantas alcanzaron el estado de tres o cuatro hojas verdaderas se inocularon con 10 ml de solución conteniendo 10.000 huevos y J<sub>2</sub> de la población de *Meloidogyne* spp. considerada.

El experimento se repitió una vez por cada combinación de población de nematodo-planta huésped, con cuatro repeticiones por tratamiento. Las plantas inoculadas se mantuvieron durante 60 días en cámara de crecimiento ajustada las condiciones señaladas anteriormente. Al final de este período, las plantas se extrajeron de sus macetas y se evaluó la nodulación del sistema radical de acuerdo con una escala 0-10, en donde 0 = planta sana sin nodulación, y 10 = planta con el sistema radical completamente nodulado. Los cultivares específicos fueron considerados resistentes cuando el índice medio de nodulación resultó inferior a 2 y se consideraron susceptibles cuando se superó ese valor. La confirmación de la identificación morfológica y la clasificación en razas patogénicas se obtuvo contrastando los resultados con el patrón estándar formulado por los autores del ensayo.

### **3.2.1.3. Aislamiento y multiplicación de nematodos lesionadores de raíz (*Pratylenchus* spp. y *Zygotylenchus guevarai*)**

Con objeto de obtener inóculo suficiente para la realización de los experimentos previstos en el presente trabajo, se aislaron y multiplicaron varias poblaciones de nematodos lesionadores de raíz considerados de interés. Las poblaciones seleccionadas y su origen fue el siguiente: *P. thornei*, población procedente de raíz infectada de 'Arbequina', Pedrera (Sevilla), *P. fallax* y *P. penetrans*, procedentes de raíces infectadas de 'Arbequina', Pedrera (Sevilla), *P. vulnus*, procedente de raíz infectada de 'Picual', Villaverde del Río (Sevilla) y *Z. guevarai*, procedente de raíz infectada de 'Picual', Huelma (Jaén). Los cultivos puros de nematodos lesionadores de raíz se iniciaron y se mantuvieron siguiendo la técnica de inoculación en discos axénicos de zanahoria (Huettel, 1985; Castillo *et al.*, 1995).

Para la preparación de los discos se seleccionaron zanahorias sanas y enteras de tamaño medio a grande (diámetro mayor superior a 3 cm). Las zanahorias se lavaron superficialmente con abundante agua corriente con objeto de eliminar el suelo adherido a la epidermis. Posteriormente se cortaron y desecharon los dos extremos de la raíz. Una vez completada esta operación, las zanahorias se sumergieron en etanol al 95 % durante 5 minutos. Posteriormente, las zanahorias se flamearon bajo la cabina de flujo laminar y se prepararon los discos según el procedimiento siguiente: la epidermis de la zanahoria y la región cortical adyacente se retiró por completo y se desechó mediante cortes tangenciales efectuados con un pelador o cuchillo esterilizado a la llama. Posteriormente y mediante cortes transversales se formaron discos de aproximadamente 0,5-1 cm de espesor que se depositaron en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro.

Para iniciar el cultivo puro de nematodos lesionadores de raíz, se seleccionó una hembra adulta -a ser posible grávida- de la población de interés, de la suspensión extraída de la muestra raíz. Este ejemplar se desinfectó superficialmente transfiriéndolo a un pocillo que contenía una solución de sulfato de estreptomina al 0,1% durante 12-24 h, y posteriormente a una solución de 120 ppm de cloruro etoxi-etil mercurio durante 2 h. Finalmente, la desinfección superficial se completó realizando dos o tres lavados con agua destilada estéril (ADE), donde se mantuvo a la hembra durante 10-15 min. Una vez completada esta operación, la hembra se transfirió a una gota de ADE colocada en la parte superior de un disco de zanahoria mantenido en la placa de Petri estéril. El disco así inoculado se mantuvo en un incubador microbiológico a una temperatura constante de 25 ± 1° C en oscuridad, durante aproximadamente 45 días. Transcurrido este tiempo se efectuó la extracción de los nematodos contenidos en el disco para su utilización en posteriores inoculaciones. Las placas con los discos de zanahoria infectados fueron cubiertas con ADE

durante 2-4 h bajo cabina de flujo laminar, con objeto de permitir que los nematodos pasaran de los discos infectados al agua. Posteriormente, la suspensión que contenía los nematodos se recogió en tubos estériles de fondo cónico de 50-250 ml. El conjunto de nematodos extraídos y concentrados en el fondo del tubo se desinfectó de forma similar a la descrita anteriormente. Sin embargo, en este caso, para evitar problemas de anaerobiosis, la suspensión de nematodos en sulfato de estreptomicina se colocó en un Erlenmeyer de 250 cm<sup>3</sup> que se cubrió con una película de Parafilm "M" (American National Can, TM) y se incubó en un agitador orbital a 80 rpm y 25° C en oscuridad durante 12-24 h. Finalmente, la suspensión de nematodos desinfectada y lavada con ADE se transfirió nuevamente a un tubo estéril de fondo cónico y tras la decantación se añadió una suspensión de 120 ppm de cloruro etoxi-etil mercúrico. Al cabo de 2 horas, la suspensión se lavó con ADE, se homogeneizó adecuadamente mediante burbujeo con pipeta Pasteur y se depositó sobre nuevos discos de zanahoria para continuar incrementando el inóculo. Estos discos se incubaron en las mismas condiciones indicadas anteriormente, y la operación se repitió de forma continuada para mantener e incrementar las poblaciones de lesionadores de raíz.

#### **3.2.1.4. Aislamiento y multiplicación de nematodos anillados (*Criconemella xenoplax*)**

Se seleccionó una población del nematodo anillado *C. xenoplax*, procedente de la rizosfera de un plantón de olivo cv. Manzanilla proveniente de Alcolea (Córdoba). Para el establecimiento del cultivo puro de esta especie se obtuvieron 100 ejemplares de la suspensión extraída de la muestra de suelo, y se desinfectaron superficialmente por el procedimiento indicado en el apartado anterior. Una vez desinfectados, los ejemplares de *C. xenoplax* se distribuyeron alrededor de la raíz de plántulas de tomate obtenidas siguiendo la metodología expresada en 3.2.1.1 que se habían trasplantado a macetas de arcilla de 500 cm<sup>3</sup> conteniendo una mezcla estéril de arena y limo en proporción 2:1 v/v. Las plantas inoculadas se mantuvieron en condiciones controladas similares a las descritas en 3.2.1.1 durante 90 días, al cabo de los cuales se extrajeron los nematodos del suelo. Este proceso se repitió de forma continuada con objeto de mantener e incrementar el inóculo necesario para los siguientes experimentos.

#### **3.2.1.5. Aislamiento y multiplicación de nematodos espirales (*Helicotylenchus pseudorobustus* y *Helicotylenchus vulgaris*)**

Se seleccionaron dos poblaciones de nematodos espirales, *H. pseudorobustus* y *H. vulgaris*, procedentes de la rizosfera de plantones de 'Hojiblanca' y 'Manzanilla' provenientes

de Córdoba y Pedrera (Sevilla), respectivamente. Para el establecimiento del cultivo puro de estas especies se obtuvieron 100 ejemplares de cada especie de la suspensión extraída de cada muestra de suelo, y se desinfestaron superficialmente por el procedimiento indicado en el apartado 3.2.1.3. Una vez desinfestados, los ejemplares de los nematodos se inocularon alrededor de la raíz de plántulas de tomate siguiendo la metodología expresada en 3.2.1.4 y se mantuvieron en las mismas condiciones descritas en 3.2.1.1 durante 90 días. Asimismo, la extracción y reinoculación continuada siguió el mismo procedimiento expresado anteriormente.

### **3.2.2. PRUEBAS DE CAPACIDAD REPRODUCTIVA**

Estas pruebas se efectuaron con el fin de responder al primero de los objetivos planteados para el presente capítulo (ver 3.1). La prueba fue realizada por primera vez entre los meses de marzo y abril de 1998 y se efectuó una repetición de la misma entre los meses de diciembre de 1998 y enero de 1999. En los experimentos que se describen a continuación se evaluaron seis nematodos que se encontraron en rizosfera y/o raíz de plántulas de olivo en las prospecciones referidas en el Capítulo II, que se valoraron como especies de interés debido a su capacidad patogénica sobre otras especies vegetales y respecto de las cuales no se disponía de ningún dato bibliográfico acerca de su capacidad reproductiva sobre el olivo. Las especies evaluadas fueron los lesionadores de raíz *P. thornei*, *P. fallax* y *Z. guevarai*, el nematodo anillado *C. xenoplax* y los nematodos espirales *H. pseudorobustus* y *H. vulgaris*. La metodología utilizada fue similar en las dos repeticiones, excepto que no se incluyó *P. fallax* en la segunda de ellas debido a la pérdida de la población durante el proceso de preparación del inóculo. Asimismo, la capacidad reproductiva de los nematodos espirales *H. pseudorobustus* y *H. vulgaris* se evaluó en un experimento aparte, debido a que son nematodos de ciclo biológico más largo (Rössner, 1971) y por tanto tuvieron un periodo de evaluación diferente. El experimento llevado a cabo con *Helycotylenchus* spp. no fue repetido.

#### **3.2.2.1. Inóculo utilizado**

En todos los casos se utilizaron las poblaciones que se habían incorporado a la colección de cultivos puros de acuerdo con los procedimientos descritos precedentemente (ver 3.2.1.3, 3.2.1.4 y 3.2.1.5). La suspensión de inóculo de lesionadores de raíz utilizada se obtuvo siguiendo el método descrito por Dunn (1973): los discos de zanahoria se sumergieron en ADE, se trituraron en un homogenizador a 12.600 rpm durante 30 s y los

nematodos se separaron posteriormente por centrifugación y tamizado. El inóculo de *C. xenoplax* y *Helicotylenchus* spp. se obtuvo mediante la extracción del suelo infestado de las plantas de tomate (Coolen, 1979), hasta conseguir el número de ejemplares necesario para los experimentos. En todos los casos, la concentración de la suspensión obtenida se calculó por recuento en cámara de Peter con microscopio óptico y posteriormente se ajustó por dilución en ADE hasta lograr la concentración requerida.

La densidad de inóculo utilizada fue de 1.000 ejemplares (huevos, juveniles y adultos) en el caso de lesionadores de raíz y nematodos espirales y de 100 ejemplares (juveniles y hembras) en el caso de *C. xenoplax*.

### **3.2.2.2. Material vegetal empleado y método de inoculación**

En cada una de las pruebas de capacidad reproductiva se emplearon plantones de olivo de los cvs. Arbequina y Picual de tres meses de edad. Dichos plantones procedían de un vivero comercial, habían sido obtenidos por enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización y transplantados en macetitas plásticas ("jiffies") de aproximadamente 100 cm<sup>3</sup> de capacidad, conteniendo turba.

Para efectuar la inoculación, los plantones de olivo se retiraron de sus contenedores y sus raíces se lavaron hasta desprender toda la turba adherida a las mismas. Los plantones se transplantaron en macetas de arcilla de 400 cm<sup>3</sup> conteniendo una mezcla estéril de arena, limo y turba en proporción 2:1:1 v/v/v. Los tratamientos seleccionados resultaron de la combinación de las especies de nematodos evaluadas en cada uno de los dos cultivares. Se realizaron diez repeticiones por tratamiento en un diseño completamente al azar. La inoculación se efectuó durante el trasplante. Para ello, se aplicó una suspensión de 10 ml conteniendo la cantidad total de inóculo para cada planta que se vertió alrededor de la raíz en el momento del trasplante. Finalizada esta operación, se regó el suelo con un volumen de agua que garantizara el sellado del sustrato, pero que no comprometiera la conservación del inóculo dentro de la maceta ante la posibilidad de eventuales lavados (aproximadamente 50 cm<sup>3</sup>).

### **3.2.2.3. Condiciones controladas de crecimiento de los plantones**

Una vez efectuados el trasplante e inoculación, los plantones se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a las condiciones expresadas en el apartado 3.2.1.1. Las plantas se regaron en días alternos con 100 ml de agua y una semana después del trasplante se realizó una única aplicación de fertilizante granulado completo de

liberación lenta (Osmocote-Mini®, Scotts-Sierra Horticultural Products, Heerten, Holanda) a una dosis de 2 g por maceta. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones hasta el final del experimento, 60 días después de la inoculación, excepto en el caso de las plantas inoculadas con los nematodos espirales que se mantuvieron durante 4 meses.

#### **3.2.2.4. Evaluación de la población nematológica final y análisis estadístico**

Con objeto de evaluar la reproducción de cada una de las especies de nematodos seleccionadas se determinó la población final (Pf) de los nematodos contenida en cada maceta. Esta población final resultó de la suma del número de nematodos presentes en la raíz ( $N_r$ ) más el número de nematodos presentes en el suelo ( $N_s$ ). Ambos parámetros se calcularon realizando un recuento directo sobre las extracciones efectuadas siguiendo el método de centrifugación descrito por Coolen (1979), según los métodos descritos anteriormente (ver 2.2.2.1).

El índice o tasa de reproducción Rf de cada una de las poblaciones en cada uno de los cultivares de olivo se calculó según la siguiente expresión:  $Rf = Pf/Pi$ , donde Rf = índice o tasa de reproducción, Pf = población final ( $N_r + N_s$ ) y Pi = población inicial.

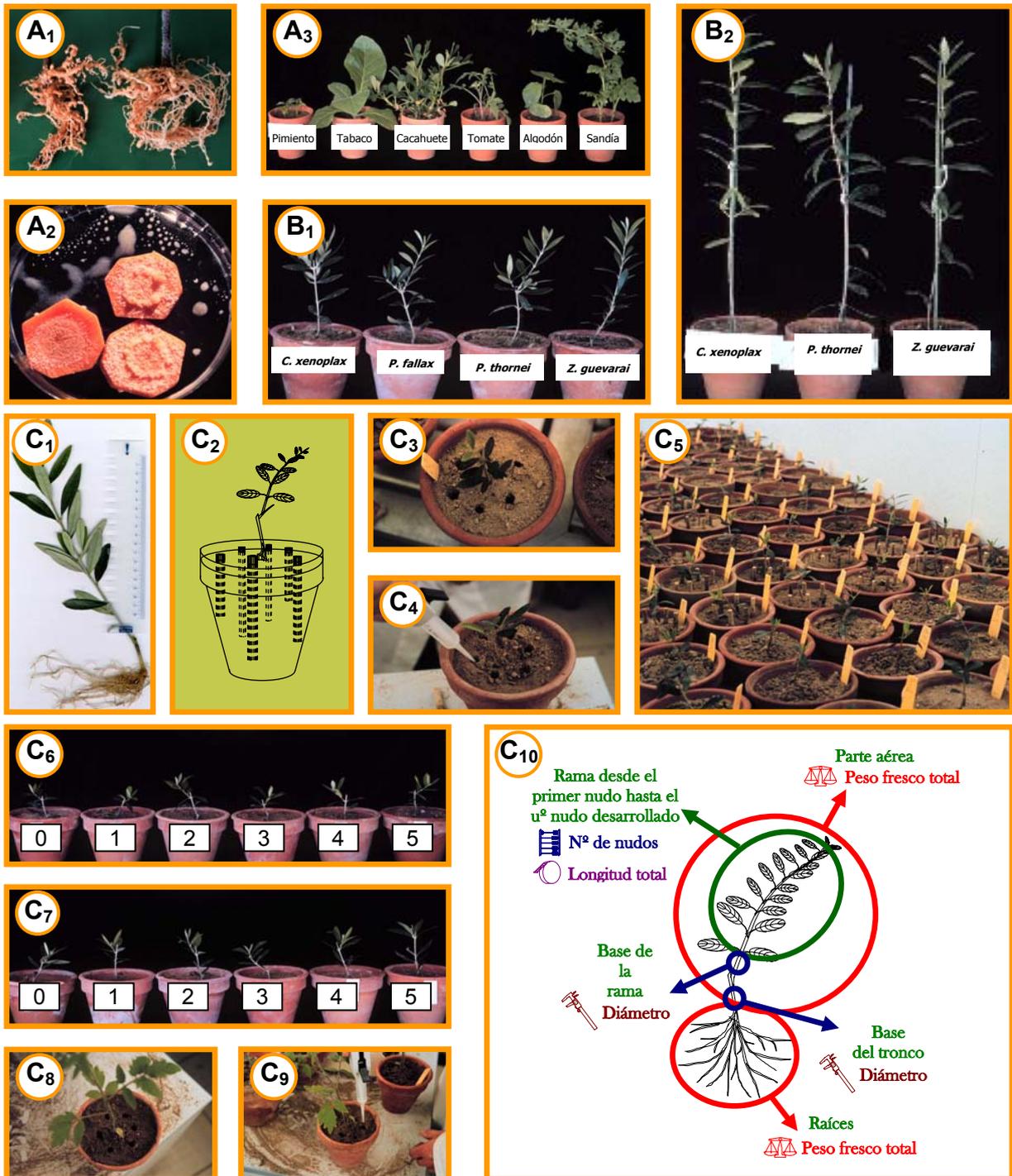
Los valores de Rf se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante el contraste de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (LSD) a  $P = 0,05$ . Con objeto de normalizar los datos previamente al análisis estadístico, los valores de Rf se transformaron según la fórmula  $Y = \log_{10}(X + 1)$ . Todos estos análisis se realizaron mediante el programa Statistix (NH Analytical Software, Roseville, MN).

### **3.2.3. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD**

Las pruebas de patogenicidad, diseñadas y efectuadas con el fin de responder al segundo de los objetivos planteados, se realizaron en dos años consecutivos. La primera repetición se efectuó entre los meses de febrero y abril de 1998 y la segunda tuvo lugar entre los meses de febrero y agosto de 1999. Aunque las condiciones experimentales fueron similares en ambos experimentos, en el segundo de ellos concurrieron algunas modificaciones causadas por cuestiones operativas, que se señalan oportunamente.

#### **3.2.3.1. Inóculo utilizado**

Las poblaciones de nematodos utilizadas en estos experimentos procedieron de la



**Fig. 3.2:** Metodología empleada en el estudio de la patogenicidad de nematodos fitoparásitos sobre el olivo. **A) Obtención del inóculo:** A<sub>1</sub>) Raíces de plantas de tomate empleadas para la multiplicación de *Meloidogyne* spp.; A<sub>2</sub>) Discos axénicos de zanahoria empleados para la multiplicación de *Pratylenchus* spp. mostrando colonias profusamente desarrolladas; A<sub>3</sub>) Especies empleadas en la inoculación de huéspedes diferenciales para clasificar las diferentes razas fisiológicas de *Meloidogyne* spp. **B) Prueba de capacidad reproductiva:** B<sub>1</sub>) Aspecto general de las plantas correspondientes a cada uno de los tratamientos (primera repetición); B<sub>2</sub>) Aspecto general de las plantas correspondientes a cada uno de los tratamientos (segunda repetición) **C) Prueba de patogenicidad:** C<sub>1</sub>) Vista de una planta empleada en la primera prueba de patogenicidad C<sub>2</sub>) Esquema de la disposición de las varillas colocadas para la disposición del inóculo (Segunda prueba de patogenicidad) C<sub>3</sub>) Vista de los agujeros producidos tras retirar las varillas C<sub>4</sub>) Inoculación C<sub>5</sub>) Vista general de las plantas durante el desarrollo del ensayo; C<sub>6</sub>) y C<sub>7</sub>) Vista de los tratamientos incluidos en la prueba de patogenicidad al comienzo del experimento C<sub>8</sub>) y C<sub>9</sub>) Plantas de tomate empleadas para controlar la calidad del inóculo de *Meloidogyne* spp. empleado en las pruebas de patogenicidad C<sub>10</sub>) Esquema de los parámetros de crecimiento empleados en la evaluación del crecimiento.



colección establecida a partir de las prospecciones realizadas en los viveros (ver 3.2.1.1. y 3.2.1.3). Las cinco especies utilizadas fueron las siguientes: tres especies de nematodos noduladores (*M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*) y dos lesionadores de raíces (*P. vulnus*, *P. penetrans*). Para la obtención de la suspensión que contenía el inóculo, así como para el cálculo y ajuste de su concentración, se emplearon los mismos materiales y métodos descritos oportunamente en las pruebas de capacidad reproductiva (ver 3.2.2.1.).

Con objeto de contar con un control de la capacidad infectiva del inóculo de los nematodos noduladores empleados, se inocularon plántulas de tomate 'Tres Cantos' susceptible, que se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo que las plantas de olivo y se determinó sobre las mismas la reproducción de las especies de *Meloidogyne* spp., siguiendo los materiales y métodos descritos anteriormente. La capacidad infectiva del inóculo de *Pratylenchus* spp. se evaluó por observación directa de la movilidad de juveniles y adultos en el inóculo.

### **3.2.3.2. Material vegetal empleado**

En cada uno de los experimentos de patogenicidad se emplearon plantones de olivo de los cvs. Arbequina y Picual de 3 meses de edad. Dichos plantones procedían de un vivero comercial, y habían sido obtenidos por enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización y transplantados en macetitas plásticas ("jiffies") de aproximadamente 100 cm<sup>3</sup> de capacidad, conteniendo turba. El aspecto general de los mismos, en cuanto a características de vigor y sanidad, fue bueno en ambos experimentos. Sobre una muestra representativa del sustrato de crecimiento (turba) se efectuó una extracción de nematodos y se comprobó la ausencia de especies fitoparásitas. Inmediatamente después de su recepción, los plantones de olivo se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas con las condiciones especificadas en 3.2.1.1 durante 2 semanas. Durante este periodo se aumentó progresivamente el intervalo entre los riegos con objeto de someter a las plantas a un "endurecimiento" que les permitiera soportar posteriormente el estrés subsiguiente al trasplante y asegurar así su supervivencia. Durante el desarrollo de la primera prueba de patogenicidad no se efectuó ningún tipo de poda, permitiendo que los brotes laterales crecieran espontáneamente. En la repetición del experimento, en cambio, el crecimiento de los plantones se condujo mediante poda de formación para lo cual, al comienzo del experimento, se dejó una única rama principal de aproximadamente 15-20 cm que incluía entre 10 y 15 entrenudos. Posteriormente, a lo largo del experimento, las plantas se revisaron cada 2-3 días con objeto de eliminar los nuevos brotes axilares y mantener esa única rama principal.

### **3.2.3.3. Experimento de patogenicidad I**

En el primero de los experimentos, la composición de la población empleada como inóculo en los lesionadores de raíz fue la siguiente: 32,4 % de huevos, 50,4 % de juveniles, 2,9 % de machos y 14,3 % de hembras (*P. penetrans*); y 2,6 % de huevos, 54,2 % de juveniles, 17,3 % de machos y 25,9 % de hembras (*P. vulnus*). El inóculo de *Meloidogyne* spp. estuvo constituido por huevos y J<sub>2</sub>.

Los plantones se sacaron de los "jiffies" y sus raíces se lavaron con agua corriente hasta eliminar todos los restos de sustrato (turba). Posteriormente los plantones se transplantaron en macetas de plástico de 2,5 L de capacidad conteniendo una mezcla esterilizada de arena, limo y turba fina en proporción 2:1:1 v/v/v. La inoculación se realizó durante el trasplante. Para ello, sobre el sistema radical desnudo se vertieron 20 ml de la suspensión conteniendo el inóculo de cada una de las especies de nematodos utilizadas. Se plantearon los siguientes tratamientos: 0 (Control sin nematodos), 1 (*M. arenaria*, 15.000 huevos + J<sub>2</sub>/planta), 2 (*M. incognita* 15.000 huevos + J<sub>2</sub>/ planta), 3 (*M. javanica*, 15.000 huevos + J<sub>2</sub>/ planta), 4 (*P. penetrans*, 5.000 nematodos/ planta) y 5 (*P. vulnus*, 5.000 nematodos/ planta). Cada uno de estos tratamientos se aplicó a los dos cvs. incluidos en el experimento, Arbequina y Picual. El experimento se diseñó en bloques completamente al azar, con dos bloques cada uno con 10 repeticiones por tratamiento.

### **3.2.3.4. Experimento de patogenicidad II**

En el segundo de los experimentos, la composición de la población de nematodos lesionadores de raíz empleada como inóculo fue la siguiente: *P. penetrans* (26,9 % de huevos, 48,6 % de juveniles, 1,8 % de machos y 22,7 % de hembras); y *P. vulnus* (18,2 % de huevos, 56,3 % de juveniles, 4,6 % de machos y 20,9 % de hembras). El inóculo de *Meloidogyne* spp. estuvo constituido por huevos y J<sub>2</sub>.

Con posterioridad a haber cumplido los procedimientos de endurecimiento expresados en 3.2.3.2 los plantones se transplantaron a macetas troncocónicas de arcilla de 1000 cm<sup>3</sup> de capacidad. En este experimento, el sustrato empleado fue una mezcla esterilizada de arena y limo 2:1 v/v. Una vez efectuado el trasplante se colocaron seis varillas cilíndricas de madera de 8 mm de diámetro y 13, 10 y 7 cm de longitud (dos de cada una) que se colocaron de forma equidistante a lo largo de una circunferencia de aproximadamente 10 cm de diámetro concéntrica al borde de la maceta (Fig. 3.2). Estas varillas se colocaron de manera de que los pares de igual longitud quedaran diametralmente opuestos y se enterraron hasta dejar sólo un cm por encima de la tierra. Las varillas se

dispusieron con el propósito de que, una vez retiradas, dejaran formados huecos que permitieran una inoculación uniforme en todo el volumen de la rizosfera. Por otra parte, la colocación de dichas varillas en forma suficientemente anticipada a la inoculación aseguró que no se provocase daño mecánico a las raíces. Dos semanas después del trasplante, se eliminaron las plantas que murieron por el estrés posterior al mismo y se procedió a la inoculación. Para efectuar la misma se retiraron las varillas de madera y en cada uno de los agujeros que quedaron formados se depositaron 2 cm<sup>3</sup> de la suspensión del inóculo. La concentración de la suspensión había sido previamente ajustada de manera de que en los 12 cm<sup>3</sup> con que serían inoculados en cada planta estuviese contenido el número total de ejemplares previamente asignados según el tratamiento. La densidad de inóculo empleada por planta, los tratamientos y el diseño experimental fueron similares a los utilizados en el primer experimento (ver 3.2.3.3).

#### **3.2.3.5. Condiciones controladas de crecimiento de los plantones**

En ambos experimentos, tras la inoculación los plantones se mantuvieron en una cámara de crecimiento con las mismas condiciones ambientales descritas en la prueba de capacidad reproductiva (ver 3.2.1.1.). Las plantas se regaron en días alternos con 100 ml de agua, y 1 semana después del trasplante se realizó una única aplicación de 15 g por maceta del mismo fertilizante granulado completo de liberación lenta empleado en las pruebas de capacidad reproductiva. Estas condiciones fueron similares en ambas repeticiones del experimento, con excepción de la fertilización, que en el segundo experimento se realizó aplicando una vez a la semana (en uno de los turnos de riego) solución nutritiva completa (Hoagland y Arnon, 1950) suplementada con 20 ppm de quelato de hierro comercial (Sequestrene 138 Fe G 100<sup>®</sup>, Ciba-Geigy S.A.).

Las plantas se mantuvieron en la cámara de crecimiento hasta el final de los experimentos, 70 días después de la inoculación en el primero de ellos, y 120 días después de la inoculación, en el segundo.

#### **3.2.3.6. Evaluación del efecto del parasitismo sobre el crecimiento de los plantones**

Con objeto de evaluar el efecto del parasitismo de las especies de nematodos fitoparásitos sobre el crecimiento de los plantones, inmediatamente después de la inoculación se determinaron los siguientes parámetros de crecimiento: a) diámetro del tronco (medido 1 cm por debajo de la inserción del brote principal); b) diámetro del tallo o

brote principal (medido 5 cm por encima de su inserción en el tronco); c) longitud del brote principal (medida desde la inserción en el tronco hasta el nudo desarrollado distal); d) longitud total de las ramificaciones (sumatoria de la longitud de cada una de las ramificaciones de cualquier orden presentes sobre el tronco y el brote principal, considerando en cada caso como longitud parcial la distancia entre la inserción en la rama y el nudo desarrollado distal; parámetro sólo considerado en la primera prueba) y e) número total de nudos desarrollados (considerados sobre el brote principal) (Fig. 3.2). En todos los casos se consideró como "nudo desarrollado" aquel que presentara hojas expandidas mayores de 1 cm.

Los parámetros de crecimiento correspondientes a la parte aérea de la planta se volvieron a tomar sobre la planta entera en la maceta antes de su extracción. Coincidiendo con estas determinaciones se evaluó la sintomatología general de la parte aérea de la planta. Posteriormente se extrajo cada planta de su maceta, se separaron delicadamente los restos groseros de suelo adheridos a las raíces y se procedió a lavar suavemente las mismas, para evitar el desprendimiento de masas de huevos. En el caso particular de aquellas plantas inoculadas con *Meloidogyne* spp. se estimó el índice de nodulación (IN) de acuerdo con la escala propuesta por Barker (1985), según la cual IN = 1 cuando % de sistema radical nodulado (SRN) ≤ 10, IN = 2 cuando 10 < % SRN ≤ 20, IN = 3 cuando 20 < % SRN ≤ 40, IN = 4 cuando 40 < % SRN ≤ 70, IN = 5 cuando 70 < % SRN ≤ 90 e IN = 6 cuando 90 < % SRN ≤ 100. Se secó el exceso de agua de lavado y se pesó la planta entera. Posteriormente, las raíces se cortaron, se pesaron separadamente del resto de la planta y se procedió a la extracción de los nematodos contenidos en su interior. El suelo de las macetas se conservó para la extracción de los nematodos contenidos en él.

Para determinar el crecimiento en términos relativos a los valores iniciales se utilizó la siguiente expresión:

$$IR_{(x)} = (X_1 - X_0) / X_0$$

donde  $IR_{(x)}$  = incremento relativo del parámetro considerado,  $X_1$  = medida del parámetro al final del experimento y  $X_0$  = medida del parámetro al inicio de la prueba.

### **3.2.3.7. Evaluación de la reproducción de las poblaciones de nematodos**

Para determinar la reproducción de cada una de las especies, con posterioridad a la evaluación de los parámetros finales de crecimiento se determinó la concentración de nematodos en suelo y raíz. Para ello se efectuó la extracción y el recuento posterior

siguiendo los métodos descritos anteriormente (ver 2.2.2.1). Con estos datos se calculó la población final de nematodos correspondiente a cada tratamiento y el índice o tasa de reproducción (ver 3.2.2.4).

#### **3.2.3.8. Análisis estadístico**

Los datos correspondientes al crecimiento, índice de nodulación, número de nematodos por gramo de raíz, número de nematodos por 100 cm<sup>3</sup> de suelo e índice Rf, se sometieron a ANOVA y las medias se compararon mediante el contraste de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (LSD) a  $P = 0,05$ . Con objeto de normalizar los datos, previamente al análisis estadístico, los datos correspondientes al número de nematodos por gramo de raíz, número de nematodos por 100 cm<sup>3</sup> de suelo e índice de reproducción se transformaron según la fórmula  $Y = \log_{10}(X + 1)$ , donde  $X$  = valor de la variable dada. Asimismo, las interacciones entre los distintos tratamientos se determinaron mediante contrastes ortogonales de un grado de libertad ( $P = 0,05$ ), agrupando los tratamientos según el grupo trófico de cada una de las especies utilizadas. Todos estos análisis se realizaron mediante el programa Statistix (NH Analytical Software, Roseville, MN).

### **3.3. RESULTADOS**

#### **3.3.1. PRUEBA DE CAPACIDAD REPRODUCTIVA**

##### **3.3.1.1. Lesionadores de raíz y anillados**

Los resultados obtenidos en los dos experimentos realizados indican que el cultivar de olivo no influyó significativamente sobre el índice o tasa de reproducción Rf de los nematodos lesionadores de raíz y nematodos anillados evaluados en estos experimentos ( $P = 0,298$  y  $P = 0,833$  para los sucesivos experimentos, respectivamente). El valor de Rf en ambos experimentos, en cambio, varió significativamente según la especie de nematodo ( $P < 0,001$ ), y no existió interacción significativa nematodo x cultivar ( $P = 0,173$ ,  $P = 0,651$ , para el primera y el segundo experimento respectivamente). Entre las especies evaluadas en los experimentos, *C. xenoplax* fue la única cuyo Rf resultó superior a uno, tanto en 'Arbequina' como en 'Picual' (Tablas 3.1 y 3.2). Por el contrario, las tres especies de nematodos lesionadores mostraron una tasa de reproducción claramente inferior a uno, independientemente del cultivar de olivo considerado.

**Tabla 3.1.** Capacidad reproductiva de nematodos lesionadores de raíz y nematodos anillados en cultivares de olivo (primera repetición)<sup>a</sup>

Cultivar de olivo	Especie de nematodo	Pi <sup>b</sup>	Pf suelo <sup>c</sup>	Pf raíz <sup>d</sup>	Pf <sup>e</sup>	Rf <sup>f</sup>
Arbequina	<i>P. thornei</i>	1000	121,0 ± 8,7	3,0 ± 1,2	124,0 ± 8,3	0,12 a
	<i>P. fallax</i>	1000	101,9 ± 5,9	23,7 ± 4,1	126,6 ± 25,8	0,13 a
	<i>Z. guevarai</i>	1000	1,4 ± 0,6	0,1 ± 0,1	1,5 ± 0,6	0,01 a
	<i>C. xenoplax</i>	100	122,0 ± 25,5	4,0 ± 1,5	125,6 ± 25,8	1,26 b
Picual	<i>P. thornei</i>	1000	83,1 ± 21,7	2,3 ± 0,7	85,4 ± 22,1	0,09 a
	<i>P. fallax</i>	1000	108,6 ± 9,9	18,8 ± 4,4	127,4 ± 12,6	0,13 a
	<i>Z. guevarai</i>	1000	5,0 ± 1,4	1,6 ± 0,3	6,6 ± 1,47	0,01 a
	<i>C. xenoplax</i>	100	188,5 ± 40,6	0,4 ± 0,4	188,9 ± 41,0	1,89 b

<sup>a</sup>Los datos corresponden a la media de 10 plantas por tratamiento, y se determinaron 60 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Los plantones crecieron en macetas de arcilla (0,4 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1° C. <sup>b</sup>Pi = inóculo inicial. <sup>c</sup>Pf = población final en el suelo (media ± DE) <sup>d</sup>Pf = población final en raíz (media ± DE). <sup>e</sup>Pf = población final total (suelo + raíz) (media ± DE). <sup>f</sup>Tasa o índice de reproducción (Rf = Pf/Pi). Dentro de cada cultivar, las medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el contraste de la mínima diferencia significativa (LSD) protegida de Fisher. Para cada especie de nematodo se presentan los datos reales, pero los valores de Rf se transformaron según la fórmula  $y = \log_{10}(Rf + 1)$  antes del ANOVA.

**Tabla 3.2.** Capacidad reproductiva de nematodos lesionadores de raíz y nematodos anillados en cultivares de olivo (segunda repetición)<sup>a</sup>

Cultivar de olivo	Especie de nematodo	Pi <sup>b</sup>	Pf suelo <sup>c</sup>	Pf raíz <sup>d</sup>	Pf <sup>e</sup>	Rf <sup>f</sup>
Arbequina	<i>P. thornei</i>	1000	87,6 ± 8,2	34,3 ± 12,3	114,5 ± 23,4	0,12 a
	<i>Z. guevarai</i>	1000	28,6 ± 6,4	24,1 ± 6,5	55,3 ± 12,1	0,06 a
	<i>C. xenoplax</i>	100	113,8 ± 19,2	7,7 ± 2,9	119,0 ± 22,2	1,20 b
Picual	<i>P. thornei</i>	1000	100,7 ± 13,5	9,0 ± 3,8	109,7 ± 16,5	0,11 a
	<i>Z. guevarai</i>	1000	44,0 ± 5,7	57,2 ± 16,3	104,9 ± 18,8	0,11 a
	<i>C. xenoplax</i>	100	107,3 ± 28,3	2,9 ± 0,8	110,2 ± 27,9	1,10 b

<sup>a</sup>Los datos corresponden a la media de 10 plantas por tratamiento, y se determinaron 60 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Los plantones crecieron en macetas de arcilla (0,4 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1° C. <sup>b</sup>Pi = inóculo inicial. <sup>c</sup>Pf = población final en el suelo (media ± DE) <sup>d</sup>Pf = población final en raíz (media ± DE). <sup>e</sup>Pf = población final total (suelo + raíz) (media ± DE). <sup>f</sup>Tasa o índice de reproducción (Rf = Pf/Pi). Dentro de cada cultivar, las medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el contraste de la mínima diferencia significativa (LSD) protegida de Fisher. Para cada especie de nematodo se presentan los datos reales, pero los valores de Rf se transformaron según la fórmula  $y = \log_{10}(Rf + 1)$  antes del ANOVA.

### 3.3.1.2. Nematodos espirales

El cultivar de olivo influyó significativamente ( $P = 0,0262$ ) sobre la tasa de reproducción Rf de los nematodos espirales (*Heliycotylenchus* spp.) en plantones, siendo mayor la reproducción en 'Picual' que en 'Arbequina' tanto para *H. pseudorobustus* como para *H. vulgaris* (Tabla 3.3). Sin embargo, la reproducción de las dos especies de nematodo no varió entre sí ( $P = 0,106$ ) en cada uno de los cultivares de olivo y no existió interacción significativa ( $P = 0,892$ ) entre cultivar y especie de nematodo.

**Tabla 3.3.** Capacidad reproductiva de *Helicotylenchus* spp. en cultivares de olivo<sup>a</sup>.

Cultivar de olivo	Especie de nematodo	Pi <sup>b</sup>	Pf suelo <sup>c</sup>	Pf raíz <sup>d</sup>	Pf <sup>e</sup>	Rf <sup>f</sup>
Arbequina	<i>H. pseudorobustus</i>	1000	851 ± 269,2	5,9 ± 1,5	1508 ± 269,8	1,51
	<i>H. vulgaris</i>	1000	578 ± 182,9	6,5 ± 1,0	1046 ± 183,3	1,05
	Media					1,28 a
Picual	<i>H. pseudorobustus</i>	1000	2177 ± 376,7	6,3 ± 1,7	2183 ± 378,0	2,18
	<i>H. vulgaris</i>	1000	1703 ± 325,1	9,1 ± 1,3	1712 ± 326,1	1,71
	Media					1,94 b

<sup>a</sup>Los datos corresponden a la media de 10 plantas por tratamiento, y se determinaron 4 meses después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Los plántones crecieron en macetas de arcilla (0,4 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1° C. <sup>b</sup>Pi = densidad de inóculo inicial. <sup>c</sup>Pf = población final en el suelo <sup>d</sup>Pf = población final en raíz. <sup>e</sup>Pf = población final total (suelo + raíz) <sup>f</sup>Tasa o índice de reproducción (Rf = Pf/Pi). Para cada cultivar, las medias seguidas por la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el contraste de la mínima diferencia significativa (LSD) protegida de Fisher. Para cada especie de nematodo se presentan los datos reales, pero los valores de Rf se transformaron según la fórmula  $y = \log_{10}(Rf + 1)$  antes del ANOVA.

### 3.3.2. PRUEBA DE PATOGENICIDAD: PRIMER EXPERIMENTO

#### 3.3.2.1. Caracterización racial de *Meloidogyne* spp.

En la inoculación de huéspedes diferenciadores la población de *M. incognita* se reprodujo en pimiento, sandía y tomate, sobre los cuales produjo IN medios de 2,5, 3 y 8, respectivamente, en una escala de 1 a 10. En cambio, dicha población no se reprodujo sobre algodón, cacahuete ni tabaco, mostrando en las tres plantas un IN = 0. Estos resultados identifican a la población de *M. incognita* en estudio dentro de la raza fisiológica 1 (Hartman y Sasser, 1985).

La población de *M. arenaria* se reprodujo sobre tabaco (IN = 2,5), sandía (IN = 4) y tomate (IN = 8), pero no se reprodujo, en cambio, sobre algodón, cacahuete ni pimiento (IN = 0). Estos resultados conducen a clasificar a la población referida dentro de la raza fisiológica 2.

#### 3.3.2.2. Sintomatología

La observación de la parte aérea de los plántones de olivo inoculados no permitió evidenciar síntomas morfológicos que estuvieran asociados de forma clara e inequívoca al efecto del parasitismo por los nematodos evaluados. En algunos casos aislados, plantas que habían sido inoculadas con *Meloidogyne* spp., mostraron clorosis en las hojas apicales (Fig. 3.3). Sin embargo, esta sintomatología se vio enmascarada por un amarillamiento que afectó a la casi totalidad de las plantas, independientemente del tratamiento. Este síndrome fue particularmente apreciable en el cv. Arbequina. La etiología de dicho síndrome fue

atribuida a desórdenes en la absorción de Fe y motivó algunos de los ajustes de metodología que tuvieron lugar en la repetición del experimento.

El sistema radical de las plantas control mostró un buen aspecto general con desarrollo de algunas raicillas jóvenes originadas durante el período de crianza en la cámara de crecimiento que se reconocieron fácilmente por su escasa pigmentación. Las plantas inoculadas con *Pratylenchus* spp. también tuvieron, por lo general, un aspecto sano, aunque excepcionalmente mostraron un desarrollo incipiente de síntomas de descortezamiento que no alcanzaron entidad suficiente como para merecer una evaluación sistemática. Sin embargo, la infección por *Meloidogyne* spp. provocó la formación de nódulos radicales de aspecto y tamaño variables en casi todas las plantas inoculadas, que adoptaron generalmente una localización apical. La severidad de este síntoma en cada planta se evaluó mediante el índice de nodulación (ver 3.2.3.4 y ver 3.3.2.4). Asimismo, algunas malformaciones de descripción más vaga, como escasa ramificación, constricción lateral o la presencia de ramificaciones subterminales en forma de haz similares al cuadro típico del "stubby root", pudieron observarse excepcionalmente en plantas inoculadas con *Meloidogyne* spp. (Fig. 3.3).

### **3.3.2.3. Influencia de la infección por *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. sobre el crecimiento de plántones de olivo**

#### **3.3.2.3.1. Cultivar Arbequina**

Considerando la totalidad de los parámetros de crecimiento relativo que se incluyeron en el análisis, el máximo valor se identificó para el diámetro del brote en el tratamiento control (33,9 %) y el mínimo se registró para el diámetro del tronco en las plantas infectadas con *P. vulnus* (7,0 %) (Tabla 3.4). El tratamiento control obtuvo los mayores valores de peso fresco total y peso fresco de raíz (7,2 g y 1,8 g, respectivamente). El análisis de la varianza indicó que sólo tres de los parámetros considerados se vieron afectados significativamente por la infección por *Pratylenchus* spp. o *Meloidogyne* spp., y éstos fueron el crecimiento relativo del diámetro del brote principal, el crecimiento relativo del diámetro del tronco y el incremento relativo del número de nudos ( $P < 0,001$ ,  $P < 0,001$  y  $P = 0,019$ , respectivamente). El resto de los parámetros considerados no se vieron afectados significativamente ( $P > 0,05$ ) por la infección de la planta y, por tanto, se mostraron como indicadores no sensibles a la infección por nematodos lesionadores y noduladores de raíz en las condiciones experimentales utilizadas ( $P = 0,095$ , para el

crecimiento relativo de la longitud del brote principal,  $P = 0,486$ , para el peso fresco final total y  $P = 0,228$ , para el peso fresco final de las raíces).

La infección por *Meloidogyne spp.* o *Pratylenchus spp.* redujo significativamente ( $P < 0,05$ ) el crecimiento relativo del diámetro del tronco y del brote principal respecto de las plantas no inoculadas que sirvieron como control (Tabla 3.4). La infección por *Meloidogyne spp.* redujo estos parámetros en extensión significativamente superior ( $P < 0,05$ ) a la reducción originada por *Pratylenchus spp.* Los contrastes ortogonales realizados dentro de cada uno de los grupos de nematodos noduladores y lesionadores evaluados indican, en cambio, que para ambos parámetros no existieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre las especies de un mismo género (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4:** Influencia de la infección de raíces de olivo por nematodos noduladores y lesionadores de raíz sobre el crecimiento de plántulas del cultivar Arbequina (primera repetición)<sup>a</sup>.

Tratamiento	Crecimiento o incremento relativo					Peso fresco total	Peso fresco raíz (g)
	Altura Total <sup>b</sup>	Altura brote ppal. <sup>c</sup>	Diámetro tronco <sup>d</sup>	Diámetro brote ppal. <sup>e</sup>	Nº nudos <sup>f</sup>		
0 Control	0,2578	0,1463	0,2044	0,3387	0,3288	7,2250	1,7950
1 <i>M. arenaria</i>	0,2433	0,1516	0,1244	0,2453	0,2621	6,7300	1,5450
2 <i>M. incognita</i>	0,2578	0,1746	0,0956	0,2636	0,2713	7,0116	1,6895
3 <i>M. javanica</i>	0,1908	0,1204	0,1173	0,2364	0,1912	6,7850	1,5900
4 <i>P. penetrans</i>	0,2469	0,1730	0,0940	0,1233	0,3194	7,2000	1,6550
5 <i>P. vulnus</i>	0,1914	0,1444	0,0701	0,1379	0,2427	6,0950	1,2450
<b>Contrastes<sup>g</sup></b>							
0 vs. (1-5)	ns	ns	<0,0001	<0,0001	0,0327	ns	ns
0 vs. (1-3)	ns	ns	<0,0001	<0,0001	0,0137	ns	ns
0 vs. (4-5)	ns	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns
(1-3) vs. (4-5)	ns	ns	0,0305	<0,0001	ns	ns	ns
1 vs. (2-3)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2 vs. (1,3)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3 vs. (1,2)	ns	ns	ns	ns	0,0433	ns	ns
4 vs. 5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>a</sup>Los datos son la media de 20 plantas por tratamiento, y se determinaron 70 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del transplante. Las plantas se inocularon con 5.000 nematodos/planta de *Pratylenchus spp.* o 15.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *Meloidogyne spp.* Los plántulas crecieron en macetas de plástico (2,5 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a  $24 \pm 1^\circ \text{C}$  y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a  $200 \pm 20 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . <sup>b</sup>Crecimiento relativo de la altura total = (altura total final - altura total inicial)/altura total inicial. <sup>c</sup>Crecimiento relativo de la altura del brote principal = (altura final del brote ppal. - altura inicial del brote ppal.)/ altura inicial del brote ppal. <sup>d</sup>Crecimiento relativo del diámetro de tronco = (diámetro tronco final - diámetro tronco inicial)/diámetro tronco inicial. <sup>e</sup>Crecimiento relativo del diámetro del brote ppal. = (diámetro final del brote ppal. - diámetro inicial del brote ppal.)/diámetro inicial del brote ppal.. <sup>f</sup>Incremento relativo del número de nudos = (número de nudos final - número de nudos inicial)/ número de nudos inicial. <sup>g</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns =no significativo ( $P > 0.05$ ).

El número de nudos en las plantas control no inoculadas, mostró un incremento relativo significativamente superior ( $P < 0,05$ ) al que se encontró en las plantas inoculadas consideradas en su totalidad y en las plantas inoculadas con *Meloidogyne spp.* Además, el incremento en el número de nudos de las plantas inoculadas con *M. javanica* fue

significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) al incremento en el número de nudos de las plantas inoculadas con *M. arenaria* y *M. incognita* (Tabla 3.4.). No existió ninguna diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) en el incremento del número de nudos entre las otras especies de nematodos noduladores o las especies de nematodos lesionadores de raíz (Tabla 3.4.).

### 3.3.2.3.2. Cultivar Picual

El crecimiento relativo de las plantas del cv. Picual, considerado a través de sus distintos indicadores, fluctuó entre un 39,0 % (incremento relativo del número de nudos en el control) y un 6,4% (crecimiento relativo del diámetro del brote principal en las plantas inoculadas con *P. penetrans*) (Tabla 3.5). De forma similar a lo que ocurrió en 'Arbequina', el tratamiento control obtuvo los mayores valores de peso fresco total y peso fresco de raíz, con 7,5 g y 2,4 g, respectivamente. Los parámetros que se vieron afectados significativamente por la infección de nematodos noduladores o lesionadores de raíz fueron los siguientes: crecimiento relativo del diámetro del tronco, crecimiento relativo del diámetro del brote principal, peso fresco total y peso fresco de la raíz ( $P < 0,001$ ,  $P < 0,001$ ,  $P = 0,003$  y  $P < 0,001$ , respectivamente). El crecimiento relativo de la altura total, el crecimiento relativo de la altura de la rama principal y el incremento relativo del número de nudos no se vieron afectados significativamente por la infección de nematodos noduladores o lesionadores de raíz en las condiciones experimentales utilizadas ( $P = 0,135$ ,  $P = 0,221$  y  $P = 0,061$ , respectivamente).

La infección de 'Picual' por *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. redujo significativamente ( $P < 0,05$ ) el crecimiento relativo del diámetro del tronco y del brote principal respecto de las plantas control (Tabla 3.5). Los contrastes ortogonales realizados indicaron que no existieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre plantas infectadas por los diferentes géneros de nematodos (*Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp.) o entre diferentes especies dentro de un mismo género en el crecimiento del diámetro del tronco (Tabla 3.5). Sin embargo, en cuanto al crecimiento relativo del diámetro del brote principal se observó que las plantas infectadas por *M. incognita* presentaron para este parámetro un valor significativamente menor ( $P < 0,05$ ) al de las plantas infectadas por las otras dos especies de noduladores (Tabla 3.5). Además, el crecimiento relativo del diámetro del brote principal en las plantas infectadas por *P. penetrans* fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) al de las plantas infectadas por *P. vulnus* (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5:** Influencia de la infección de raíces de olivo por nematodos noduladores y lesionadores de raíz sobre el crecimiento de plántones del cultivar Picual (primera repetición)<sup>a</sup>.

Tratamiento	Crecimiento o incremento relativo					Peso fresco total	Peso fresco raíz (g)
	Altura Total <sup>b</sup>	Altura brote ppal. <sup>c</sup>	Diámetro tronco <sup>d</sup>	Diámetro brote ppal. <sup>e</sup>	Nº nudos <sup>f</sup>		
0 Control	0,2080	0,1750	0,2694	0,3794	0,3904	7,5350	2,3637
1 <i>M. arenaria</i>	0,1427	0,1190	0,0964	0,1753	0,2489	5,1950	1,4100
2 <i>M. incognita</i>	0,1935	0,1554	0,1232	0,1182	0,3211	5,3600	1,4000
3 <i>M. javanica</i>	0,1841	0,1638	0,1537	0,1893	0,2846	5,5500	1,3500
4 <i>P. penetrans</i>	0,1538	0,1405	0,0704	0,0637	0,3601	6,3900	1,7400
5 <i>P. vulnus</i>	0,1437	0,1250	0,1130	0,2012	0,2869	6,0450	1,5400
<b>Contrastes<sup>g</sup></b>							
0 vs. (1-5)	ns	ns	<0,0001	<0,0001	ns	0,0002	<0,0001
0 vs. (1-3)	ns	ns	<0,0001	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001
0 vs. (4-5)	ns	ns	<0,0001	<0,0001	ns	0,0151	0,0001
(1-3) vs. (4-5)	ns	ns	ns	ns	ns	0,0350	ns
1 vs. (2-3)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2 vs. (1,3)	ns	ns	ns	0,0259	ns	ns	ns
3 vs. (1,2)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
4 vs. 5	ns	ns	ns	0,0001	ns	ns	ns

<sup>a</sup>Los datos son la media de 20 plantas por tratamiento, y se determinaron 70 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del transplante. Las plantas se inocularon con 5.000 nematodos/planta de *Pratylenchus* spp. o 15.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *Meloidogyne* spp. Los plántones crecieron en macetas de plástico (2,5 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1° C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a 200 ± 20 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>Crecimiento relativo de la altura total = (altura total final - altura total inicial)/altura total inicial. <sup>c</sup>Crecimiento relativo de la altura del brote principal = (altura final del brote ppal.- altura inicial del brote ppal.)/ altura inicial del brote ppal. <sup>d</sup>Crecimiento relativo del diámetro de tronco = (diámetro tronco final - diámetro tronco inicial)/diámetro tronco inicial. <sup>e</sup>Crecimiento relativo del diámetro del brote ppal. = (diámetro final del brote ppal. - diámetro inicial del brote ppal.)/diámetro inicial del brote ppal.. <sup>f</sup>Incremento relativo del número de nudos = (número de nudos final - número de nudos inicial)/ número de nudos inicial. <sup>g</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns =no significativo (*P* > 0.05).

La inoculación con *Meloidogyne* spp. o con *Pratylenchus* spp. redujo significativamente (*P* < 0,05) el peso fresco total y el peso fresco de la raíz de las plantas respecto del control no inoculado (Tabla 3.5). Asimismo, la inoculación con *Meloidogyne* spp. redujo significativamente (*P* < 0,05) el peso fresco final de las plantas en extensión significativamente superior a la reducción ocasionada por la inoculación con *Pratylenchus* spp. No pudo observarse, en cambio, en los parámetros de peso fresco un efecto diferencial significativo (*P* > 0,05) asociable a la infección por distintas especies de nematodos dentro de un mismo género.

### 3.3.2.4. Reproducción de nematodos noduladores y lesionadores de raíz en plántones de olivo inoculados

#### 3.3.2.4.1. Cultivar Arbequina

El análisis de varianza y los contrastes ortogonales realizados mostraron que la tasa o índice de reproducción fue significativamente superior (*P* < 0,05) para los nematodos noduladores comparados con los lesionadores de raíz (Tabla 3.6). Asimismo, entre los noduladores, *M. arenaria* presentó una tasa de reproducción significativamente mayor (*P* <

0,05) que *M. incognita* y *M. javanica* y *M. incognita* tuvo una tasa de reproducción significativamente más baja ( $P < 0,05$ ) que *M. arenaria* y *M. javanica* (Tabla 3.6). Entre los nematodos lesionadores, *P. vulnus* tuvo una tasa de reproducción significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que *P. penetrans* (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6:** Reproducción de nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre plantones de olivo del cultivar Arbequina (primera repetición)<sup>a</sup>.

Tratamientos	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo	Nematodos/ g raíz	Índice de nodulación <sup>b</sup>	Pf <sup>c</sup>	Rf <sup>d</sup> (Pf/Pi)
1 <i>M. arenaria</i>	44,0	15540,2	2,8889	21531	1,4354
2 <i>M. incognita</i>	65,8	9034,7	1,7222	14785	0,9857
3 <i>M. javanica</i>	52,6	11141,1	3,1579	18055	1,2037
4 <i>P. penetrans</i>	27,3	1833,5	- <sup>f</sup>	3381	0,6762
5 <i>P. vulnus</i>	23,1	5616,9	-	6328	1,2655
Contrastes <sup>e</sup>					
(1-3) vs. (4-5)	-	-	-	-	0,0010
1 vs. (2-3)	ns	0,0025	ns	0,0014	0,0010
2 vs. (1,3)	ns	0,0026	<0,0001	0,0011	0,0011
3 vs. (1,2)	ns	ns	0,0030	ns	ns
4 vs. 5	ns	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001

<sup>a</sup>Los datos corresponden a la media de 20 plantas por tratamiento, y se determinaron 70 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 5.000 nematodos/planta de *Pratylenchus* spp. o 15.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *Meloidogyne* spp. Los plantones crecieron en macetas de plástico (2,5 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a  $24 \pm 1^\circ \text{C}$  y un fotoperíodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a  $200 \pm 20 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . <sup>b</sup>Severidad de la nodulación evaluada según la escala 1 = 0-10 % del sistema radical nodulado, 2 = 10-20 %, 3 = 20-40 %, 4 = 40-70 %, 5 = 70-90 %, 6 = 90-100 %. <sup>c</sup>Población final total de nematodos en suelo y en raíz. <sup>d</sup>Tasa de reproducción (población final/población inicial) <sup>e</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns = no significativo ( $P > 0,05$ ); - = no evaluado.

El mayor índice de nodulación se alcanzó en plantas inoculadas con *M. javanica* (IN = 3,16) mientras que el más bajo correspondió a *M. incognita* (IN = 1,72). El índice de nodulación en las plantas infectadas por *M. javanica* resultó significativamente superior ( $P = 0,05$ ) que en las plantas infectadas por las otras dos especies de *Meloidogyne* consideradas conjuntamente. Sin embargo, la nodulación radical inducida por la infección de *M. incognita* fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) al de las plantas infectadas por las otras dos especies de *Meloidogyne* (Tabla 3.6). La máxima población final se encontró en las plantas inoculadas con *M. arenaria* (21531 nematodos), mientras que la mínima fue la que se registró en las plantas inoculadas con *P. penetrans* (3381 nematodos). La densidad de población de nematodos en el suelo varió entre un máximo de 65,8 nematodos/100 cm<sup>3</sup> para *M. incognita* y un mínimo de 23,1 nematodos / 100 cm<sup>3</sup> para *P. vulnus* (Tabla 3.6). El número de nematodos en raíz osciló entre un mínimo de 1833,5 nematodos/g, para las plantas inoculadas con *P. penetrans* y un máximo de 15540,2 nematodos/g, para las que fueron inoculadas con *M. arenaria*.

El análisis de contrastes ortogonales indicó que los valores de número de nematodos por gramo de raíz y población final por planta que se alcanzaron con *M. arenaria* fueron significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) a los alcanzados con las otras dos especies del género *Meloidogyne* (Tabla 3.6). No se registraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), en cambio, en la densidad final de nematodos en suelo en ninguna de las comparaciones realizadas entre noduladores y lesionadores de raíz (Tabla 3.6). Los contrastes ortogonales indican, por otra parte, que el número de nematodos en raíz, la población final y la tasa de reproducción fueron significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) en *P. vulnus* que en *P. penetrans* (Tabla 3.6).

#### 3.3.2.4.2. Cultivar 'Picual'

La tasa de reproducción máxima correspondió a *M. arenaria* (1,497), mientras que *P. penetrans* (0,901) presentó la mínima. El análisis de varianza y los contrastes ortogonales realizados mostraron que este parámetro fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en nematodos noduladores que en lesionadores de raíz (Tabla 3.7). Entre los noduladores, *M. arenaria* presentó una tasa de reproducción significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que *M. incognita* y *M. javanica*, mientras que *M. incognita* y *M. javanica* considerados en forma aislada tuvieron una tasa de reproducción significativamente más baja ( $P < 0,05$ ) que la media de las otras dos especies del género consideradas conjuntamente (Tabla 3.7). *P. vulnus* tuvo, por otra parte, una tasa de reproducción significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que *P. penetrans* (Tabla 3.7).

El mayor índice de nodulación se alcanzó en plantas inoculadas con *M. incognita* (IN = 2,15), mientras que el más bajo correspondió a *M. arenaria* (IN= 1,63). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en la nodulación causada en plantas infectadas por las distintas especies de *Meloidogyne* (Tabla 3.7).

La densidad de población de nematodos en el suelo varió entre un mínimo de 23,6 nematodos/100 cm<sup>3</sup> para *M. incognita*, y un máximo de 79,8 nematodos/100 cm<sup>3</sup> para *M. arenaria* (Tabla 3.7). El número de nematodos en raíz osciló entre un mínimo de 2113,9 nematodos/g para *P. penetrans* y un máximo de 14831,1 para *M. arenaria*. Los contrastes ortogonales realizados indicaron que *M. arenaria* presentó un número de nematodos en suelo y raíz, y una población final significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) a las otras dos especies del género *Meloidogyne* (Tabla 3.7). *M. incognita*, por su parte, presentó un número de nematodos en suelo y una población final significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) a las otras dos especies de *Meloidogyne*, sin que hubieran registrado diferencias

significativas ( $P > 0,05$ ) en el número de nematodos en raíz (Tabla 3.7). Asimismo, los contrastes indicaron que el número de nematodos en raíz, la población final y la tasa de reproducción fueron significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) en *P. vulnus* que en *P. penetrans*, y que no existieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el número de nematodos en suelo entre ambas especies (Tabla 3.7).

**Tabla 3.7:** Reproducción de nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre plantones de olivo del cultivar Picual (primera repetición)<sup>a</sup>.

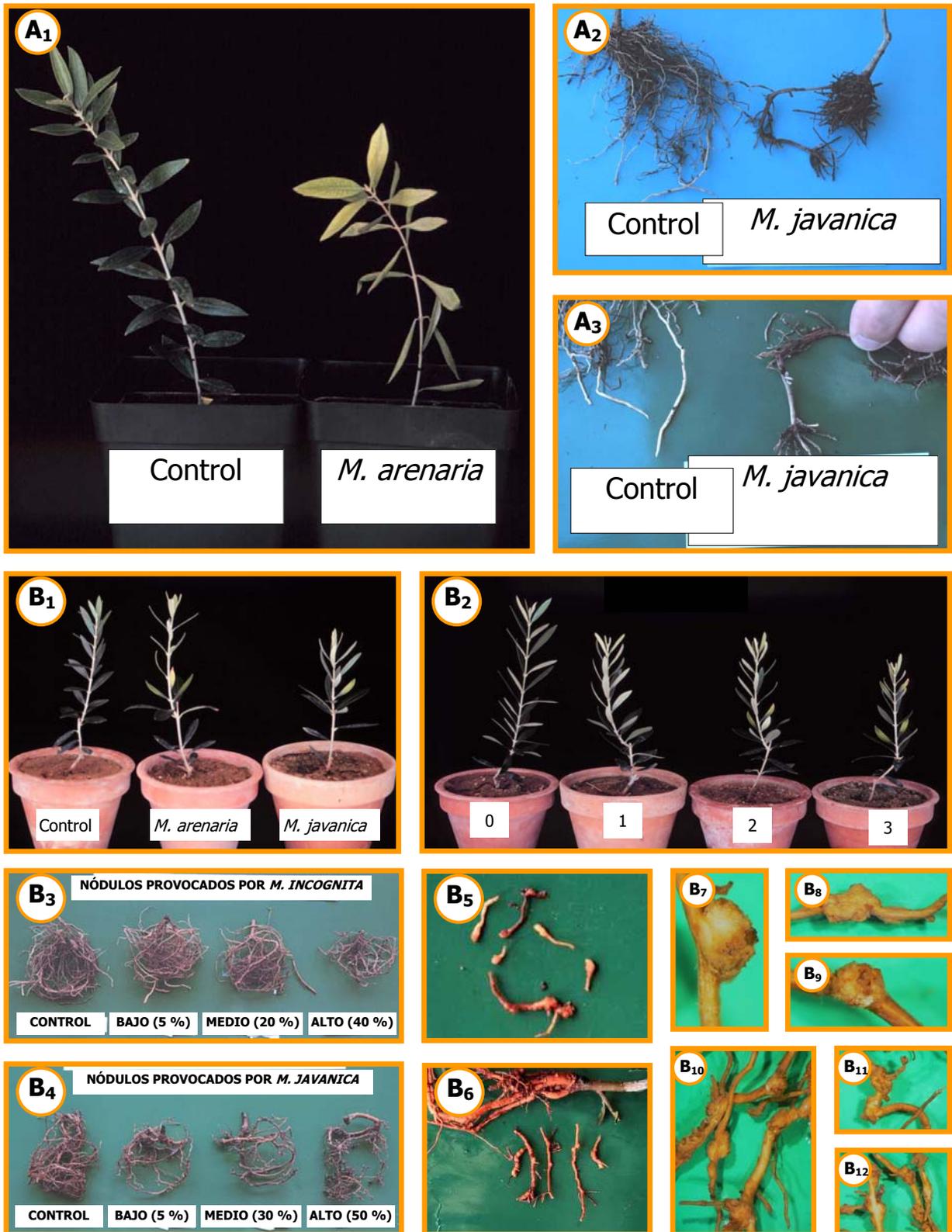
Nº	Tratamientos	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo	Nematodos/ g raíz	Índice de nodulación <sup>b</sup>	Pf <sup>c</sup>	Rf <sup>d</sup> (Pf/Pi)
1	<i>M. arenaria</i>	79,8	14831,1	1,6316	22465	1,4967
2	<i>M. incognita</i>	23,6	12187,9	2,1500	15263	1,0175
3	<i>M. javanica</i>	45,9	11341,5	1,900	15659	1,0439
4	<i>P. penetrans</i>	36,4	2113,9	- <sup>f</sup>	4505	0,9010
5	<i>P. vulnus</i>	24,5	3261,8	-	5684	1,1368
Contrastes <sup>e</sup>						
(1-3) vs. (4-5)		-	-	-	-	0,0048
1 vs. (2-3)		<0,0001	0,0057	ns	<0,0001	<0,0001
2 vs. (1,3)		0,0007	ns	ns	0,0091	0,0036
3 vs. (1,2)		ns	ns	ns	0,0377	0,0149
4 vs. 5		ns	<0,0001	-	0,0053	0,0070

<sup>a</sup>Los datos corresponden a la media de 20 plantas por tratamiento, y se determinaron 70 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 5.000 nematodos/planta de *Pratylenchus* spp. o 15.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *Meloidogyne* spp. Los plantones crecieron en macetas de plástico (2,5 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a  $24 \pm 1^\circ$  C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a  $200 \pm 20 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . <sup>b</sup>Severidad de la nodulación evaluada según la escala 1 = 0-10 % del sistema radical nodulado, 2 = 10-20 %, 3 = 20-40 %, 4 = 40-70 %, 5 = 70-90 %, 6 = 90-100 %. <sup>c</sup>Población final total de nematodos en suelo y en raíz. <sup>d</sup>Tasa de reproducción (población final/población inicial) <sup>e</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns = no significativo ( $P > 0,05$ ); - = no evaluado.

### 3.3.3. PRUEBA DE PATOGENICIDAD: SEGUNDO EXPERIMENTO

#### 3.3.3.1. Sintomatología

Al final del experimento, los plantones del cv. Picual infectados por *Meloidogyne* spp. presentaban de forma generalizada una clorosis pronunciada en las hojas jóvenes que, en los casos más graves, resultaba en necrosis marginales y defoliación (Fig.3.3). Las plantas afectadas en menor medida solo presentaban esa sintomatología en las hojas de la parte distal del tallo, mientras que en grados crecientes de severidad los síntomas afectaron las hojas en un número mayor de nudos, siempre en progresión basípeta. A fin de estimar la intensidad del daño y poder realizar comparaciones entre los tratamientos, se elaboró una escala de severidad de 0 a 5 y dicho daño se evaluó en cada una de las repeticiones de los tratamientos que resultaron afectados. La escala de 0 a 5 se elaboró de acuerdo con el



**Fig. 3.3.** Reacción de las plantas en las pruebas de patogenicidad **A)** Primer experimento de la prueba de patogenicidad: A<sub>1</sub>) Síntomas en la parte aérea causados por la infección de *Meloidogyne javanica* A<sub>2</sub>) y A<sub>3</sub>) Síntomas causados por *Meloidogyne javanica* en raíces de plantas de olivo infectadas **B)** Segundo experimento de la prueba de capacidad reproductiva: B<sub>1</sub>) Síntomas causados por *Meloidogyne* spp. en la parte aérea de plantas de 'Picual' B<sub>2</sub>) Escala de severidad adoptada para la evaluación de síntomas B<sub>3</sub>) a B<sub>12</sub>) Síntomas causados por *Meloidogyne* spp. en la raíz de plantas de olivo infectadas.



porcentaje de tejido foliar afectado (0 = Planta sana; 1 = clorosis en algunas hojas del 25 % superior de la planta; 2 = clorosis y leve defoliación en dicho 25 % apical y clorosis en el resto del tercio apical; 3 = muerte del brote apical, clorosis y defoliación en el resto del tercio apical y clorosis en el resto de la mitad apical; 4 = defoliación grave en toda la mitad apical, clorosis en alguna parte de la mitad basal; 5 = planta muerta. Los resultados se exponen en el apartado correspondiente junto a los del índice de nodulación (Tabla 3.9).

### **3.3.3.2. Control de calidad del inóculo**

Las inoculación de plantas de tomate susceptible mostraron que el inóculo de las tres especies de *Meloidogyne* spp. cumplía los requisitos para asegurar un buen nivel de infección. *M. arenaria* originó una de nodulación media del 70 % y la tasa media de reproducción obtenida fue de 136,0. En el caso de *M. incognita*, estos valores fueron de 77,5 % y 105,0 respectivamente, mientras que los registrados con *M. javanica* fueron 80 % y 168,9, respectivamente.

### **3.3.3.3. Influencia de la infección por *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. sobre el crecimiento de plantones de olivo**

#### **3.3.3.3.1. Cultivar Arbequina**

En el segundo experimento de patogenicidad las variables e índices de crecimiento mostraron, para todos los casos sin excepción, valores superiores a los obtenidos en el primero. En todos los tratamientos los índices correspondientes a la altura total, el diámetro del brote principal y el número de nudos mostraron un crecimiento relativo superior al 100 % (Tabla 3.8). En el caso extremo máximo, la altura total de las plantas control alcanzó un incremento medio del 1028,0 %. El diámetro del tronco, en cambio, mostró incrementos relativos que fueron inferiores al 100 % y oscilaron entre un máximo de 45,9 % (plantas control) y un mínimo de 29,1 % (plantas inoculadas con *P. vulnus*). El peso fresco total final de la parte aérea varió entre un mínimo de 7,8 g, en plantas inoculadas con *M. javanica*, y un máximo de 10,0 g, en plantas inoculadas con *P. penetrans*. El peso fresco final de la raíz tuvo su máximo valor promedio en las plantas control (3,7 g), mientras que el mínimo se registró en las plantas inoculadas con *M. javanica* (2,9 g).

El análisis de la varianza indicó que el crecimiento relativo de la altura total, el crecimiento relativo del diámetro del brote principal, el incremento relativo del número de nudos y el peso fresco total fueron afectados significativamente por la infección por nematodos lesionadores o noduladores de raíz ( $P = 0,012$ ,  $P = 0,025$ ,  $P = 0,008$  y  $P <$

0,001, respectivamente). El resto de los parámetros considerados (crecimiento relativo del diámetro del tronco, peso fresco de raíz y relación peso de raíz/peso parte aérea) no fueron afectados significativamente ( $P > 0,05$ ) por la infección de la planta y, por tanto, se mostraron como indicadores no sensibles a la infección por nematodos lesionadores y noduladores de raíz en las condiciones experimentales utilizadas.

El incremento relativo de la altura total en las plantas inoculadas con *Meloidogyne* spp. resultó significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) al de las plantas control no inoculadas y al de las plantas inoculadas con *Pratylenchus* spp. (Tabla 3.8). No se detectaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el resto de las comparaciones realizadas.

**Tabla 3.8.** Influencia de la infección de raíces de olivo por nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre el crecimiento de plantones del cv. Arbequina (segunda repetición)<sup>a</sup>.

Tratamiento	Crecimiento o incremento relativo				Peso fresco total (g)	Peso fresco raíz (g)
	Altura total <sup>b</sup>	Diámetro tronco <sup>c</sup>	Diámetro brote ppal. <sup>d</sup>	Nº nudos <sup>e</sup>		
0 Control	10,280	0,4588	2,2268	3,8458	9,6200	3,6500
1 <i>M. arenaria</i>	7,9808	0,3764	1,5724	3,1625	7,9421	2,9500
2 <i>M. incognita</i>	7,6501	0,4335	1,5882	3,1833	9,9778	3,4900
3 <i>M. javanica</i>	5,5632	0,3208	1,5030	2,6750	7,8333	2,8650
4 <i>P. penetrans</i>	9,8993	0,3608	1,7770	3,7875	9,9882	3,2750
5 <i>P. vulnus</i>	9,7415	0,2911	1,6346	4,0250	9,6944	3,5750
<b>Contrastes<sup>f</sup></b>						
0 vs. (1-5)	ns	ns	0,0008	ns	ns	ns
0 vs. (1-3)	0,0078	ns	0,0005	0,0128	ns	ns
0 vs. (4-5)	ns	ns	0,0101	ns	ns	ns
(1-3) vs. (4-5)	0,0040	ns	ns	0,0008	0,0082	ns
1 vs. (2-3)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2 vs. (1,3)	ns	ns	ns	ns	0,0012	ns
3 vs. (1,2)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
4 vs. 5	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>a</sup>Los datos corresponden a la media de 20 plantas por tratamiento, y se determinaron 135 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 5.000 nematodos/planta de *Pratylenchus* spp. o 15.000 huevos+/planta de *Meloidogyne* spp. Los plantones crecieron en macetas de arcilla (1 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a  $24 \pm 1^\circ$  C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a  $200 \pm 20 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . <sup>b</sup>Crecimiento relativo de la altura total = (altura total final - altura total inicial)/altura total inicial. <sup>c</sup>Crecimiento relativo del diámetro de tronco = (diámetro tronco final - diámetro tronco inicial)/diámetro tronco inicial. <sup>d</sup>Crecimiento relativo del diámetro del brote ppal. = (diámetro final brote ppal. - diámetro inicial brote ppal.)/diámetro inicial brote ppal.. <sup>e</sup>Incremento relativo del número de nudos = (número de nudos final - número de nudos inicial)/ número de nudos inicial. <sup>f</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns =no significativo ( $P > 0.05$ ).

El crecimiento relativo del diámetro del brote principal alcanzó un valor significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en las plantas control, comparado con el de las plantas inoculadas con *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. consideradas en su totalidad (Tabla 3.8). No se detectaron, en cambio, diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre nematodos noduladores y lesionadores, o entre las especies del mismo género (Tabla 3.8).

El incremento relativo del número de nudos fue significativamente superior ( $P <$

0,05) en las plantas control comparado con las plantas inoculadas con *Meloidogyne* spp. Asimismo, este parámetro resultó significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en las plantas inoculadas con *Pratylenchus* spp. que en las inoculadas con *Meloidogyne* spp., sin que existieran diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el resto de las comparaciones realizadas (Tabla 3.8).

### 3.3.3.3.2. Cultivar Picual

La tendencia general de las variaciones en los valores e índices de crecimiento que se registraron en el segundo experimento de patogenicidad en 'Picual' fue similar a la que se verificó para 'Arbequina'. Al igual que ocurrió con este cultivar todas las medias de los diversos parámetros en 'Picual' fueron, en este segundo experimento, superiores a las obtenidas en el primero. En todos los tratamientos los índices correspondientes a la altura total, el diámetro del brote principal y el número de nudos mostraron un crecimiento relativo superior al 100 % (Tabla 3.9). El caso extremo máximo ocurrió con la altura total de las plantas inoculadas con *P. vulnus*, que presentó un incremento medio del 1306,8 %. El diámetro del tronco, en cambio, mostró incrementos relativos que fueron inferiores al 100 % y oscilaron entre un máximo de 84,8 % (plantas control) y un mínimo de 55,0 % (plantas inoculadas con *P. penetrans*). El peso fresco final de la parte aérea varió entre un mínimo de 9,7 g, para las plantas inoculadas con *M. javanica*, y un máximo de 11,7 g, para las plantas inoculadas con *P. penetrans*. El peso fresco final de la raíz tuvo su máximo valor medio en las plantas inoculadas con *P. penetrans* (5,6 g), mientras que el mínimo se registró en el control (4,5 g).

El análisis de varianza indicó que cuatro de los parámetros analizados se vieron afectados de forma significativa ( $P < 0,05$ ) por la inoculación de nematodos noduladores y lesionadores de raíz (Tabla 3.9). Éstos parámetros fueron el crecimiento relativo del diámetro del tronco ( $P = 0,022$ ), el crecimiento relativo del diámetro del brote principal ( $P = 0,040$ ) y la severidad de los daños en la parte aérea ( $P < 0,001$ ). Ninguno de los otros parámetros considerados (altura total, peso fresco total y peso fresco de raíz) se vió afectado significativamente ( $P > 0,05$ ) por la infección de las plantas (Tabla 3.9).

El crecimiento relativo del diámetro del tronco y del diámetro del brote principal resultaron significativamente mayores ( $P < 0,05$ ) en las plantas control que en las plantas inoculadas con nematodos noduladores o lesionadores consideradas en su totalidad, no existiendo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre las especies del mismo género (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9.** Influencia de la infección de raíces de olivo por nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre el crecimiento de plántones del cv. Picual (segunda repetición)<sup>a</sup>.

Tratamientos	Crecimiento o incremento relativo				Severidad de daños en parte aérea	Peso Fresco total (g)	Peso fresco raíz (g)
	Altura total <sup>b</sup>	Diámetro tronco <sup>c</sup>	Diámetro brote ppal. <sup>d</sup>	Nº nudos <sup>e</sup>			
0 Control	11,659	0,8477	2,0210	4,1717	0,1000	9,9632	4,4750
1 <i>M. arenaria</i>	11,576	0,6410	1,5852	3,6167	1,0500	10,437	5,2850
2 <i>M. incognita</i>	11,257	0,5907	1,4400	4,0750	0,3500	10,637	4,9650
3 <i>M. javanica</i>	9,378	0,6397	1,4818	3,4958	1,0500	9,7050	5,0400
4 <i>P. penetrans</i>	12,553	0,5503	1,5986	3,8583	0,1500	11,716	5,5700
5 <i>P. vulnus</i>	13,068	0,4865	1,4291	3,9583	0,0500	9,8550	4,7300
Contrastes <sup>f</sup>							
0 vs. (1-5)	ns	0,0014	0,0013	ns	0,0020	ns	ns
0 vs. (1-3)	ns	0,0102	0,0021	ns	<0,0001	ns	ns
0 vs. (4-5)	ns	0,0004	0,0043	ns	ns	ns	ns
(1-3) vs. (4-5)	ns	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns
1 vs. (2-3)	ns	ns	ns	ns	0,0230	ns	ns
2 vs. (1,3)	ns	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns
3 vs. (1,2)	ns	ns	ns	ns	0,0230	ns	ns
4 vs. 5	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>a</sup>Los datos corresponden a la media de 20 plantas por tratamiento, y se determinaron 135 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 5.000 nematodos /planta de *Pratylenchus* spp. o 15.000 huevos+/planta de *Meloidogyne* spp. Los plántones crecieron en macetas de arcilla (1 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a  $24 \pm 1^\circ \text{C}$  y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a  $200 \pm 20 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . <sup>b</sup>Crecimiento relativo de la altura total = (altura total final - altura total inicial)/altura total inicial. <sup>c</sup>Crecimiento relativo del diámetro de tronco = (diámetro tronco final - diámetro tronco inicial)/diámetro tronco inicial. <sup>d</sup>Crecimiento relativo del diámetro del brote ppal. = (diámetro final brote ppal. - diámetro inicial brote ppal.)/diámetro inicial brote ppal.. <sup>e</sup>Incremento relativo del número de nudos = (número de nudos final - número de nudos inicial)/ número de nudos inicial. <sup>f</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns = no significativo ( $P > 0.05$ ).

Las plantas inoculadas con *Meloidogyne* spp. mostraron un índice de severidad de los síntomas significativamente superior ( $P < 0,05$ ) al de las plantas control o las inoculadas con *Pratylenchus* spp. que no mostraron síntomas aéreos de clorosis o defoliación, salvo en casos muy excepcionales (Tabla 3.9). Asimismo, la severidad de síntomas aéreos resultó significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) en las plantas inoculadas con *M. incognita* que en las lo que fueron con las otras dos especies del género. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en este parámetro entre el control y las plantas inoculadas con *Pratylenchus* spp. ni entre *P. penetrans* y *P. vulnus*.

### 3.3.3.4. Reproducción de nematodos noduladores y lesionadores de raíz en plántones de olivo inoculados

#### 3.3.3.4.1. Cultivar Arbequina

El análisis de varianza y los contrastes ortogonales realizados indicaron que el índice de reproducción de los nematodos noduladores fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) al de los lesionadores de raíz (Tabla 3.10). Asimismo, entre los nematodos noduladores, *M. arenaria* presentó una índice de reproducción significativamente superior ( $P < 0,05$ ) al de *M.*

*incognita* y *M. javanica* (Tabla 3.10). *M. incognita* tuvo un índice de reproducción significativamente más bajo ( $P < 0,05$ ) que el de las otras dos especies consideradas conjuntamente, mientras que el índice de reproducción de *M. javanica*, en cambio, fue similar ( $P > 0,05$ ) al de las otras dos especies consideradas conjuntamente (Tabla 3.10). Tampoco se detectaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el índice de reproducción de los nematodos lesionadores de raíz (Tabla 3.10).

El mayor índice de nodulación se alcanzó en plantas inoculadas con *M. arenaria* (IN = 1,63). No hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en la nodulación causada en plantas infectadas por las distintas especies de *Meloidogyne* (Tabla 3.10).

**Tabla 3.10.** Reproducción de nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre plantones de olivo del cv. Arbequina (segunda repetición)<sup>a</sup>.

Tratamiento	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo	Nematodos/ g raíz	Índice de nodulación <sup>b</sup>	Pf <sup>c</sup>	Rf <sup>d</sup> (Pf/Pi)
1 <i>M. arenaria</i>	117,31	11294	1,6316	32999	2,1999
2 <i>M. incognita</i>	99,45	7154,9	1,2632	23799	1,5853
3 <i>M. javanica</i>	92,10	10314	1,6000	27761	1,8507
4 <i>P. penetrans</i>	32,87	2148,2	-	6694,3	1,3388
5 <i>P. vulnus</i>	51,95	2147,2	-	7617,5	1,5235
Contrastes <sup>e</sup>					
(1-3) vs. (4-5)	-	-	- <sup>f</sup>	-	<0,0001
1 vs. (2-3)	ns	0,0366	ns <sup>g</sup>	0,0027	0,0012
2 vs. (1,3)	ns	0,0015	ns	0,0039	0,0021
3 vs. (1,2)	ns	ns	ns	ns	ns
4 vs. 5	ns	ns	-	ns	ns

<sup>a</sup>Los datos corresponden a la media de 20 plantas por tratamiento, y se determinaron 135 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 5.000 nematodos /planta de *Pratylenchus* spp. o 15.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *Meloidogyne* spp. Los plantones crecieron en macetas de arcilla (1 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1° C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a 200 ± 20 μEm-2s-1. <sup>b</sup>Severidad de la nodulación calificada según la escala 1 = 0-10 % del sistema radical nodulado, 2 = 10-20 %, 3 = 20-40 %, 4 = 40-70 %, 5 = 70-90 %, 6 = 90-100 %, <sup>c</sup>Población final total de nematodos en suelo y en raíz. <sup>d</sup>Tasa de reproducción (población final/población inicial) <sup>e</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns=no significativo ( $P > 0.05$ ); -= no evaluado.

El número de nematodos en el suelo varió entre un máximo de 117,3 nematodos/100 cm<sup>3</sup>, para *M. arenaria* y un mínimo de 32,9 nematodos/100 cm<sup>3</sup> para *P. penetrans* (Tabla 3.10). El número de nematodos en raíz, por su parte, osciló entre un mínimo de 2147,2 nematodos/g de raíz, en las plantas inoculadas con *P. vulnus* y un máximo de 11294 nematodos/g de raíz en las plantas inoculadas con *M. arenaria*. La máxima población final se verificó en las plantas inoculadas con *M. arenaria* (32999 nematodos), mientras que la mínima fue la que se encontró en las plantas inoculadas con *P. penetrans* (6694,3 nematodos). A diferencia de lo que ocurrió en el primer experimento, todos los valores de la tasa de reproducción fueron superiores a 1. El máximo valor correspondió

nuevamente a *M. arenaria* (2,199), mientras que el mínimo se encontró en *P. penetrans* (1,339) (Tabla 3.10). Los contrastes ortogonales realizados indicaron que *M. arenaria* presentó un número de nematodos en raíz y una población final significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) a las otras dos especies del género *Meloidogyne* (Tabla 3.10). Por su parte, *M. incognita* presentó un número de nematodos y población final significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) a los registrados en las otras dos especies del género *Meloidogyne*, sin que se registraran diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el número de nematodos en suelo (Tabla 3.10). Asimismo, los contrastes ortogonales indicaron que no existieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el número de nematodos en suelo y raíz ni en la población final entre las dos especies de *Pratylenchus* spp. (Tabla 3.10).

#### 3.3.3.4.2. Cultivar Picual

Todos los índices de reproducción de los nematodos noduladores y lesionadores de raíz resultaron superiores a 1 (Tabla 3.11). La tasa de reproducción máxima correspondió a *P. vulnus*, (2,305), mientras que *M. incognita* (1,329) presentó la mínima. El análisis de varianza y los contrastes ortogonales realizados indicaron que el índice de reproducción de los nematodos noduladores fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) al de los lesionadores de raíz (Tabla 3.11). Asimismo, entre los nematodos lesionadores *P. vulnus* presentó una índice de reproducción significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que *P. penetrans* (Tabla 3.11). No se detectaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), en cambio, en el índice de reproducción entre los distintos nematodos noduladores de raíz (Tabla 3.11).

La densidad final de nematodos en el suelo varió entre un mínimo de 25,8 nematodos/100 cm<sup>3</sup> para *M. incognita*, y un máximo de 124,5 nematodos/100 cm<sup>3</sup> para *P. vulnus* (Tabla 3.11). El número de nematodos en la raíz varió entre un mínimo de 1408,5 nematodos/g de raíz para *P. penetrans* y un máximo de 4523,3 nematodos/g de raíz para *M. incognita*. El máximo registro en la población final de nematodos correspondió a *M. javanica* con 23512 nematodos por planta, mientras que el mínimo valor se encontró en *P. penetrans*, con 7467,2 nematodos por planta. El número de nematodos en suelo fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ) en *M. arenaria* que en las otras dos especies de *Meloidogyne* spp. Asimismo, el número de nematodos en suelo en las plantas inoculadas con *M. incognita* fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) al de las plantas inoculadas con las otras dos especies de *Meloidogyne* sp.. No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) dentro de *Meloidogyne* spp. en ninguno de los contrastes interespecíficos referidos al número de nematodos en suelo, número de nematodos en la raíz o en población final por planta (Tabla 3.11).

El número de nematodos en suelo, en raíz y la población final verificado en las plantas inoculadas con *P. vulnus* fueron significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) a los que tuvieron lugar en las inoculadas con *P. penetrans* (Tabla 3.11).

**Tabla 3.11.** Reproducción de nematodos lesionadores y noduladores de raíz sobre plantones de olivo del cultivar Picual (segunda repetición)<sup>a</sup>.

Tratamiento	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo	Nematodos/ g raíz	Índice de nodulación <sup>b</sup>	Pf <sup>c</sup>	Rf <sup>d</sup> (Pf/Pi)
1 <i>M. arenaria</i>	25,76	4355,3	1,2500	22022	1,4734
2 <i>M. incognita</i>	91,86	4523,4	1,1000	19919	1,3287
3 <i>M. javanica</i>	54,16	5122,7	1,5263	23512	1,5656
4 <i>P. penetrans</i>	35,27	1408,5	- <sup>f</sup>	7467,2	1,4919
5 <i>P. vulnus</i>	124,52	2414,0	-	11482	2,3045
Contrastes <sup>e</sup>					
(1-3) vs. (4-5)	-	-	-	-	<0,0001
1 vs. (2-3)	<0,0001	ns	ns	ns	ns
2 vs. (1,3)	<0,0001	ns	ns	ns	ns
3 vs. (1,2)	ns	ns	ns	ns	ns
4 vs. 5	0,0002	0,0005	-	<0,0001	<0,0001

<sup>a</sup>Los datos corresponden a la media de 20 plantas por tratamiento, y se determinaron 135 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 5.000 nematodos /planta de *Pratylenchus* spp. o 15.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *Meloidogyne* spp. Los plantones crecieron en macetas de arcilla (1 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a  $24 \pm 1^\circ$  C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a  $200 \pm 20 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . <sup>b</sup>Severidad de la nodulación calificada según la escala 1 = 0-10 % del sistema radical nodulado, 2 = 10-20 %, 3 = 20-40 %, 4 = 40-70 %, 5 = 70-90 %, 6 = 90-100 %, <sup>c</sup>Población final total de nematodos en suelo y en raíz. <sup>d</sup>Tasa de reproducción (población final/población inicial) <sup>e</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns =no significativo ( $P > 0.05$ ); -= no evaluado.

## 3.4. DISCUSIÓN

### 3.4.1. CAPACIDAD REPRODUCTIVA

Aislados e identificados los nematodos fitoparásitos asociados a la raíz y rizosfera de plantones de olivo, el siguiente paso en el proceso de la evaluación de patogenicidad de los mismos sobre plantones de olivo es determinar su capacidad reproductiva sobre los cultivares de olivo de mayor importancia en la olivicultura española ('Arbequina' y 'Picual'). Como se indicó en el apartado 3.1.2.1., una determinada especie o cultivar de planta debe considerarse huésped de una especie o población de nematodo fitoparásito sólo cuando entre ambos se establece una relación huésped-parásito compatible. Por ello, la tasa o índice de reproducción de un nematodo fitoparásito es una medida del nivel de resistencia o susceptibilidad de la planta huésped sobre la que establece la relación de parasitismo (Seinhorst, 1969; Taylor, 1971; Westcott y Zehr, 1991). El parámetro más utilizado para

medir la capacidad reproductiva de un nematodo en una planta huésped es el “índice o tasa de reproducción” (Rf). En frutales, se suelen calificar como plantas “no huésped” a aquellas especies o cultivares que determinan un  $Rf < 1$ , “huésped pobre” a aquellas con un  $1 < Rf < 1,5$  y “huésped” a aquellas con un  $Rf > 1,5$  (Marull y Pinochet, 1991).

En los dos experimentos en que se evaluó la capacidad reproductiva de los nematodos, las especies cuya tasa de reproducción resultó superior a 1 en los dos cultivares de olivo evaluados fueron *C. xenoplax*, *H. pseudorobustus* y *H. vulgaris*. Estos resultados indican que dichos nematodos establecieron una relación huésped-parásito compatible con ‘Arbequina’ y ‘Picual’. De acuerdo con los resultados de cada experimento, ‘Picual’ se comporta como “huésped” o “huésped pobre” para *C. xenoplax*, mientras que ‘Arbequina’ aparece como un “huésped pobre” en ambas repeticiones (Tablas 3.1, 3.2). Ambos cultivares de olivo son “huéspedes” de los nematodos espirales, excepto ‘Arbequina’ de *H. vulgaris* para el que debe considerarse como un “huésped pobre” (Tabla 3.3).

Estos resultados son coherentes con los datos existentes en la literatura fitonematológica, que sitúan a *C. xenoplax* como parásito preferente de especies leñosas (Ap. 2.4.2.1). Sin embargo, los índices de reproducción obtenidos en plantones de olivo son claramente inferiores a los que han sido verificados en otras especies frutales claramente susceptibles, como melocotonero. Aplicando el modelo grados-día elaborado por Westcott y Burrows (1991), se puede estimar que en las condiciones experimentales de nuestro ensayo (45 días a 20 °C) el factor de reproducción de *C. xenoplax* sobre plantas de melocotonero de los cvs. Lovell o Nema-guard hubiera sido de  $Rf = 11,8$ . Del mismo modo, existen indicios para suponer que *C. xenoplax* podría reproducirse mejor sobre muchas especies herbáceas que sobre el olivo. Zehr *et al.* (1990a) evaluaron la reproducción del nematodo en varias malas hierbas que acompañan habitualmente al melocotonero obteniendo índices de reproducción muy elevados (i.e., 52,4 en *Trifolium nigrescens* Viv.; 49,11 en *Lotus uliginosus* Schkur.), lo cual sugiere que muchas especies herbáceas son mejores huéspedes de *C. xenoplax* que el olivo. Los nematodos espirales, por su parte, se han asociado tanto a especies herbáceas como leñosas (Gómez-Barcina *et al.*, 1989; Espárrago y Navas, 1995; Lamberti *et al.*, 1992; Vovlas y Laritza, 1994).

Por tanto, si bien el olivo no es un huésped particularmente favorable para *C. xenoplax*, *H. pseudorobustus* y *H. vulgaris*, estos nematodos presentan una tasa de reproducción suficientemente alta en plantones de olivo como para considerarlas especies potencialmente peligrosas para el crecimiento de los mismos. Teniendo en cuenta el ciclo biológico de estas especies (Fortuner, 1985; Lownsbery, 1961; Seshadri, 1965; Westcott y

Burrows, 1991), los resultados obtenidos indican que en pocas generaciones y a partir de densidades de población relativamente bajas en suelo pueden generarse altas densidades de estos nematodos. En ausencia de otros nematodos fitoparásitos que compitieran por los mismos nichos, estas especies podrían comprometer el crecimiento de los plantones de olivo. Por ello, debe confirmarse aún si en estas condiciones estas especies pueden comportarse como patógenos de plantones de olivo y ésto alienta a continuar las investigaciones en ese sentido.

Los valores del índice de reproducción obtenidos para los lesionadores de raíz *P. thornei*, *P. fallax* y *Z. guevarai* en los dos experimentos resultaron, en cambio, muy inferiores a 1 en todos los casos y, por tanto, permiten catalogar a los dos cultivares de olivo como "no huéspedes" de estas especies. Estos datos contrastan con los valores de la tasa de reproducción que alcanzan estas especies en otros cultivos herbáceos en condiciones experimentales similares. *P. thornei*, por ejemplo, alcanzó una tasa de reproducción entre 36,7 y 332,3 en cultivares de garbanzo, *Cicer arietinum* L. (Castillo *et al.*, 1998b) y en menta (*Mentha piperita* Huds.) una entre 4,1 y 10,8 (Shukla *et al.*, 1998). Del mismo modo, aunque no existen datos precisos sobre la reproducción de *P. fallax* y *Z. guevarai* en condiciones controladas, ambas especies han sido encontradas abundantemente en plantas herbáceas como pastos (Seinhorst, 1977), y garbanzo y veza, *Vicia sativa* L. (Varo *et al.*, 1970), respectivamente.

Por tanto, estos datos confirman que estos tres nematodos lesionadores son reconocidos como parásitos de especies herbáceas como lo documentan los antecedentes recogidos precedentemente en la discusión del segundo capítulo (ver 2.4.2.2). Verdejo y Pinochet (1991) indican que la presencia de ciertas especies del género *Pratylenchus* como *P. neglectus* y *P. thornei* en la rizosfera de plantones de frutales debe asociarse más bien al origen del sustrato en tierras que contenían cereales cultivados o gramíneas espontáneas, que a la probabilidad de que los nematodos se reproduzcan sobre las raíces de los árboles. Asimismo, la escasa compatibilidad que existe entre huéspedes leñosos, en particular árboles frutales, y nematodos lesionadores de especies distintas a *P. vulnus* o *P. penetrans*, tiene varios antecedentes bibliográficos. Marull *et al.* (1990) comprobaron que la tasa de reproducción de *P. thornei* y *Z. guevarai* sobre cinco patrones de almendro, *Prunus dulcis* (Miller) Webb, fue inferior a 1 para las dos especies. Resultados similares obtuvieron Pinochet *et al.* (1991) al evaluar la reproducción de *P. thornei* sobre portainjertos de *Prunus* spp. y *Pyrus communis*.

### 3.4.2. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD: REPRODUCCIÓN DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

#### 3.4.2.1. Reproducción de *Meloidogyne* spp.

*M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* constituyen, junto con *M. hapla*, un subgrupo dentro del género *Meloidogyne* que destaca por la enorme amplitud de su rango de huéspedes. Éste abarca prácticamente todas las familias botánicas dentro de las plantas superiores y, sólo dentro de las plantas cultivadas, alcanza a 1700 especies (Barker, 1998). Estas especies de *Meloidogyne* sp. son reconocidas como fitoparásitos preferentes de especies herbáceas, si bien infectan del mismo modo un amplio grupo de especies leñosas y son reconocidas como patógenos de importancia económica en varios frutales, plantas leñosas industriales y especies forestales de interés (Jepson, 1987). La incidencia y patogenicidad de los nematodos noduladores está ampliamente documentada sobre una amplia gama de frutales (McElroy, 1972; Nyczepir y Halbrendt, 1993), si bien ha despertado particular interés en *Prunus* spp., donde la búsqueda de material vegetal con resistencia a estas especies constituye un objetivo primordial dentro de los programas de mejora (Brooks y Olomo, 1961; McKenry, 1989b; Marull *et al.*, 1991; Pinochet *et al.*, 1996b). En patrones susceptibles de *Prunus* spp. la capacidad reproductiva de *M. incognita* y *M. arenaria*, alcanzó valores superiores a 10 (Marull *et al.*, 1991). Asimismo, en algunos frutales y a partir de poblaciones iniciales muy bajas (0,25 nematodos por cm<sup>3</sup> de suelo) se obtuvieron tasas de reproducción aun más altas; *i.e.*, *M. incognita* alcanzó en kiwi, *Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang y Ferg., un factor de reproducción cercano a 60 (Di Vito *et al.*, 1988) y *M. arenaria* alcanzó en morera blanca, *Morus alba* L., un valor cercano a 435 (Castillo *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, si bien no permiten apreciar valores tan altos como los expuestos anteriormente, confirman que estas especies de nematodos noduladores se reproducen sobre los dos cultivares de olivo de mayor importancia económica en España: en todos los casos, con excepción de la tasa de reproducción obtenida por *M. incognita* sobre 'Arbequina' en el primer experimento, se obtuvieron valores del factor de reproducción superiores a 1.

Una mención especial merece *M. arenaria*, que si bien es reconocida por su carácter polífago, entre las tres evaluadas probablemente sea la especie a la que se atribuye en mayor medida la condición de preferencia por los huéspedes herbáceos. En este sentido, basta mencionar que *M. arenaria* es la única de este grupo de especies cuyo nombre vulgar –*nematodo nodulador del cacahuete*– alude a una cierta especialización parasítica y en particular sobre un huésped herbáceo, y que es, de las tres, la especie a la que se le

atribuye un menor número de huéspedes leñosos en la literatura nematológica (Bello, 1983; Jepson, 1987). Por otra parte, los antecedentes bibliográficos sobre esta especie no establecen, con el mismo grado de certeza que para las otras dos, su asociación con el olivo. En este sentido cabe mencionar que el número de citas referidas a su presencia, así como el ámbito de dispersión geográfica que se le atribuye dentro de los países olivareros, es muy inferior al que presentan las otras dos especies (ver 2.4.2.3.). Jepson (1987) incluye al olivo dentro del rango de huéspedes de *M. hapla*, *M. incognita* y *M. javanica*, pero no dentro del de *M. arenaria*. Lamberti y Baines (1969b) hallaron que esta última especie no era patogénica sobre 'Ascolano' y 'Sevillano' y desde aquel momento la patogenicidad sobre el olivo y la compatibilidad huésped-patógeno no había vuelto a ser estudiada. En contraste con estos antecedentes, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican no sólo que *M. arenaria* se reproduce adecuadamente sobre los dos cultivares del olivo que se estudiaron, sino que lo hace en forma más abundante que las otras dos especies (ver tablas 3.6, 3.7 y 3.10).

Sasanelli *et al.* (1997) evaluaron la reacción de varios cultivares de olivo frente a infecciones por *M. incognita* y *M. javanica* y encontraron en dichas especies una capacidad reproductiva superior a la verificada en nuestro trabajo sobre 'Arbequina' y 'Picual'. Las condiciones experimentales fueron similares en los dos estudios en lo que se refiere a duración del experimento y temperatura, pero difirieron en la densidad de inóculo inicial y en el tipo de inoculación utilizada. Por tanto, las diferencias observadas entre la respuesta de los cultivares italianos y los españoles puede obedecer a la diferente viabilidad del inóculo empleado en cada caso.

#### **3.4.2.2. Reproducción de *Pratylenchus* spp.**

*P. penetrans* y *P. vulnus* constituyen los nematodos lesionadores asociados más estrechamente a los frutales de clima templado (ver 2.4.2.2.). El rango de huéspedes de *P. vulnus* dentro de las plantas cultivadas incluye casi exclusivamente especies leñosas entre frutales, forestales y ornamentales, si bien comprende también algunos representantes herbáceos de importancia como forrajeras u hortícolas (Barker, 1998). La capacidad reproductiva de esta especie sobre múltiples árboles frutales de clima de templado ha sido evaluada en trabajos previos. Pinochet *et al.* (1992c) evaluaron la reproducción de una población de *P. vulnus* (aislada de rosal en Cabrils, Barcelona) sobre 37 patrones de árboles frutales pertenecientes a una amplia gama de familias botánicas, incluyendo frutales de hueso, de pepita, de cáscara, cítricos, aguacate (*Persea americana* Mill.), níspero japonés (*Eriobotrya japonica* (Tunb.) Lindl.), olivo y vid. Todos los patrones permitieron la

reproducción del nematodo ( $Pf/Pi > 1$ ), con excepción de seis patrones de *Citrus* spp., tres patrones de *Vitis* spp. y 'Arbequina', que presentó un índice de reproducción de 0,9. Algunas especies, como níspero y manzano, se mostraron como huéspedes particularmente susceptibles alcanzando valores del índice de reproducción superiores a 20. Del mismo modo la tasa de reproducción alcanzada por *P. vulnus* en *Prunus* spp. en este trabajo y en otros posteriores resulta siempre elevada (Pinochet *et al.*, 1996a, 1996b) y alcanzó incluso valores superiores a 20, como en 'Julior' (Hernández-Dorrego *et al.*, 1999), si bien demuestra un rango muy amplio de respuestas.

Estos valores tan elevados del índice de reproducción contrastan con los obtenidos en nuestro trabajo. Sin embargo, tanto para 'Picual' como para 'Arbequina' el valor del índice de reproducción fue superior a 1 en los dos experimentos y esto sugiere que, aunque con una tasa de reproducción inferior a la que ocurre en otros frutales, *P. vulnus* se reproduce en olivo. Las discrepancias observadas entre nuestros resultados y los obtenidos por Pinochet *et al.* (1992c) sobre 'Arbequina' podrían deberse a la utilización de aislados o poblaciones procedentes de diferentes ámbitos geográficos adaptados a diferentes óptimos de temperatura para su reproducción y posiblemente también a diferencias en el material vegetal utilizado. Por otra parte, es posible que el rango de respuesta varietal en el olivo hacia *P. vulnus* sea bastante amplio, como lo sugieren los valores obtenidos por Lamberti *et al.* (2000), que fluctúan entre 4,7 y 10,9 para 'Leccino', y entre 2,5 y 5,2, para 'Pendolino'.

Resulta más difícil contrastar los resultados de la capacidad patogénica obtenida para *P. penetrans*. Se conoce de este nematodo la enorme importancia económica que representa para los frutales de clima templado. Su rango de huéspedes es muy amplio e incluye 400 especies de plantas y una gran cantidad de frutales, incluyendo a todos los patrones comerciales de melocotonero, manzano y peral que son susceptibles a esta especie (Nyczepir y Halbrendt, 1993). Sin embargo, a diferencia de *P. vulnus*, *P. penetrans* no tiene una predilección particular por huéspedes leñosos y su patogenicidad ha sido estudiada especialmente sobre huéspedes herbáceos como fresa *Fragaria* spp., patata (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) o alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Brodie, 1998; Esnard y Zuckerman, 1998; Griffin, 1998). Potter *et al.* (1984) estudiaron la reproducción de *P. penetrans* sobre patrones de melocotonero y encontraron tasas de reproducción que fluctuaron entre 6,4 y 20,3, lo que sugiere una buena compatibilidad entre este nematodo y esta especie de árbol frutal. No contamos con antecedentes de infecciones de *P. penetrans* en olivo que permitan contrastar nuestros resultados. No obstante, los valores obtenidos en nuestros experimentos acerca de la reproducción de *P. penetrans* sobre el olivo permiten auspiciar que la compatibilidad huésped-parásito en este patosistema es baja. Las tasas de

reproducción de *P. penetrans* en los dos experimentos indican que, si bien hubo infección ya que se recuperó un número considerable de nematodos en la raíz, la reproducción fue baja (0,68-1,34 en 'Arbequina', y 0,90-1,49 en 'Picual') (Tablas 3.6, 3.7, 3.10, 3.11). Ésto indica que ambos cultivares pueden catalogarse como "huéspedes pobres" (Marull y Pinochet, 1991; Pinochet *et al.*, 1996b).

### **3.4.3. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD: INFLUENCIA DE LA INFECCIÓN POR NEMATODOS NODULADORES Y LESIONADORES DE RAÍZ SOBRE EL CRECIMIENTO DE PLANTONES DE OLIVO**

#### **3.4.3.1. Efectos del parasitismo sobre el aspecto de las plantas**

En el primer experimento de patogenicidad pudo comprobarse que algunas de las plantas inoculadas con *Meloidogyne* spp. presentaban clorosis en las hojas superiores (Fig. 3.3.). Sin embargo, la correlación entre la infección y la sintomatología no pudo establecerse en forma clara debido a la interferencia provocada por una clorosis férrica generalizada (ver 3.3.2.2.). En el segundo experimento, aun habiendo tomado la precaución de suplementar la fertilización con quelatos de hierro, pudo comprobarse que en el cv. Picual la clorosis volvía a ocurrir pero sólo en plantas inoculadas con *Meloidogyne* spp.

La expresión de síntomas en órganos aéreos del olivo debidos al parasitismo provocado por *Meloidogyne* spp. ya había sido referida por Lamberti y Baines (1969a), que mencionan la defoliación de 'Ascolano' y 'Manzanillo' causada por *M. javanica* y *M. incognita*. La presencia de una clorosis generalizada sugiere un efecto perjudicial del parasitismo sobre la nutrición mineral (Melakerberhan y Webster, 1993). Este síntoma ha sido señalado en múltiples ocasiones como un elemento asociado a la infección por nematodos en viveros de especies leñosas, y en particular *Meloidogyne* spp. (Bello, 1983; Pinochet *et al.*, 1992a; Cuadra *et al.*, 1999; Talavera *et al.*, 1999). La clorosis, observada en las hojas más jóvenes del olivo tal como ha ocurrido en nuestros experimentos, podría deberse a la carencia nutricional de uno o más de los siguientes elementos: N, K, Fe o B (Fernández-Escobar, 1998). Algunos autores han señalado previamente la interferencia que sobre la absorción de determinados nutrientes en frutales provoca el parasitismo por nematodos. Townshend (1990) sugiere que la coloración púrpura en plantones de peral afectados por *P. penetrans* puede obedecer a una carencia de P, mientras que una deficiencia de Zn inducida por *Meloidogyne* spp. ha sido señalada en pecán (Johnson, 1986). Asimismo, Nasr *et al.* (1980) encontraron que *M. incognita* y *M. javanica* provocan reducciones significativas en la

concentración foliar de Fe en almendro y en la concentración de este elemento en raíces, tanto en almendro como en melocotonero. Por tanto, la aparición de síntomas cloróticos claramente asociados a la infección por *Meloidogyne* spp. en nuestros experimentos, estimula a comprobar experimentalmente el efecto que estos nematodos pueden tener sobre el metabolismo del N en el olivo. El mantenimiento de adecuados niveles nutricionales de este elemento resulta fundamental para los objetivos trazados por la nueva olivicultura en las etapas de vivero e implantación debido, además de los motivos que caben aplicarse a cualquier planta cultivada, a dos razones fundamentales: ésto asegura que se mantenga la dominancia apical que se pretende durante el establecimiento del nuevo olivar y garantiza un acortamiento del período juvenil improductivo (Santos-Antunes, 1999).

Habitualmente se insiste en que el daño provocado por el parasitismo de los nematodos resulta poco aparente y que, por este motivo, puede pasar desapercibido. La posibilidad de correlacionar la infección de las raíces con la expresión de una sintomatología inequívoca en la parte aérea resulta, en este sentido, alentadora en tanto y en cuanto contribuye a facilitar la consideración del tema como un problema por parte del observador no especializado. Además, esta circunstancia puede facilitar la prospección en viveros al aportar un elemento que orienta en la toma de muestras y permite tomar medidas preventivas de forma anticipada, detectando el origen de la infestación y descartando las plantas afectadas.

Asimismo, los experimentos de patogenicidad mostraron que el parasitismo por *Meloidogyne* spp. se manifiesta claramente sobre las raíces de olivo en forma de nódulos radicales, confirmando así un hecho que había sido observado en las prospecciones de los viveros (ver 2.3.1.). Sin embargo, los valores obtenidos en los experimentos de patogenicidad (con un rango entre 1,1 y 2,9, en la escala 1-6), resultan claramente inferiores a los obtenidos por Sasanelli *et al.* (1997) en cultivares de olivo de origen italiano, que fluctúan entre 2,1 y 4,5 dentro de la misma escala. Estas diferencias entre ambos resultados pueden deberse a distintos comportamientos del material genético (ninguno de los cultivares evaluados fue utilizado en ambos experimentos, lo que impide poder efectuar una comparación válida) o a las diferencias en las condiciones experimentales utilizadas (tipo de inoculación y densidad de inóculo, temperatura, etc.).

#### **3.4.3.2. Peso fresco de la parte aérea**

En Fisiología Vegetal, el crecimiento se define como el incremento de biomasa que tiene lugar en una planta al cabo de un período de tiempo determinado. De esta definición se desprende que el peso de los órganos a considerar constituiría el parámetro más

adecuado para registrar el efecto del parasitismo sobre el crecimiento. El peso seco, es decir el peso de los tejidos vegetales sometidos artificialmente a deshidratación en estufa, constituye una medida apropiada del efecto potencial sobre el metabolismo de las sustancias generadas por fotosíntesis. Como se recoge en la introducción del presente capítulo (ver 3.1.3.3), Melakerberhan y Webster (1993) indican que una menor ganancia de materia seca en plantas infectadas puede deberse a una menor fotosíntesis neta, a una alteración en la relación fisiológica normal entre procesos anabólicos y catabólicos (fundamentalmente fotosíntesis y respiración), a una derivación de los fotosintatos para la satisfacción de las necesidades metabólicas de los organismos parásitos o a un efecto combinado de estos fenómenos. El contenido de humedad, resultante de la diferencia entre peso fresco y peso seco, permitiría, en cambio, verificar el efecto del parasitismo sobre las funciones de absorción de agua y la desviación respecto a las relaciones hídricas de la planta sana. En este trabajo sólo se ha evaluado el efecto de la patogenicidad sobre el peso fresco, por lo cual no fue posible comprobar la acción diferencial de ambos procesos.

En los experimentos de patogenicidad se comprobó que en algunas de las combinaciones nematodo-cultivar de olivo el peso fresco de la parte aérea fue significativamente inferior en plantas inoculadas que los controles (Tabla 3.4, Tabla 3.8). Esta reducción del incremento del peso fresco de la parte aérea en plantas infectadas por nematodos con respecto a los controles ya se había observado en otros patosistemas, que incluyen a frutales y plantas leñosas, *i.e.*: *P. vulnus-Prunus* spp. (Pinochet *et al.*, 1993a, 1996a; Hernández-Dorrego *et al.* 1999), *P. brachyurus/P. coffeae-cafeto* (Inomoto *et al.*, 1998), *M. arenaria*-morera blanca (Castillo *et al.*, 2001), *M. incognita*-kiwi (Di Vito *et al.*, 1988) y *M. incognita-Prunus* spp. (Huettel y Hammerschlag, 1993). Resultados similares observaron Lamberti y Baines (1969b) en olivo, que comprobaron que el peso fresco final total de plantas de 'Manzanillo' inoculadas con *P. vulnus* fue significativamente inferior al de los controles no inoculados. Asimismo, plantones de 'Ascolano' y 'Sevillano' inoculados con *M. javanica* también presentaron pesos finales de la parte aérea significativamente inferiores a los registrados en los controles (Lamberti y Baines, 1969a). De forma similar, la inoculación de 'Ascolano' y 'Manzanillo' con *M. incognita* determinó que las plantas mostraran un peso fresco final en la parte aérea inferior respecto a los controles no inoculados (Lamberti y Baines, 1969a).

Como se mencionó anteriormente, al disponer únicamente de valores de peso fresco no es posible especular acerca de si las diferencias significativas que se observaron en el peso final obedecían a un efecto del parasitismo de los nematodos sobre la acumulación de materia seca, a un efecto sobre el contenido hídrico de los tejidos o a una combinación

de ambos fenómenos. Sin embargo, en este sentido cabe mencionar que algunas pruebas de patogenicidad sobre frutales consideraron como parámetro el peso seco de la parte aérea y encontraron reducciones significativas provocadas por el parasitismo de nematodos, *i.e.* plantas de Citrange infectadas por *T. semipenetrans* (Inserra *et al.*, 1979b) y plantas de *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. infectadas por *M. javanica*, (Perrotta *et al.*, 1979). Asimismo, Sasanelli *et. al* (1997) evaluaron las dos alternativas, peso fresco y seco de la parte aérea, y encontraron diferencias significativas en el peso seco final de los controles respecto a *M. incognita* y/o *M. javanica* en siete de los ocho cultivares evaluados y, en todos los casos, las diferencias significativas en el peso seco se correspondían con las diferencias en el peso fresco. Solo en un caso, 'Frantoio', no se cumplió esta correspondencia, ya que *M. incognita* determinó un peso seco final de la parte aérea significativamente inferior al de los controles, mientras que ese resultado no pudo verificarse en el caso del peso fresco. Estos resultados sugieren que las diferencias de peso que se encuentran en el peso fresco responden a diferencias en la acumulación de materia seca, aunque no existen elementos para determinar si diferencias en el contenido hídrico, que cabrían esperarse de la alteración en las funciones de absorción de la raíz, contribuyen a explicar las diferencias en el peso fresco.

Algunos de los resultados obtenidos en nuestras pruebas de patogenicidad indican que la infección de las plantas por *Meloidogyne* spp. redujo en mayor medida el peso fresco de la parte aérea que la infección por *Pratylenchus* spp. No existen antecedentes experimentales que permitan contrastar este efecto patogénico diferencial entre nematodos noduladores y lesionadores de raíz ya que ninguna de las pruebas de patogenicidad efectuadas anteriormente sobre el olivo compara el daño provocado por cada uno de estos grupos tróficos sobre el peso de la planta, ni evalúa las diferencias entre la repuesta a *P. vulnus* y a *P. penetrans*. Nuestros resultados indican que el efecto patogénico de ambas especies de nematodos lesionadores sobre el peso fresco final es similar en ambas especies, aunque se observa un comportamiento diferencial entre las diferentes especies de nematodos noduladores, a favor de *M. arenaria* y *M. javanica* y en detrimento de la capacidad patogénica de *M. incognita*. Estos resultados sobre nematodos noduladores parecen estar en contradicción con los obtenidos por Sasanelli *et al.* (1997), que indican que *M. incognita* causa reducciones significativas de peso fresco final de la parte aérea en cuatro cultivares de olivo ('Cellina di Nardo', 'Cima di Bitonto', 'Coratina' y 'Leccino') que no se verifican con *M. javanica*. Asimismo, Lamberti y Baines (1969a) encuentran que *M. arenaria* presentó una menor capacidad patogénica que *M. incognita*, ya que aquella especie ni siquiera consiguió una infección exitosa. Las diferencias entre los resultados hallados en nuestros experimentos y los publicados en trabajos previos puede deberse al efecto

diferencial de las diversas interacciones huésped-patógeno: en ningún caso las pruebas de patogenicidad efectuadas con anterioridad, emplearon plantones de 'Picual' o 'Arbequina'.

### **3.4.3.3. Peso fresco de la raíz**

El peso de la raíz también puede verse afectado por el parasitismo de nematodos. Con frecuencia se asume que las infecciones por *Meloidogyne* spp. deberían provocar un incremento en el peso de la raíz con respecto a plantas no infectadas, debido a que provocan sobre la misma un síntoma hiperplásico. Sin embargo, si revisamos las pruebas de patogenicidad efectuadas sobre el olivo y otros frutales encontramos una tendencia bastante variable en este sentido. Se han observado reducciones significativas respecto a los controles en el peso de raíces infectadas por *Meloidogyne* spp. en melocotonero (Huettel y Hammerschlag, 1993), vid (*Vitis vinifera* L.) (Hafez y Sundararaj, 2000) y Citrange (Perrotta *et al.*, 1979). En olivo se ha observado que la infección por *Meloidogyne* spp. determina que el peso de la raíz aumente o disminuya, dependiendo de la especie del nematodo y el cultivar que se considere. Lamberti y Baines (1969a) encontraron que el peso de las raíces de plantas de 'Ascolano' inoculadas con *M. incognita* era significativamente mayor ( $P < 0,01$ ) que el de los controles. Sin embargo, Sasanelli *et al.* (1997) encontraron que la infección por *M. incognita* determinaba un peso fresco final de las raíces significativamente inferior a los controles en algunos cultivares o patrones ('DA 12 I', 'Leccino' y 'Yusti'), mientras que en otros ('Cellina di Nardò') provocaba el efecto contrario. Estos autores también comprobaron que *M. javanica* determinaba pesos frescos de la raíz significativamente superiores al del control en unos cultivares ('Cellina di Nardò', 'Coratina' y 'FS 17'), mientras que en otros los pesos frescos finales de las raíces eran significativamente inferiores al de los controles ('DA 12 I', 'Leccino' y 'Yusti') (Sasanelli *et al.*, 1997). En nuestros resultados se pudo comprobar que el peso fresco de raíz también mostró esta variabilidad en la respuesta de las plantas a la infección por nematodos noduladores. Todo esto sugiere que este parámetro no es un buen indicador del perjuicio ocasionado por el parasitismo de nematodos noduladores en plantones de olivo.

A diferencia de lo que ocurre con *Meloidogyne* spp., el parasitismo por *Pratylenchus* spp. y otros nematodos lesionadores sobre plantas leñosas da lugar a pesos finales de raíces iguales o inferiores al de los controles. Esta situación se ha confirmado en diversas combinaciones de frutales y nematodos lesionadores *i.e.* patrones de ciruelo, *Prunus* spp. y melocotonero inoculados con *P. vulnus* (Pinochet *et al.*, 1993a, 1996a; Hernández-Dorrego *et al.*, 1999; respectivamente), plantones de *Coffea arabica* inoculados con *P. brachyurus* y

*P. coffeae* (Inomoto *et al.*, 1998) y plántones de *Citrus* spp. inoculados con *R. similis* y *P. coffeae* (O'Bannon *et al.*, 1976). Sin embargo, en olivo este efecto del parasitismo de *Pratylenchus* spp. se había comprobado únicamente sobre el cv. Manzanillo (Lamberti y Baines, 1969), sin que pudiera verificarse ni en 'Ascolano' (Lamberti y Baines, 1969a) ni en 'Leccino' y 'Pendolino' (Lamberti *et al.*, 2001). En nuestro trabajo observamos que, ante inoculaciones con *P. vulnus*, sólo 'Picual' mostró una reducción significativa en el peso fresco final de las raíces con respecto al control.

#### **3.4.3.4. Diámetros del tronco y el brote principal**

En los experimentos de patogenicidad realizados el diámetro del brote principal, tanto a la altura de la rama principal o del tronco, fue un parámetro muy sensible al parasitismo por nematodos noduladores y lesionadores de raíz. El incremento relativo del diámetro del brote principal en los controles resultó significativamente superior al de las plantas inoculadas en los experimentos en los dos cultivares. Un resultado similar se verificó para el diámetro del tronco en los dos cultivares en la primera repetición y en 'Picual' en la segunda repetición.

Esta correlación tan estrecha entre la infección por nematodos y la reducción del crecimiento del diámetro del tronco no había podido ser inferida completamente a partir de los antecedentes experimentales. Por una parte existen antecedentes en *Prunus* spp. de reducciones en el diámetro del brote principal ante infecciones por *Meloidogyne* spp. (Huettel y Hammerschlag, 1993; Nyczepir *et al.*, 1997). En olivo, sin embargo, Sasanelli *et al.* (1997) observaron una reducción significativa en el incremento del diámetro del brote principal sólo en dos de los ocho cultivares infectados por *M. incognita* ('DA 12 I' y 'Yusti') y sólo en uno infectado por *M. javanica* ('DA 12 I'). Los datos sobre infecciones por *P. vulnus* en frutales indican que la reducción significativa de este parámetro se observa sólo en determinadas combinaciones planta-nematodo, *i.e.* patrones de ciruelo y melocotonero Hernández-Dorrego *et al.* (1999) no mostraron diferencias significativas respecto al control no inoculado, mientras que dos de los siete patrones de *Prunus* sp. evaluados por Pinochet *et al.* (1996a) vieron reducido el diámetro del brote como consecuencia de la infección por *P. vulnus*. Asimismo, Lamberti *et al.* (2001) comprobaron una reducción del diámetro del tronco en plántones de olivo del cultivar 'Pendolino' coinfectados por *P. vulnus* y *M. incognita*, y de la rama principal en 'Leccino' infectado por *M. incognita* y en 'Pendolino' infectado por *P. vulnus*, *M. incognita*, o ambos.

La reducción que el parasitismo por nematodos provoca sobre la expansión del

diámetro del tallo que se verifica en condiciones normales puede obedecer a dos mecanismos. Por una parte, puede especularse que, a consecuencia del mecanismo complejo que deprime la actividad metabólica normal, una planta infectada por nematodos presenta en los tejidos meristemáticos del tallo un menor crecimiento: una reducción en las tasas normales de división y expansión celular conduciría a que las dimensiones de los tejidos producidos en estas condiciones sean inferiores a las que tienen lugar en plantas no infectadas. Sin embargo, existe otro fenómeno que puede explicar porqué plantas infectadas por nematodos presentan un diámetro del tallo inferior. Existen variaciones en el contenido hídrico de la planta que conducen a una mayor o menor turgencia en las células en los tejidos y esto se traduce en fenómenos reversibles de expansión y contracción en el tallo. El tallo del olivo parece particularmente sensible a estas variaciones y, por este motivo, algunos autores han empleado el diámetro del tronco como un indicador indirecto del contenido hídrico de la planta (Michelakis y Barbopoulou, 1999; Moriana, 2001). Una alteración importante en la función radical de absorción del agua, como la que cabe esperar de una fuerte infección por nematodos, puede conducir a descensos en el potencial hídrico en los tejidos aéreos y expresarse a través de una reducción del diámetro del brote. Esta circunstancia nos conduce hacia algunas conclusiones en lo que refiere a nuestro trabajo. Una reducción en el diámetro del brote que obedeciera a descensos en el potencial hídrico debería manifestarse más expresamente en los tejidos menos lignificados, donde la elasticidad de las células permitiera una mayor expansión en condiciones de buena provisión de agua. La revisión de las pruebas de patogenicidad de nematodos sobre frutales confirman, en cierta medida, esta presunción: en experimentos que consideran simultáneamente las variaciones en el diámetro del tronco y en el de la rama principal éste último se muestra como más sensible al efecto del parasitismo, y resultados similares se han verificado en nuestro trabajo. Aunque en nuestros experimentos la medida más sensible al efecto de los tratamientos es el diámetro del brote, no podemos concluir que este parámetro se vea afectado por la infección de los nematodos a causa de una reducción en el potencial hídrico, de un descenso en el crecimiento de los tejidos caulinares o de una combinación de ambos fenómenos. En todo caso, cualquiera sea el proceso fisiológico normal que estuviese viéndose afectado, tendríamos que hablar de efecto patogénico o de "enfermedad".

#### **3.4.3.5. *Altura y número de nudos***

La longitud de la rama principal, ya sea considerada como valor absoluto o como incremento respecto a un valor inicial, ha sido un parámetro utilizado habitualmente para evaluar el efecto del parasitismo de nematodos sobre el crecimiento de plantones de frutales

de vivero. Los resultados obtenidos en varios frutales indican que longitud de la rama principal se ve reducida significativamente por el parasitismo de nematodos, *i.e.* Pinochet *et al.* (1996a) lo observan en patrones de *Prunus* spp. inoculados con *P. vulnus*; Inomoto *et al.* (1998) en plántones de *C. arabica* infectados por *P. coffeae* y *P. brachyurus*; Hafez y Sundararaj (2000) en plántones de vid infectados por *M. incognita*; Perrota *et al.* (1979) en plántones de 'Citrange' *Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. infectados por *M. javanica*; Inserra *et al.* (1979b) en plántones de cítricos infectados por *T. semipenetrans* y Govindaiah *et al.* (1991) en plántones de morera blanca infectados por *M. incognita*.

Asimismo, en olivo se han observado reducciones en la longitud del brote como consecuencia del parasitismo de nematodos. Lamberti *et al.* (2001), comprobaron reducciones significativas de este parámetro, con respecto a los controles en plantas de 'Leccino' y 'Pendolino' infectadas por *P. vulnus*, *M. incognita* o coinfectadas con ambos. Sin embargo, Sasanelli *et al.* (1997) encontraron reducciones en la longitud del brote con respecto al control en dos de los ocho cultivares de olivo evaluados ('Cellina di Nardò' y 'Frantoio') y sólo en las infecciones con *M. incognita*, nunca en plantas infectadas por *M. javanica*. Asimismo, los cultivares de olivo que vieron reducida la longitud del tallo por la infección de *M. incognita* también sufrieron una reducción significativa del número de nudos (junto con el cv. Yusti), y en las plantas infectadas por *M. javanica* no se redujo el número de nudos en ningún caso (Sasanelli *et al.*, 1997). En las condiciones de nuestro experimento, 'Picual' no vio reducida ni la longitud de las ramas ni el número de nudos en ninguna de las dos repeticiones por ninguno de los tratamientos con respecto al control. Sin embargo, 'Arbequina' mostró una reducción significativa del incremento relativo del número de nudos por la infección de *Meloidogyne* spp. en los dos experimentos y, en el segundo presentó una reducción significativa de la longitud de la rama principal en plantas infectadas por *Meloidogyne* spp.

La altura de las plantas constituye, probablemente, el parámetro de crecimiento que en viveros de olivo reviste la mayor importancia práctica. Generalmente, la altura de los plántones es la que determina el momento a partir del cual están en condiciones de ser transplantados. Normalmente, según los criterios que impone la Olivicultura Moderna, se asume que un plantón está en condiciones de ser transplantado cuando ha alcanzado 1 metro de altura. De esta forma se procura que todos los brotes laterales que hubieran podido desarrollarse por debajo de esa altura hayan sido eliminados en el vivero, abaratando de esa forma los costos de la poda de formación que impone el desarrollo de un tronco suficientemente largo sin ramificar (Caballero y Del Río, 1998; Del Río y Proubi, 1999). La altura es, por otra parte, el parámetro más aparente y más impactante a la vista y, de este

modo, se convierte en el más importante a la hora de realizar una caracterización subjetiva de la calidad de las plantas ofrecidas por un vivero.

#### **3.4.4. CONSIDERACIONES FINALES**

El perjuicio económico que provoca una determinada enfermedad sobre plantas de vivero puede ser considerado desde dos perspectivas: la del viverista y la del olivicultor que se provee de ese vivero.

Desde el punto de vista del viverista, el perjuicio consiste básicamente en ver reducida la calidad comercial de sus plantones o incluso tener que llegar al extremo de descartar una parte de su "stock". Los resultados obtenidos en nuestro trabajo aportan evidencias de que el parasitismo de los nematodos estudiados, en particular *Meloidogyne* spp., modifica de forma significativa el aspecto de los plantones y deriva en alteraciones claramente perceptibles que desmejoran el producto y pueden conducir a su rechazo. Este daño "cosmético" o "estético" pudo percibirse especialmente en el segundo experimento de patogenicidad en plantas de 'Picual' infectadas por *M. arenaria* y *M. javanica*. El efecto de la infección sobre la altura de los plantones que, en nuestras condiciones experimentales, fue significativo para las plantas de 'Arbequina' infectadas por *Meloidogyne* spp., constituye otra alteración con consecuencias económicas en el manejo del vivero. Asimismo, la reducción en la tasa de crecimiento causada por el parasitismo de un nematodo implica que las plantas consumen un periodo más prolongado para llegar a un tamaño determinado (Seinhorst, 1979). En nuestro caso, esto último significa una demora en llegar a la altura recomendada de venta (1 m). Esta prolongación del tiempo de mantenimiento en vivero acrecienta considerablemente los costos de producción (Del Río y Proubi, 1999).

Las consecuencias que a medio y largo plazo puede tener el parasitismo de los nematodos evaluados sobre la producción del olivar implantado son más difíciles de predecir: sólo sería posible asegurar la existencia de una asociación entre la infección por nematodos y una reducción en el rendimiento a través de la evaluación en experimentos en condiciones controladas de duración suficientemente prolongada como para evaluar el rendimiento a través de varias campañas. Básicamente pueden concebirse dos mecanismos a través de los cuales podría tener lugar esta reducción en el rendimiento del olivar. El primero sería la mortalidad inmediata a la plantación, fenómeno que se produce con relativa frecuencia en frutales. Si bien conceptualmente podría ocurrir en el vivero y ser, de esta forma, considerado como un perjuicio potencial para los viveristas, la muerte de plantas jóvenes ocurre fundamentalmente con posterioridad al trasplante. A menudo se asocia a una

etiología de carácter complejo donde pueden confluir varios factores, tanto de tipo parasitario como fisiogénico. El olivo, en particular, manifiesta esta patología. La misma se conoce en el ámbito del olivar andaluz con el nombre de “seca de olivos jóvenes” (Blanco-López *et al.*, 1999). Los autores que han compendiado en España las múltiples causas que concurren en esa patología no han mencionado hasta la fecha a los nematodos como una de ellas (Sánchez-Hernández *et al.*, 1998). Sin embargo, existen motivos para creer que podrían contribuir a la misma. Evaluaciones no sistemáticas efectuadas en nuevas plantaciones de olivar en Argentina asocian la mortalidad de plantas jóvenes al efecto del parasitismo por nematodos noduladores (Costilla, *com. pers.*, Ravetti, *com. pers.*). Por otra parte estos agentes constituyen en otras especies de frutales factores fundamentales en el complejo de mortalidad de plantas jóvenes. Así ocurre en melocotonero con *C. xenoplax* (Nyczepir *et al.*, 1983) y en manzano y cerezo con *P. penetrans* (Mai *et al.*, 1994).

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos de patogenicidad no permiten auspiciar que plantones de olivo de vivero pudieran morir a consecuencia del parasitismo de nematodos noduladores y lesionadores. Sin embargo, cabe remarcar que las condiciones controladas empleadas en los experimentos determinaban una situación muy favorable para el desarrollo de los plantones, donde las condiciones de provisión de agua y nutrientes no fueron limitantes y no existía posibilidad de coinfección con otro/s agente/s patógeno/s. Por tanto, cabe esperar que en ambientes no controlados y en el momento de la plantación, pudieran presentarse factores de estrés que, merced a un efecto aditivo o sinérgico, agravaran la patogenicidad de los nematodos incluso hasta el punto de provocar la muerte de las plantas.

De hecho, esto ocurre en otros patosistemas de frutales y nematodos donde la interacción sinérgica de estos agentes con otros factores patogénicos es responsable de la muerte post-plantación de frutales. Así se ha comprobado en la interacción entre *C. xenoplax*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y el daño por frío el sobre melocotón (Nyczepir, 1990); y en la que ocurre entre *P. penetrans* y *Thielaviopsis basicola* (Berk y Br.) Ferraris sobre cerezo (Harr *et al.*, 1976). Los nematodos noduladores y lesionadores que, según indican los resultados del presente trabajo, presentan un efecto patogénico sobre plantones de olivo, podrían contribuir a agravar el efecto de los agentes fisiogénicos (heladas, anegamiento temporal, déficit hídricos temporales) o parasitarios (infección por hongos de suelo y parasitismo por insectos) que provocan la muerte de olivos jóvenes en las nuevas plantaciones. En este sentido cabe mencionar que la posibilidad de interacción sinérgica entre nematodos patógenos y *V. dahliae*, uno de los agentes responsables de la “seca de los olivos jóvenes”, ha sido sugerida si bien no completamente demostrada

(Lamberti *et al.*, 2001).

Aun cuando el parasitismo no provocara la muerte de los plantones jóvenes, las reducciones en el vigor de los árboles podrían redundar en un menor rendimiento de los mismos. Los resultados de nuestras pruebas de patogenicidad permiten afirmar que, en algunas de las combinaciones huésped-parásito evaluadas, la infección por los nematodos causa una reducción en la acumulación de biomasa de los órganos vegetativos en la parte aérea. Relacionar esta reducción de biomasa con alteraciones posteriores en todos los procesos fisiológicos que determinan el rendimiento (floración, fecundación y fructificación) puede parecer, en primera instancia, lógico e inmediato. Sin embargo, en olivo no existen modelos que permitan afirmar de forma inequívoca esta correlación. Algunas evidencias experimentales recogidas en otras especies de frutales, como el manzano, permiten afirmar que existe una correlación entre el tamaño de las plantas de vivero y la producción de las mismas en su etapa adulta (Gadzhiev y Sadowski, 1999). En relación al efecto del parasitismo sobre el crecimiento de las raíces es lícito auspiciar que una menor biomasa radical determinará un descenso en la absorción de agua y nutrientes, y que esta alteración repercutirá negativamente en el rendimiento del árbol. Nuestro trabajo permitió comprobar que tales reducciones en el incremento de peso en las raíces se verifican con respecto a los controles en plantas de 'Picual' infectadas por *Pratylenchus* spp. y *Meloidogyne* spp. (ver 3.3.2.3 ).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo en referencia a la capacidad reproductiva de los nematodos noduladores y lesionadores incluidos en la prueba de patogenicidad muestran que todos ellos se multiplican sobre el olivo. Además de constituir una demostración de que existe compatibilidad huésped-parásito entre las especies empleadas de nematodos y los cultivares del olivo, este hecho tiene una implicación práctica muy importante: los nematodos que sean introducidos en el terreno de plantación conjuntamente con los plantones se reproducirán durante todo el tiempo que permanezcan las plantas, y la población de los mismos se incrementará de forma creciente, a no ser que se utilice alguna medida de control. Este fenómeno por el cual la densidad de inóculo de un patógeno crece indefinidamente en presencia de huésped perenne susceptible es particularmente acusado en frutales y origina los problemas de mortalidad o decaimiento o del vigor que ocurren al efectuar replantación en terrenos ocupados previamente por la misma especie (Bello, 1983; Greco, 1990; Nyczepir y Halbrendt, 1993). Determinados nematodos se reproducen abundantemente sobre los árboles adultos de una plantación de frutales de varios años sin provocar sobre los mismos un daño demasiado aparente. Cuando algún motivo agronómico obliga a la replantación, a menudo las poblaciones de esos

nematodos han alcanzado tal densidad que, por sí solas o conjuntamente con otros patógenos de suelo, llegan a provocar sobre los plántones jóvenes –más susceptibles- los daños severos que se identifican con el complejo de “*short life*” o “*replant problems*” (Nyczepir y Halbrecht, 1993). Este fenómeno ocurre en diferentes patosistemas nematodo-frutal y, en este sentido, podemos citar, entre otros a *C. xenoplax*-melocotón (Nyczepir *et al.*, 1983), *P. penetrans*-manzano (Mountain y Patrick, 1959), *P. vulnus*-manzano (Ricciardi *et al.*, 1975) y *T. semipenetrans*-*Citrus* spp. (Tsao *et al.*, 1989). La evidencia de que *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. se multiplican sobre el olivo alerta sobre la necesidad de extremar precauciones al efectuar replantaciones sobre olivares antiguos. Niveles altos de infestación, que pueden haber sido provocados por la reproducción sobre los árboles adultos pero pasar desapercibidos sobre los mismos, podrían resultar muy perjudiciales sobre las plantas jóvenes provenientes del vivero.

# Capítulo IV: Medidas para el control sostenible de nematodos fitopatógenos en viveros de olivo

---

## 4.1. INTRODUCCIÓN

Los resultados de las investigaciones que constituyen los capítulos precedentes del presente trabajo, demuestran que en la rizosfera y las raíces de plantones de olivo en viveros comerciales de Andalucía se encuentran numerosas especies de nematodos fitoparásitos. Estos resultados alertan sobre la capacidad del material de plantación de actuar como fuente de inóculo y de dispersión de estos agentes a nuevas áreas. Por otra parte, hemos demostrado que algunas especies de nematodos fitoparásitos se reproducen en plantones de olivo y causan en ellos procesos patogénicos que previsiblemente pudieran desembocar a medio o largo plazo en una reducción del crecimiento y/o vigor de los mismos y, por consiguiente, en una reducción de la producción en el olivar establecido. Ésto indica que dichos nematodos potencialmente propagables desde el vivero son, a su vez, potencialmente perjudiciales para el crecimiento y establecimiento de nuevas plantaciones de olivo y, por lo tanto, deben ser desarrolladas estrategias para reducir la incidencia de los mismos en los plantones.

La generación y el desarrollo de medidas eficientes de control de nematodos que puedan ponerse a disposición de los viveristas constituye un requisito previo indispensable para la implementación de los programas de certificación sanitaria en viveros, cuya oportunidad y conveniencia ha sido discutida previamente (ver 2.1.3 y 2.4.3). En el diseño y formulación de tales medidas debe considerarse que satisfagan ciertas condiciones en relación con su aplicabilidad técnica y económica; i.e., estas medidas deben utilizar insumos que estén fácilmente disponibles en el mercado local, y ser, en términos relativos, baratas y compatibles con las condiciones ambientales y los sistemas habituales de producción de la zona donde se desean aplicar. Estas medidas deben, además, atender a las necesidades de conservación ambiental y no representar riesgos para la salud de los operarios y consumidores y, en este sentido, responder a las exigencias del marco legal vigente en esas materias en el momento de su aplicación.

Los experimentos cuya realización y resultados se presentan y discuten en el presente capítulo fueron concebidos y diseñados con el propósito de respetar las pautas

antes mencionadas y sus objetivos particulares fueron los siguientes:

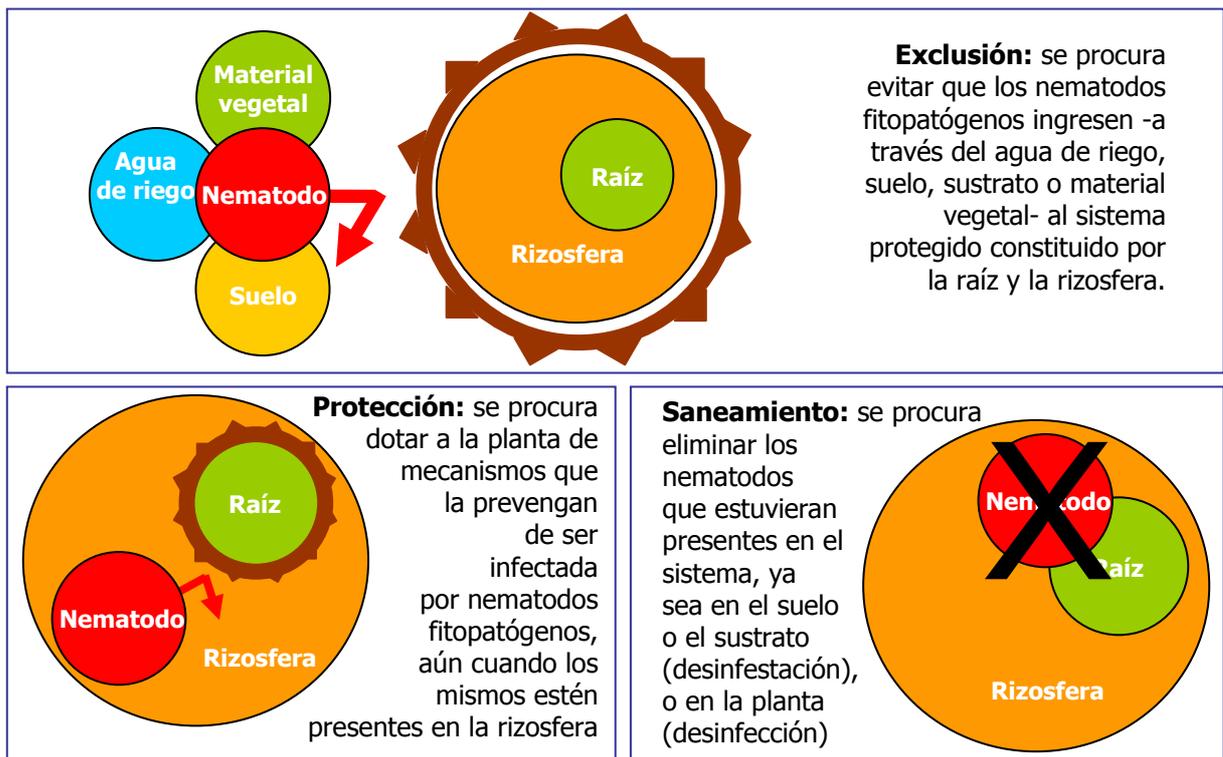
1. **Determinar la eficiencia de la solarización para desinfestar sustratos de uso viverístico.**
2. **Determinar la eficiencia de la biofumigación con restos vegetales para desinfestar sustratos uso viverístico.**
3. **Determinar el efecto de enmiendas orgánicas en el sustrato viverístico sobre la patogenicidad de nematodos noduladores y lesionadores en condiciones controladas.**
4. **Determinar el efecto de la micorrización en la protección de plantones de olivo contra la infección por nematodos noduladores y lesionadores de raíz.**

#### **4.1.1. CONCEPTOS GENERALES**

Conceptualmente, el control de nematodos fitopatógenos admite diferentes abordajes. Distintos autores coinciden en identificar que el objetivo último del control es el mantenimiento de la densidad de la población de nematodos por debajo de niveles de perjuicio fisiológico, mediante costes de actuación que resulten inferiores al beneficio alcanzable con su aplicación (Dropkin, 1989, Heald, 1987, Thomason y Caswell, 1987). Cada vez es más manifiesta entre los nematólogos una preocupación respecto de la distinción entre "control" y "manejo". El término "control" merece ser aplicado preferentemente al referirnos a acciones que pretenden causar una marcada reducción de la población del nematodo o del perjuicio a corto plazo de su parasitismo en la planta; mientras que "manejo" supone la aplicación armónica de un conjunto de prácticas que persiguen el mismo propósito anterior, pero con una programación a más largo plazo y buscando una mayor persistencia de sus efectos (Thomason y Caswell, 1987). Diferentes autores asumen, por otra parte, que el concepto de "manejo" presenta un carácter eminentemente preventivo, en contraste con "control" que supone una acción fundamentalmente dirigida a curar o remediar. La aplicación del término manejo supone, finalmente, el esfuerzo por integrar distintas prácticas en forma racional y para alcanzar tal propósito resulta fundamental abordar los diferentes elementos de la problemática desde la perspectiva de sistemas (Roberts, 1993).

En contraposición con la concepción integral o sistémica con que se concibe la idea

de "manejo", el concepto "control" conduce habitualmente a la compartimentalización. Así, la forma más habitual de presentar sus distintas alternativas es clasificarlas según la naturaleza de las herramientas básicas que se emplean. De esta forma los métodos de control son generalmente clasificados como químicos, físicos, culturales, biológicos y el empleo de cultivares resistentes (Thomason y Caswell, 1987; Dropkin, 1989; Hooper y Evans, 1993; Bello *et al.*, 1996). En el presente trabajo, si bien emplearemos preferentemente el término control por entender que estamos abordando una etapa inicial de la problemática y que los experimentos que se desarrollaron pretenden determinar la eficiencia de métodos particulares considerados en forma individual, procuraremos presentar las diferentes alternativas del control clasificadas desde un punto de vista sistémico. Así, considerando el suelo rizosférico y la planta como los escenarios a proteger, haremos distinción entre medidas de exclusión, protección y saneamiento, según sea la estrategia que se adopte. Los tres conceptos serán considerados desde la perspectiva de la fruticultura en sus dos etapas fundamentales -el vivero y la plantación definitiva- y en el sentido en que se los presenta en el esquema de la Fig. 4-1.



**Fig. 4.1.** Representación esquemática de las tres estrategias adoptables en el control de nematodos: exclusión, protección y saneamiento

Las diferentes etapas que transcurren desde la producción de los plantones de olivo en vivero hasta el establecimiento definitivo del olivar también pueden concebirse como integradas en un sistema dinámico. Cada uno de los elementos que son progresivamente

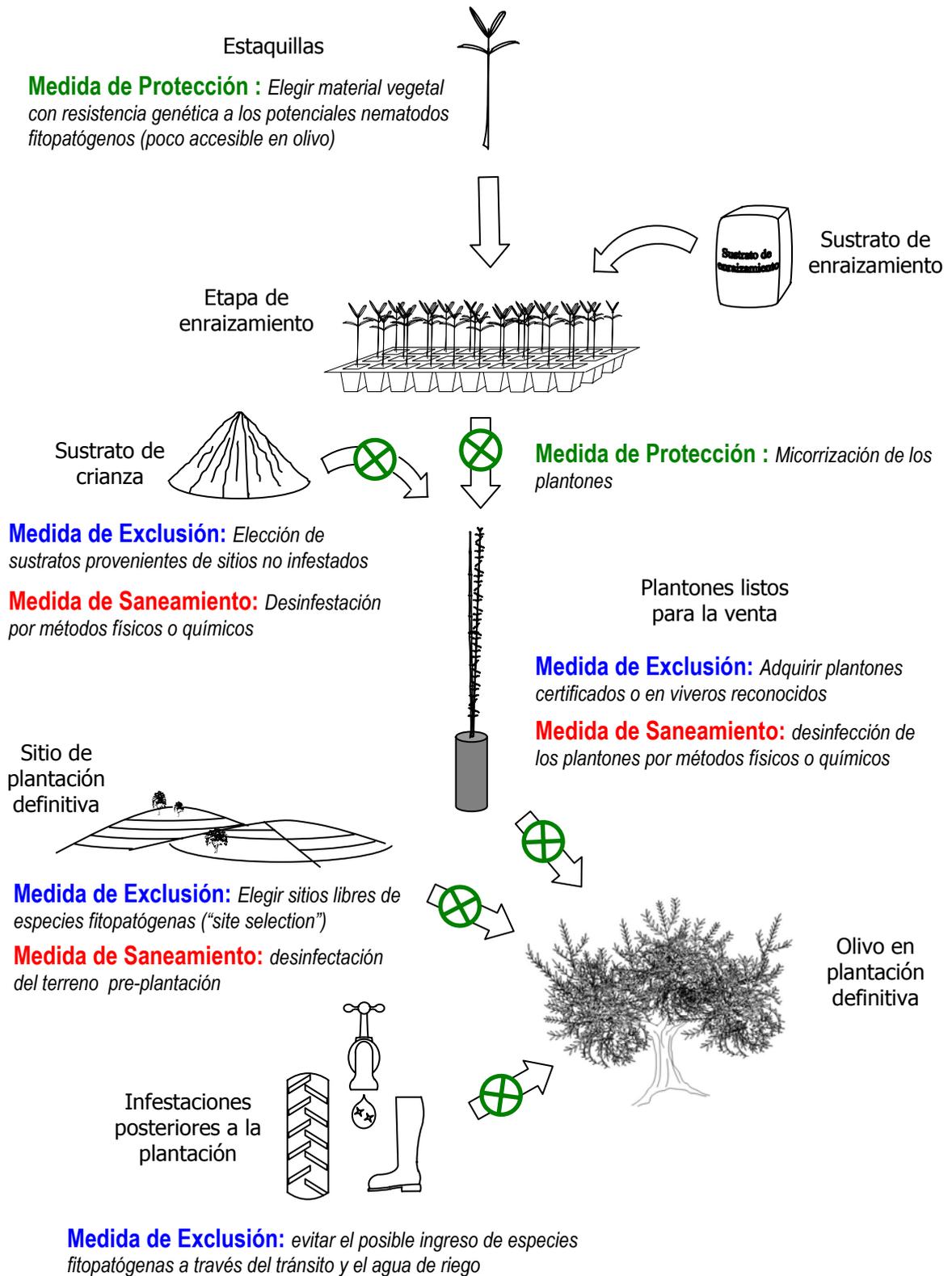
incorporados en el sistema puede ser vehículo de nematodos fitopatógenos, y las medidas de exclusión, protección y saneamiento deben estar dirigidas a mitigar el riesgo que se provoca en cada una de las formas de ingreso al sistema. La Fig. 4.2 resume las alternativas que se ofrecen para el control de los nematodos en cada una de las etapas del proceso de propagación y establecimiento del olivo y que se expondrán pormenorizadamente en la presente introducción.

#### **4.1.2. EXCLUSIÓN**

La exclusión incluye todas aquellas medidas tendentes a evitar el acceso del nematodo a un área o sistema protegido. Estas medidas se basan en garantizar que nematodos considerados de riesgo para el cultivo de interés no se encuentren en el material de propagación y en el terreno donde se efectúa la plantación definitiva, así como en evitar que tales nematodos accedan posteriormente al sitio del cultivo. Las medidas de exclusión adoptan diversas modalidades según la escala a que se las considere –de finca, regional, nacional o internacional- y constituyen en muchos cultivos una herramienta muy apropiada para mitigar el riesgo provocado por la acción de nematodos fitoparásitos (ver 2.1.2.1).

En el caso particular de frutales leñosos, las medidas de exclusión destinadas al control de los nematodos pueden ser concebidas en dos escenarios: el vivero y la plantación definitiva. Durante la etapa de vivero la vía de ingreso de nematodos fitoparásitos al sistema por excelencia es el sustrato viverístico empleado en la fase de crianza. Como se ha mencionado previamente, ni los órganos vegetativos empleados para la propagación ni el sustrato de enraizamiento son medios apropiados para el transporte de estos patógenos (ver 2.4.1.1). La aplicación de la exclusión a la etapa de vivero consiste básicamente, por tanto, en evitar el empleo de sustratos infestados por nematodos fitopatógenos. Este principio básico es el que se aplicó con éxito en el programa de recuperación de las plantaciones de cítricos afectadas por nematodos en Florida (Esser *et al.*, 1988). En viveros de frutales otro elemento que puede estar introduciendo al sistema nematodos fitopatógenos es el agua de riego (Esser, 1979), si bien en este caso el riesgo es inferior. Existen antecedentes sobre la dispersión de nematodos a través de agua de riego que nos ofrecen pautas para la elección de fuentes seguras.

Desde la perspectiva del fruticultor que efectúa la plantación existen varios elementos del sistema que deben ser tenidos en consideración. En primer lugar los principios de la exclusión deben ser aplicados a la elección del material de propagación.



**Fig. 4.2.** Esquema de las diferentes etapas que tienen lugar en la propagación y establecimiento del olivo donde se muestran las posibles vías de acceso de nematodos fitoparásitos al sistema y las alternativas que pueden adoptarse para el control de los mismos.



Como hemos mencionado en el Capítulo II, allí donde existen programas de certificación sanitaria en vivero y los mismos se aplican adecuadamente, la provisión de material certificado constituye una herramienta muy apropiada de exclusión. La misma puede reemplazarse, allí donde no existen programas oficiales confiables, por criterios subjetivos de calificación empresarial (ver 2.4.3). Por otra parte, hemos señalado que la manifestación de síntomas de infección severa sobre los órganos aéreos permite sospechar la presencia de plantas infectadas y descartarlas o rechazarlas en el momento de la compra (ver 3.4.3.1).

El fruticultor puede, con ciertas restricciones, aplicar los principios de la exclusión también a la elección de la parcela donde vaya a efectuarse la plantación definitiva. En aquellas ocasiones en que el sitio de plantación definitiva puede ser seleccionado entre diversas alternativas posibles, existen criterios de sanidad nematológica que pueden incorporarse a la toma de decisión. Este concepto es el que se conoce como "*site selection*" o "elección del sitio" (Nyczepir y Halbrendt, 1993). En este sentido, cabe mencionar que una prospección nematológica efectuada con adecuados criterios de muestreo y analizada en laboratorios de calidad reconocida ofrece una herramienta inestimable en la elección del sitio de plantación (Lorrain y Tarditi, 1992).

Por último, cabe considerar que la exclusión incluye prácticas que deben continuar siendo adoptadas durante todo el tiempo de establecimiento del olivar. En efecto aun cuando un olivar no se hallara infestado por nematodos fitopatógenos, cabe considerar que los mismos pudieran acceder al cultivo a través de diferentes vías. En este sentido la aplicación apropiada de los principios de la exclusión indica extremar los cuidados con el agua de riego y evitar el ingreso a la parcela de restos de suelo infestados adheridos a la maquinaria, el calzado, etc.

### **4.1.3. PROTECCIÓN**

Denominaremos en este capítulo con el nombre de protección a la estrategia consistente en proveer a la planta de mecanismos que mejoren su comportamiento ante el contacto con el nematodo. Considerando el ámbito de la fruticultura, cabe considerar que las medidas de protección pueden ser adoptadas únicamente por el viverista, si bien es el fruticultor quien tiene la opción de elegir en el vivero plantas con mejor comportamiento frente a potenciales infestaciones.

Dentro de las prácticas que caben incluirse bajo este concepto, la más habitual es el

empleo de cultivares resistentes obtenidas por mejora genética. Debido a que la adopción de esta práctica libera en muchos casos al productor de tener que efectuar medidas de control químico, se la considera, cuando está disponible, la forma más económica y eficiente así como la alternativa más aceptable ecológicamente (Pinochet, 1996). Esta medida de control se encuentra disponible desde hace varios años para muchos patosistemas de nematodos y árboles frutales. En este sentido, cabe mencionar, por ejemplo, la resistencia a *Meloidogyne* spp. en patrones de *Prunus* spp. (Brooks y Olomo, 1961; Ramming y Tanner, 1983, Roberts, 1992; Pinochet *et al.*, 1996b, 1999) y *Vitis* spp. (Firoozabady y Olomo, 1982) obtenidos por mejora genética. Aunque en olivo no existen cultivares mejorados *ex profeso* para resistir a ninguna de las especies más importantes de nematodos noduladores o lesionadores, existe constancia de que determinados genotipos presentan mejor comportamiento. 'Allegra', un pie de injerto clonal obtenido por la Universidad de California muestra gran resistencia a *Meloidogyne* spp. en condiciones experimentales (McKenry, 1994). Algunos cultivares italianos, como 'Coratina', presentan también excelente comportamiento frente a *Meloidogyne* spp. (Sasanelli *et al.*, 1997).

Dentro del concepto de protección también incluimos aquellas prácticas que, sin modificar la constitución genotípica de la planta, se efectúan con el propósito de dotarla de alguna característica histológica, citológica o bioquímica que le otorgue resistencia a un nematodo patógeno. Conceptualmente podemos incluir aquí los mecanismos de resistencia adquirida como los que actúan en patosistemas que incluyen hongos y bacterias. El conocimiento de este tipo de fenómeno como sistema de protección frente a nematodos es aún incipiente y no se ha reportado su existencia en árboles frutales.

Por último, se incluyen en la protección las asociaciones mutualistas que pueden proteger a la planta de la infección por nematodos fitopatógenos. Mencionamos, en este sentido, la micorrización, práctica habitual en los viveros de frutales. Este tema lo trataremos posteriormente en mayor detalle por ser una de las prácticas adoptadas en el presente trabajo.

#### **4.1.4. SANEAMIENTO**

Englobamos bajo el concepto genérico de saneamiento a todas aquellas prácticas dirigidas a eliminar al nematodo una vez que el mismo hubiera ingresado al sistema que queremos proteger. Esto implica, por un lado, las prácticas dirigidas a eliminar al nematodo de los sustratos de enraizamiento, crianza, suelo de plantación definitiva o agua de riego

(desinfestación) y, por otro lado, las técnicas empleadas para eliminar nematodos endoparásitos contenidos en el interior de los tejidos de las plantas (desinfección).

#### **4.1.4.1. Desinfestación**

Las prácticas de desinfestación incluyen medidas de control químico, físico, cultural y biológico. El **control químico** de nematodos se desarrolló inmediatamente después de la Segunda Guerra Mundial con el descubrimiento de la acción biológica de los hidrocarburos alifáticos halogenados (Hague y Gowen, 1987). A partir de ese momento, la generación de sustancias con acción nematicida o nematostática continuó ininterrumpidamente hasta la actualidad, en que básicamente podemos distinguir dos grandes grupos de estos compuestos que son los fumigantes –donde se incluyen haluros de alquilo y derivados del metil-isotiocianato- y los no fumigantes, donde se incluyen compuestos organofosforados y compuestos carbámicos (Bakker, 1992). Los compuestos fumigantes son considerados propiamente nematicidas, debido a que originan la muerte de los nematodos y sus huevos, mientras que los no fumigantes presentan acción fundamentalmente nematostática, ya que no matan directamente a los nematodos sino que afectan a su comportamiento (Wright, 1981).

La aplicación de nematicidas se encuentra ampliamente difundida en fruticultura como método de desinfestación. La investigación y el desarrollo comercial sobre nematicidas han estado dirigidos fundamentalmente a la etapa de plantación definitiva más que al vivero, debido probablemente a que la primera determina un mayor consumo de los productos. La desinfestación química de sustratos viverísticos se efectúa preferentemente recurriendo a productos fumigantes específicos o no específicos (McKenry, 1989b), si bien pueden emplearse algunos nematicidas no fumigantes (De Liñán, 2001). El tratamiento de desinfestación en el terreno definitivo presenta dos modalidades básicas, la aplicación previa a la plantación y la que se realiza con posterioridad a la misma. Nyczepir y Halbrendt (1993), al comparar ambas alternativas, resaltan que los tratamientos pre-plantación suelen ser más efectivos porque tienen carácter exclusivamente preventivo, garantizan la ausencia de daño durante el período crítico de plantación y pueden valerse de un mayor número alternativo de productos comerciales aprobados. Dado su mayor carácter fitotóxico, los nematicidas fumigantes específicos han sido recomendados especialmente para ser aplicados bajo esta modalidad (Lownsbery, 1959; Johnson, 1986; Nyczepir, 1991; Mai y Abawi, 1981; O'Bannon y Tarjan, 1973; Lownsbery *et al.* 1969). Los tratamientos post-plantación, en cambio, si bien en ocasiones pueden ser efectuados con fumigantes específicos (Tarjan y

O'Bannon, 1974; Inagaki, 1978; Zehr *et al.*, 1982), se realizan en general recurriendo a nematicidas no-fumigantes, con carácter curativo y un doble propósito de desinfestación y desinfección (Johnson *et al.*, 1987, Philis, 1988, Szczygiel y Rebandel, 1990).

La desinfestación de sustratos viverísticos o de suelos de plantación puede recurrir, en fruticultura, al **control físico**. Maas (1987) reconoce cuatro métodos básicos de desinfestación física: calor, métodos mecánicos, desecación e inundación. En la etapa de vivero, la desinfestación de los sustratos puede efectuarse mediante calentamiento artificial. Éste puede efectuarse *in situ*, recurriendo habitualmente a la inyección de vapor de agua (Runia, 1984) o *ex situ* en ámbitos confinados, como autoclaves (Christie, 1959) u hornos de microondas (Heald y Wayland, 1975). Estos métodos artificiales determinan un consumo energético de tal naturaleza que los hace impracticables en el terreno de plantación definitiva. En estos casos, la solarización, un método que emplea la radiación solar como fuente energética, permite la desinfestación térmica allí donde las condiciones ambientales son propicias. Este método también puede emplearse para desinfestar sustratos viverísticos, tal como persigue uno de los objetivos del presente capítulo y por ese motivo abordaremos más adelante y en particular los antecedentes referidos a esta práctica.

La desinfestación del suelo o de los sustratos viverísticos en fruticultura recurre, en ocasiones, a **métodos culturales**. Existen diversas formas de manejo del suelo que pueden reducir la población de nematodos fitopatógenos hasta niveles inferiores al umbral de perjuicio. El mantenimiento prolongado de barbechos libres de malas hierbas puede conducir al control por inanición de especies de corta supervivencia, pero las desventajas que esta práctica ofrece a la conservación del suelo pueden servir de contraindicación (Whitehead, 1997). El mismo efecto puede lograrse manteniendo el terreno que va a ser destinado a la provisión de sustrato viverístico o a la plantación de frutales, cultivado exclusivamente con especies sobre las cuales el nematodo no se reproduce durante un periodo prolongado. De esta forma, se pueden lograr reducciones en los niveles de infestación que permiten el empleo seguro del suelo y evitan, al mismo tiempo, los inconvenientes de mantener el terreno desnudo. Esta práctica requiere la identificación precisa y específica de los nematodos presentes y un perfecto conocimiento de su gama de huéspedes (Thomason y Caswell, 1987). En melocotonero, Bertrand y Nyczepir (1989) recomiendan la siembra de pasto bermuda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) en preplantación para recuperar suelos infestados con *Meloidogyne* spp., mientras que Nyczepir y Halbrendt (1993) resaltan la conveniencia de sembrar trigo durante algunos años antes de efectuar la plantación en terrenos con altas poblaciones de *C. xenoplax*. Del mismo modo, este

principio se aplica al manejo de infestaciones en post-plantación a través de las cubiertas vegetales. No obstante estas cubiertas pueden incrementar las poblaciones de nematodos fitopatógenos cuando son manejadas sin un criterio florístico racional. En aquellos casos en que la elección de las especies se efectúa considerando aspectos vinculados a la sanidad nematológica, no sólo se obtienen beneficios sobre la conservación del suelo sino que pueden lograrse importantes reducciones en la población de nematodos fitopatógenos (Bertrand *et al.*, 1988; Zehr *et al.*, 1990b; Merwin y Stiles, 1989). Esta capacidad desinfestante de ciertas cubiertas vegetales puede residir exclusivamente en una restricción a la reproducción por incompatibilidad huésped-parásito, pero la eficiencia de la técnica aumenta cuando, como mecanismo adicional de control, participa la liberación a la rizosfera de exudados radicales con efecto alelopático (Hackney y Dickerson, 1974; Tudor y McKenry, 1989; Huang *et al.*, 1981; Tanda y Atwal, 1988; Oduor Owino, 1993 y veáse también 4.1.5.3).

Por último, mencionaremos las posibilidades del empleo de **agentes biológicos** como método para la desinfestación de nematodos en fruticultura. Los nematodos presentan un importante número de enemigos naturales que pueden reducir sus poblaciones. Entre los parásitos encontramos rickettsias, bacterias y hongos; mientras que otros nematodos, hongos formadores de apresorios, ácaros, tardígrados y colémbolos actúan como depredadores (Dropkin, 1989). Estos agentes confieren la supresividad que presentan espontáneamente ciertos suelos y que constituye el fenómeno que se conoce como "control biológico natural" (Stirling, 1991). En otros casos, ciertos organismos han sido multiplicados artificialmente y liberados posteriormente en agroecosistemas fuertemente infestados con nematodos, buscando ya sea su establecimiento y con ello un control definitivo o de larga duración ("control biológico por introducción" o "liberación en masa") o bien un control a corto plazo que se renueve con la reintroducción periódica del agente ("control biológico por inundación") (Kerry, 1987). Diversos sistemas de control biológico natural han mostrado marcada eficiencia sobre nematodos en melocotonero (Stirling y Mankau, 1977; Stirling *et al.*, 1979; Kluepfel *et al.*, 1993), vid (Bird y Brisbane, 1988) y cítricos (Mankau, 1982). Del mismo modo, cabe mencionar esfuerzos por desarrollar alternativas eficientes de control biológico en frutales a través de estrategias de inundación. Así podemos mencionar a Tarjan (1961) que ensayó la liberación de *Arthrobotrys musiformis* Drechsler para el control de *R. citrophilus* en cítricos. También se han ensayado varios organismos como potenciales agentes de control biológico inundativo de *C. xenoplax* en melocotonero incluyendo al hongo *Hirsutella rhossiliensis* Minter y Brady (Zehr, 1985; Eayre *et al.*, 1987) y a la bacteria *Pseudomonas aureofaciens* Kluiver (Trevisan) (McInnis *et al.*, 1990).

#### 4.1.4.2. *Desinfección*

Las alternativas posibles para la desinfección de plantas en fruticultura se restringen, en términos prácticos, a medidas de control químico y físico.

El **control químico** con nematicidas no fumigantes aplicados a la planta es una medida con carácter mixto de protección y saneamiento. Todos estos productos presentan, en mayor o menor medida acción sistémica y prolongada persistencia de residuos. Su aplicación en forma anticipada a la infección tiene carácter preventivo y, como tal, puede ser considerada una medida de protección, mientras que si se aplican tras la penetración de la planta por los nematodos actúan como desinfectantes.

Existen varios procedimientos que permiten aplicar los nematicidas no fumigantes. La inmersión de las raíces desnudas en una solución de nematicida sistémico se emplea a menudo cuando se quiere desinfectar plantas que dejan el vivero con destino a la plantación definitiva. Este tratamiento se aplicó en plántones de *Citrus* spp., infectados con *R. citrophilus* (O'Bannon y Taylor, 1967; O'Bannon y Tomerlin, 1977). La desinfección previa a la plantación puede realizarse también aplicando el nematicida sobre el sustrato de la maceta, cumpliendo así con un doble propósito de desinfestación y desinfección. Lamberti y Di Vito (1972) aplicaron con éxito esta técnica sobre plántones de olivo infectados por *M. incognita* y *M. javanica* sin efectos fitotóxicos. La tercera alternativa para la desinfección de plántones es la aplicación del nematicida al follaje, práctica de eficacia comprobada en manzano, melocotonero y peral (Abawi y Mai, 1975, 1978; Allen y Marks, 1977). Vovlas *et al.* (1975) compararon las tres técnicas descritas para la aplicación de nematicidas como medida de desinfección de plántones, y concluyeron que la eficacia de los tratamientos no dependió tanto de la forma de aplicación como de la especie diana: el control resultó satisfactorio para naranjo amargo *Citrus aurantium* L. infectado por *T. semipenetrans* y vid infectada por *Xiphinema* spp., pero fracasó sobre olivo infectado por *M. incognita*.

Como mencionamos al referirnos a la desinfestación, los nematicidas no fumigantes pueden ser aplicados al suelo en plantaciones establecidas. Cuando las raíces se ponen en contacto con el suelo tratado tiene lugar la penetración del producto y de esta forma puede verificarse también un efecto desinfectante sobre plantas que ya presentaban nematodos endo o semiendoparásitos en su interior. Sin embargo, la desinfección de árboles adultos puede obtenerse en ciertos casos aplicando el producto exclusivamente a la parte aérea de la planta. Esta modalidad, que requiere nematicidas de probada traslocación basípeta como el fenamifós y el oxamyl, reduce significativamente los riesgos de contaminación ambiental (Tarjan, 1976). Ha sido aplicada exitosamente en cítricos donde las inyecciones al tronco

resultaron efectivas sobre *T. semipenetrans* (Monke *et al.*, 1992) mientras que las aplicaciones al follaje controlaron a *R. similis* (O'Bannon y Tomerlin, 1977; O'Bannon y Tarjan, 1979).

Para la desinfección de los plantones producidos en vivero puede recurrirse también al **control físico**. La aplicación moderada de calor durante periodos suficientemente prolongados se emplea en la desinfección de tejidos vegetales, en una técnica conocida como "termoterapia". Esta técnica se basa en la sensibilidad diferencial de la planta y sus parásitos internos o externos a las altas temperaturas (Jarvis, 1998). Independientemente de la forma que se emplee para proveer el calor, el principio básico es alcanzar una temperatura que esté por encima del umbral térmico letal de los nematodos pero por debajo del de la planta (Woodville, 1972). El método está difundido ampliamente como medida de erradicación de diversos patógenos -bacterias, virus, hongos, nematodos y micoplasmas- de semillas y otros materiales de propagación. En frutales, este método es el más comúnmente empleado para la producción de plantones libres de virus (Welsh, 1976, Nemeth, 1986) y también se ha mostrado efectivo para la erradicación de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn en plantones de vid (Burr *et al.*, 1989). La eficiencia de la termoterapia sobre plantones de frutales infectados por nematodos fue comprobada fundamentalmente en cítricos (Birchfield, 1954; Kaplan, 1982; Esser *et al.*, 1988) y en vid (Vega, 1973; Barbecheck, 1986; Nandini y Mathur, 1995). Teva (2000) estudió la termoterapia como método de desinfección de *P. vulnus* en olivo y comprobó que exposiciones a temperaturas iguales o superiores a 45 °C durante 8 min o más permiten un control eficiente del nematodo.

#### **4.1.5. PRÁCTICAS SOSTENIBLES EVALUADAS PARA EL CONTROL DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS**

##### **4.1.5.1. Solarización**

Se conoce con el nombre de solarización al método por el cual se controlan patógenos de suelo y malas hierbas mediante el calentamiento logrado a expensas de la luz solar. La técnica surgió a fines de la década de los '70 en Israel como una derivación imprevista del empleo de los plásticos en la agricultura y desde ese momento se ha constituido en un alternativa relativamente simple, efectiva y económica para la desinfección de suelos la en zonas cálidas y áridas (Katan y De Vay, 1991). Este método consiste, básicamente, en aplicar una película de plástico transparente y delgada sobre un suelo húmedo, mullido y nivelado bajo condiciones de alta insolación (Katan, 1980). La

película plástica, que se comporta como transparente a la luz y opaca a la radiación infrarroja, provoca sobre el suelo solarizado un efecto de invernadero. El calor que se produce a expensas de la radiación visible, que en condiciones de suelo desnudo se perdería por convección y radiación, queda retenido y de esta forma la temperatura se eleva hasta 10 °C por encima de la que registra en condiciones similares un suelo sin solarizar. Las recomendaciones que vienen implícitas en la descripción de la técnica resultan de cumplimiento indispensable para el éxito de la misma. La transparencia del plástico es requerida a fin de lograr la máxima transmitancia de la radiación solar. El mantenimiento del suelo húmedo asegura una mayor captación de la radiación a causa del oscurecimiento, la liberación del calor latente de evaporación y una adecuada conductividad que mejora la transmisión del calor en profundidad (Katan, 1981). La humedad incrementa, por otra parte, la sensibilidad térmica de las formas de resistencia de los patógenos. La óptima preparación del suelo se exige a fin de evitar roturas en el plástico y de reducir al mínimo el espacio de aire retenido entre el suelo y la película de polietileno. La eficiencia de la solarización está supeditada también a las condiciones meteorológicas del sitio. Debido al interés por conocer las posibilidades de la solarización, diversos autores (Mahrer, 1979; Mahrer y Katan, 1981; Cenis, 1989; Wu *et al.* 1996) han elaborado modelos de predicción destinados a valorar la posible eficacia de la solarización en cada zona, a diversas profundidades del suelo y en cada época del año.

La solarización es un método apropiado para la erradicación de hongos de suelo (Pullman *et al.*, 1981; Ben-Yepphet, 1988, Ben-Yepphet, *et al.*, 1988; Arora y Pandey, 1989; Hartz *et al.*, 1989), malas hierbas (Horowitz *et al.*, 1983; Duranti y Cuocolo, 1988; Silveira *et al.*, 1990; Sauerborn *et al.*, 1989), artrópodos (Gerson *et al.*, 1981) y nematodos (Di Vito *et al.*, 1991; Chellemi *et al.*, 1997; Whitehead, 1998). El efecto que se verifica sobre los propágulos de patógenos y malas hierbas se debe, por una parte, a que se alcanzan temperaturas que superan el umbral térmico letal de estas estructuras durante un periodo de tiempo suficiente. Sin embargo, en ciertos casos, se consigue un efecto sub-letal por el cual los microorganismos supervivientes pueden quedar debilitados, poseer menor potencial de inóculo y menor longevidad (Katan, 1981). Por otra parte, tiene lugar la selección de una microflora termófila con cierta capacidad de antagonismo que explica fenómenos de control biológico asociados a la solarización (Stapleton y DeVay, 1984): la solarización no presenta el inconveniente de crear un "vacío biológico", contraindicación habitual de otras prácticas de desinfección más drásticas (Bollen, 1974; Marois *et al.*, 1983).

El efecto beneficioso que presenta la solarización del suelo en apariencia no responde exclusivamente al control de organismos perjudiciales. Además, se observa una

promoción del crecimiento sobre plantas que se cultivan en suelo solarizado aun en ausencia de patógenos importantes (Chen y Katan, 1980; Stapleton *et al.*, 1985). Se han formulado varias explicaciones parciales acerca de la naturaleza y el origen de este fenómeno. Algunos autores atribuyen este efecto a la promoción de microorganismos que estimulan el crecimiento (Nair *et al.*, 1990; Tjamos y Paplomatas, 1988; Kaewruang *et al.*, 1989). Otros, en cambio, subrayan la importancia de modificaciones químicas que repercuten sobre la fertilidad, como son el contenido de materia orgánica soluble (Chen y Katan, 1980; Kaewruang *et al.*, 1989) y la concentración de iones nutrientes (Chen y Katan, 1980; Cartia, 1989; Kaewruang *et al.*, 1989). La solarización, por otra parte, es una práctica que se caracteriza por su capacidad de integrarse apropiadamente con otros métodos de desinfestación. De esta forma pueden alcanzarse niveles de control que resultan insuficientes al aplicar ciertas prácticas en forma individual o bien reducir los riesgos o inconvenientes de otros métodos más agresivos (Ben Yephet *et al.*, 1988; López Cosme y González Torres, 2000; Greco *et al.*, 1992; Eddaoudi y Amati, 1994; Gaur y Dhingra, 1991).

La solarización ha sido aplicada con éxito en fruticultura para el control de hongos de suelo, tanto en la etapa de vivero (Stapleton y De Vay, 1982) como en el terreno de plantación definitiva (Ashwort *et al.*, 1983; Freeman *et al.* 1990; Gallo-Llobet *et al.*, 1996; López-Herrera *et al.*, 1996). En olivo, en particular, la solarización ha mostrado ser una práctica que contribuye significativamente a disminuir la incidencia de la marchitez causada por *V. dahliae* (Tjamos, 1983; López-Escudero y Blanco-López, 2001). Sin embargo, a pesar del éxito con que se aplica la solarización sobre nematodos en cultivos herbáceos, este método no ha sido ensayado suficientemente como estrategia de desinfestación de nematodos en frutales. El efecto beneficioso que las coberturas de plástico negro provocan sobre el crecimiento de árboles frutales, atribuido a una conservación del agua y a una reducción de la población de ciertos nematodos patógenos, constituyen un estímulo para estudiar el efecto de la solarización en plantaciones establecidas (Duncan *et al.*, 1992). La misma consideración resulta válida para las labores del vivero, ya que varios trabajos han comprobado la viabilidad de la solarización como método de desinfestación de pequeños volúmenes de sustrato (Giblin-Davis y Verkade, 1988, Kaewruang *et al.*, 1989, Duff y Barnaart, 1992). Recientemente Stapleton *et al.* (1999) demostraron que la solarización puede ser empleada en lugar de la fumigación para el control de nematodos en viveros de olivo situados en regiones de clima mediterráneo. Todas estas circunstancias alientan a continuar la investigación referida al tema.

#### **4.1.5.2. Micorrización**

Las micorrizas son simbiosis mutualísticas que se establecen entre plantas terrestres y determinados hongos simbioses obligados que colonizan las raíces y proyectan un extenso entramado de hifas a través del suelo rizosférico. De esta forma se incrementa el área de absorción del sistema radical y con ello la captación de agua y la movilización de nutrientes, particularmente el P. Aunque se pueden distinguir diferentes tipos de micorrizas según la naturaleza de la estructura fúngica que se forma, a los fines del presente trabajo nos referiremos exclusivamente a las endomicorrizas y, dentro de ellas, a las micorrizas arbusculares (MA), el grupo más ampliamente distribuido en la naturaleza y de mayor importancia ecológica y económica. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares pertenecen a seis géneros del Orden Glomales, Subdivisión Zygomycotina que pueden asociarse inespecíficamente a más del 80 % de las especies vegetales que han sido estudiadas.

La micorrización aumenta la resistencia de la planta a diversos estreses incluyendo los de naturaleza abiótica como sequía (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991), salinidad (Rinaldelli y Mancuso, 1998) y toxicidad iónica (Diaz *et al.*, 1996) y biótica (enfermedades). En particular, se ha demostrado que la micorrización altera el comportamiento de muchas plantas frente a los nematodos fitoparásitos y determina una reducción del efecto patogénico de los mismos (Hussey y Roncadori, 1982; Hussey y McGuire, 1987; Smith, 1987; Stirling, 1991; Francl, 1993; Calvet *et al.*, 2001). Los mecanismos involucrados en esta alteración de la respuesta de la planta difieren según el patosistema que se considere y a menudo más de uno coincide para explicar el fenómeno. Por una parte se asume que las micorrizas proporcionan un mecanismo compensador del daño causado por el nematodo, como consecuencia de la mejora de la capacidad funcional de la raíz (Smith *et al.*, 1986). Este tipo de respuesta puede ocurrir sin que se vea afectado el nivel de infestación ni la reproducción del nematodo y constituye, por lo tanto, un mecanismo de tolerancia. En otros casos, los mecanismos que alteran la respuesta de las plantas micorrizadas a los nematodos se asemejan a los de resistencia, ya que no solo reducen el daño sino también la reproducción del nematodo. Asimismo, se especula sobre la existencia de mecanismos de interacción previos a la infección: las micorrizas alteran la naturaleza de los exudados radicales (Graham *et al.*, 1981; Gerdemann, 1968; Hayman, 1982) y ello, presumiblemente, afecta a la respuesta de aquellos nematodos que responden a este estímulo para la eclosión de los huevos o el reconocimiento de los sitios de infección (Hussey y McGuire, 1987; Smith, 1987; Ryan *et al.*, 2000). Entre los mecanismos de interacción posteriores a la infección que explicarían la inhibición de los nematodos podemos mencionar la competencia por espacio y

por fotosintatos (Hussey y Roncadori, 1982) y la generación de sustancias nematostáticas (Smith, 1987). Asimismo, algunos hongos micorrícicos se comportan en ciertas circunstancias como parásitos débiles de los huevos de algunos nematodos (Francl y Dropkin, 1985; Tribe, 1977) y este fenómeno podría estar contribuyendo en cierta medida a explicar el mecanismo de inhibición.

La inoculación artificial de los sustratos de cultivo de plantas con aislados seleccionados de hongos micorrícicos es una práctica habitual en muchos viveros de frutales tropicales y de clima templado, en reconocimiento al conocido efecto promotor de esta simbiosis sobre el crecimiento de los plantones (Azcón-Aguilar y Barea, 1997). Estos autores destacan que, además de otorgar propiedades antiestrés, las micorrización estimula el enraizamiento y el crecimiento, mejora la emisión de raíces por parte de los esquejes y la supervivencia y desarrollo durante la etapa de endurecimiento, reduce los requerimientos de P externo, y confiere precocidad, mayor fructificación y mayor uniformidad de las plantas. El efecto protector de las micorrizas frente a nematodos pudo comprobarse en especies frutales como *Prunus* spp. (Camprubí *et al.* 1993; Pinochet *et al.*, 1998; Calvet *et al.*, 2001), manzano (Pinochet *et al.*, 1993b), membrillero (*Cydonia oblonga* Mill.) (Calvet *et al.*, 1995) y limonero (*Citrus limon* (L.) Burm.) (O'Bannon y Nemec, 1979; Smith y Kaplan, 1988). Si bien las micorrizas aun se emplean escasamente en viveros de olivo en comparación con otras especies frutales, la importante renovación tecnológica surgida en el sector a partir de las demandas de la Nueva Olivicultura ha propiciado una adopción cada vez más importante de la práctica y un interés creciente por conocer sus posibilidades. En este sentido merece ser explorada en olivo la potencialidad de las micorrizas como elemento protector frente a nematodos patógenos.

#### **4.1.5.3. Aplicación de enmiendas orgánicas**

Las enmiendas orgánicas constituyen una alternativa al uso de productos químicos para la desinfestación de suelos y sustratos agrícolas. A los fines de este trabajo, denominaremos enmienda orgánica a todo aquel material residual de constitución fundamentalmente orgánica, más o menos elaborado con posterioridad a su generación como subproducto de alguna actividad humana que se aporta al suelo en gran cantidad. Este tipo de materiales se ha empleado tradicionalmente en la agricultura con el propósito de mejorar las características físicas y químicas del suelo e incrementar su fertilidad. Sin embargo, una serie de evidencias empíricas recogidas a menudo de manera accidental permitió conocer las potencialidades que presentaba su uso para la protección de cultivos.

Cabe mencionar, en este sentido, la experiencia de muchos sistemas agrícolas tradicionales acerca de la capacidad supresiva que proporcionan muchos abonos orgánicos sobre enfermedades provocadas por hongos de suelo (Kelman y Cook, 1979; Thurston, 1990). A partir de la tercera década del siglo XX, la posibilidad de controlar patógenos de suelo mediante enmiendas orgánicas comenzó a ser investigada en los ámbitos científicos (Sanford, 1926). En la actualidad se cuenta con aplicaciones de la técnica puestas a punto para la desinfección de hongos de suelo (Hoitink y Fahy, 1986; Lazarovits *et al.*, 1997), nematodos (Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987) y malas hierbas (Roe *et al.* 1993), así como para el control de enfermedades en órganos aéreos mediante “caldos” o “extractos acuosos” obtenidos a partir de estas enmiendas (Weltzien, 1992).

El control de nematodos mediante enmiendas orgánicas ha sido estudiado recurriendo a una gama muy diversa de productos que incluyen tortas de aceite (Goswami y Swarup, 1971; Goswami y Meshram, 1991; Krishna Rao *et al.*, 1987), otros residuos agroindustriales (Sosa Moss y Weihs, 1973; Ferraz y Silva, 1978; Muller y Gooch, 1982), restos de cosecha y abonos verdes (Reddy *et al.*, 1986) y estiércoles o materiales residuales de origen animal (Kaplan y Noe, 1993; González y Canto-Saénz, 1993; D’Addabbo, 1995). Los mecanismos a los cuales se atribuye la acción de control son muy diversos y difieren según el material que se considere. Por una parte, cabe considerar la existencia de mecanismos de protección, ya que la incorporación al suelo de enmiendas orgánicas proporciona a la planta condiciones que contrarrestan el riesgo potencial de una infección por nematodos. Existe, en efecto, consenso en que el mejoramiento de las condiciones físico químicas del suelo y sus consecuencias inmediatas en el estado nutritivo de la planta permiten que ésta tolere mejor el daño potencial que pueden causar los nematodos (Stirling, 1991). Por otra parte, la protección de las plantas puede deberse en ciertos casos a la inducción de resistencia por parte de sustancias fenólicas liberadas tras la adición de las enmiendas (Sitaramaiah y Singh, 1974; Singh *et al.*, 1983). Sin embargo, la hipótesis más habitual acerca de los mecanismos de control identifican a la práctica más propiamente como una medida de saneamiento, ya que los procesos implicados originan la mortalidad o la inhibición de los nematodos más que modificaciones en la respuesta por parte de la planta. Así, existen por una parte evidencias sobre la responsabilidad de sustancias con efecto nematológico o nematostático en el fenómeno. Estas sustancias pueden estar preformadas en las enmiendas, que es lo que ocurre en los fenómenos de supresión atribuibles a productos del metabolismo secundario de las plantas con efecto aleloquímico (Halbrendt, 1996). En este concepto se incluyen las propiedades que presentan los restos de ciertas especies vegetales reconocidas por su capacidad para el

control de nematodos como *Azadirachta indica* Juss. (Devakumar *et al.*, 1985), *Tagetes* spp. (Uhlenbroek y Bijloo, 1959) y *Ricinus communis* L. (Rich *et al.*, 1989). En otros casos, ciertas sustancias que se liberan con posterioridad a la adición de la enmienda como mebolitos derivados de su descomposición microbiana resultan tóxicas para los nematodos, tal el caso del amonio, sulfuro de hidrógeno, ácidos orgánicos y una amplia gama de compuestos orgánicos volátiles (Badra *et al.*, 1979; Sayre *et al.*, 1965; Elmiligy y Norton, 1973; Sitaramaiah y Singh, 1977). En otras ocasiones el efecto de las enmiendas parece responder fundamentalmente a la promoción de agentes de control biológico como hongos depredadores (Quinn, 1987), hongos parásitos (Jaffee *et al.*, 1994; Van der Boogert *et al.*, 1994) o tardígrados (Kauri-Pääsuke, 1973). Mención especial merece el mecanismo por el cual la adición de ciertas enmiendas promueve la actividad de enzimas que afectan a la viabilidad de los nematodos. Esto ocurre con la quitina (Rodríguez-Kábana *et al.*, 1989), que es el constituyente principal de la cubierta de los huevos, o el colágeno (Galper *et al.*, 1990), constituyente de la cutícula.

La aplicación de enmiendas orgánicas para desinfestación de suelos y sustratos en fruticultura no es práctica habitual. El ejemplo más aproximado a este enfoque es la siembra de cubiertas vegetales para el control de nematodos en frutales implantados (ver 4.1.4.1). Probablemente, esta situación obedece a que las enmiendas orgánicas constituyen una estrategia de control concebida principalmente para ser aplicada en cultivos de subsistencia en países en vía de desarrollo (Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987). Sin embargo, a consecuencia de las crecientes restricciones al empleo de materias activas de probada eficiencia (Ristaino y Thomas, 1997; Thomason, 1987), surge una inquietud por encontrar alternativas válidas al control químico que anima a explorar la aplicabilidad de estos métodos en cultivos frutales. Ventajas adicionales como la disposición de residuos con alta potencialidad contaminante constituyen un aliciente suplementario. En este sentido, cabe destacar que la olivicultura y la industria a ella vinculada generan gran cantidad de materiales residuales cuyo utilidad en el control de patógenos de suelo ya ha sido explorada en múltiples trabajos (Pera y Calvet, 1989; Vouyoukalou, 1994; Rodríguez-Kábana *et al.*, 1995; D'Addabo y Sassanelli, 1996, 1997; D'Addabo *et al.*, 1997; Vouyoukalou y Stefanoudaki, 1998). Esta circunstancia satisface la condición impuesta por Stirling (1991), que señala que los materiales residuales a ser empleados como enmiendas orgánicas para el control de nematodos deben ser generados en un sitio próximo al lugar de aplicación, habida cuenta de que los portes constituyen un determinante fundamental de los costes. La etapa de vivero parece, por otra parte, particularmente propicia para la comprobación de estas prácticas, dado que el volumen de enmienda necesario es inferior y por lo tanto mayor es la

aplicabilidad desde el punto de vista económico.

#### **4.1.5.4. Biofumigación**

Entre las especies vegetales con efecto alelopático existen algunas que se caracterizan por el marcado efecto biocida sobre patógenos de suelo y malas hierbas en germinación de los metabolitos volátiles que de ellas se generan durante su descomposición. En particular son destacables distintas especies de *Sorghum* Moench., que desprenden ácido cianhídrico, y diversas crucíferas, fundamentalmente *Brassica* spp., que al descomponerse liberan isotiocianatos análogos a ciertos fumigantes de síntesis (Sarwar *et al.*, 1998). Las características particulares de estas especies vegetales han sido aprovechadas para reducir la incidencia de patógenos de suelo. Por una parte, se ha sugerido aplicar este principio mediante la generación *in situ* de biomasa residual de estas plantas, ya sea a través de su inclusión en las rotaciones o con la siembra de abonos verdes o de cubiertas vegetales (Mojtahedi *et al.*, 1991a; Gardner *et al.*, 1992; Mojtahedi *et al.*, 1993; McGuidwin y Laine, 1995; Koike *et al.*, 1997; Davis *et al.*, 1997; Viaene y Abawi, 1998; Xiao *et al.*, 1998). Otra aplicación de la práctica consiste en agregar al suelo o a los sustratos de semilleros o viveros restos vegetales de las especies mencionadas generados *ex situ* (Oduor Owino *et al.*, 1993; Subbarao y Hubbard, 1996; Shetty *et al.*, 2000). Las diversas modalidades que aplican este principio han sido englobadas bajo la denominación común de "biofumigación" (Kierkegaard *et al.*, 1993). En ocasiones, la incorporación de este material vegetal se complementa con el sellado del suelo o el sustrato con una película plástica, con objeto de confinar los gases desprendidos por descomposición, concentrarlos y reforzar así el efecto biológico de los mismos (Koike *et al.*, 1997; Blok, *et al.*, 2000). Cuando esta modalidad de la práctica se efectúa al aire libre y respetando las condiciones agronómicas que requiere la solarización, se conjugan los efectos de ambas técnicas: la elevación de la temperatura acelera la descomposición del material y aumenta la susceptibilidad de los hongos y nematodos a la acción de los metabolitos desprendidos de las enmiendas, dando como resultado una interacción sinérgica de los dos efectos individuales (Keinath, 1996; Chellemi *et al.*, 1997).

La siembra de crucíferas ha sido sugerida como una alternativa para el saneamiento de terrenos destinados a la replantación de frutales fuertemente infestados con nematodos (Halbrendt y Jing, 1994). No se han encontrado antecedentes acerca del empleo de la biofumigación como método de desinfestación de nematodos en viveros de frutales. Los buenos resultados obtenidos en otras circunstancias, así como la conveniencia económica de la práctica y su mínimo impacto sobre el ambiente, alientan a investigar sus posibilidades de aplicación.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. DESINFESTACIÓN DE SUSTRATOS DE USO VIVERÍSTICO MEDIANTE SOLARIZACIÓN

Para evaluar la eficacia de la solarización en la desinfestación de sustratos de uso viverístico se realizaron dos experimentos. El primero se llevó a cabo entre los meses de julio y agosto de 1999 y el segundo se realizó durante los mismos meses del año 2000. El propósito de los mismos fue determinar el efecto de la solarización aplicada a sustratos de uso viverístico dispuestos en pilas o montículos según la práctica habitual del viverista, sobre la supervivencia y la persistencia de la capacidad infectiva del nematodo nodulador *M. incognita*.

#### 4.2.1.1. Preparación de las pilas o montículos de sustrato

La solarización se realizó sobre pilas o montículos de sustratos de uso viverístico dispuestos de tal forma que simularan una práctica de adopción sencilla en viveros comerciales. Los dos experimentos se realizaron en un terreno completamente soleado ubicado en las instalaciones del Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC, en la Alameda del Obispo, Córdoba (37° N, 4° O) durante los meses de julio y agosto.

En el primer experimento se empleó un sustrato constituido completamente por limo. El sustrato se dispuso en montículos de forma cónica, de acuerdo con el talud natural del material. Las dimensiones aproximadas del cono fueron 80 cm de altura y 3 m<sup>2</sup> de superficie en la base. Los seis conos se ubicaron según una disposición de 2 filas X 3 montículos. Inmediatamente antes del experimento los montículos se regaron hasta que el suelo alcanzó la capacidad de campo. Tres de los seis montículos fueron sometidos a solarización, mientras que los tres restantes fueron controles sin solarizar. Los montículos solarizados fueron ubicados con respecto a los controles en disposición de zig-zag.

Con objeto de determinar el efecto de la temperatura sobre la supervivencia del nematodo, se colocaron en el interior de los montículos pequeñas bolsitas de nylon (5 µm de tamaño de poro) conteniendo el inóculo de *M. incognita* preparadas de la forma que se describe más adelante. Los montículos solarizados se cubrieron en toda su superficie expuesta con una lámina de polietileno de uso agrícola de 50 µm. Los otros tres montículos se mantuvieron sin cubrir con plástico, como testigos.

En el segundo experimento, que se realizó al año siguiente, los montículos se

dispusieron de forma similar a la adoptada para el primer año con la única excepción de que el sustrato viverístico empleado fue una mezcla de limo y sustrato comercial (Max<sup>®</sup>, Vehnemoor GmbH D-26683 Saterland.Sedelsberg, Alemania) en proporción 1:1 v/v.

#### **4.2.1.2. Inóculo**

En ambos experimentos se utilizó como inóculo la misma población de *M. incognita* que se empleó para las pruebas de patogenicidad, y cuyo aislamiento y multiplicación se describió anteriormente (ver 3.2.1.2). Asimismo, la extracción de la suspensión de huevos empleada como inóculo, así como el cálculo y ajuste de la densidad de inóculo en ambas repeticiones, se obtuvo siguiendo la metodología que se refiere en el capítulo precedente (ver 3.2.1.2).

En el primer experimento se evaluó la efectividad de la solarización sobre huevos libres y sobre masas de huevos enteras. Para ello, raíces de tomate severamente infectadas por el nematodo, se trocearon en fragmentos de aproximadamente 4 cm de longitud. Dichos fragmentos se sumergieron en una solución acuosa de floxina B (0,15 g/l de agua corriente) durante 15-20 min (Daykin & Hussey, 1985). Posteriormente, se seleccionaron masas de huevos maduras (conteniendo gran cantidad de huevos) que se separaron del tejido vegetal mediante micromanipulación con pinza y aguja histológica bajo microscopio estereoscópico (Shurtleff y Averre, 2000).

#### **4.2.1.3. Preparación de las bolsitas**

A fin de determinar el efecto de la solarización sobre la supervivencia de *M. incognita* inóculo preparado en las dos formas descritas anteriormente se dispuso en pequeñas bolsitas de malla de nylon de 5 µm de luz, dimensión suficientemente pequeña como para garantizar la retención del material y los huevos de *M. incognita* contenidos en la misma. La malla se cortó en trozos cuadrangulares de aproximadamente 10 cm de lado y sobre ellos se colocaron aproximadamente 10 cm<sup>3</sup> de caolín de uso de laboratorio que se infestaron con 5 ml de suspensión de inóculo conteniendo una media de 760 huevos de *M. incognita* o con 5 masas de huevos suspendidas en acuosa de 5 ml de ADE. Una vez realizada la infestación con ambos tipos de inóculo, los trozos de nylon se plegaron para formar las bolsas y encerrar su contenido. Los bordes libres se retorcieron y se los ató firmemente con hilo de nylon para garantizar la hermeticidad del contenido. Después las bolsitas cerradas se sujetaron a un alambre de acero galvanizado que permitió regular la profundidad a que fueron introducidas en los montículos (ver Figs. 4.3 y 4.4). La mitad de

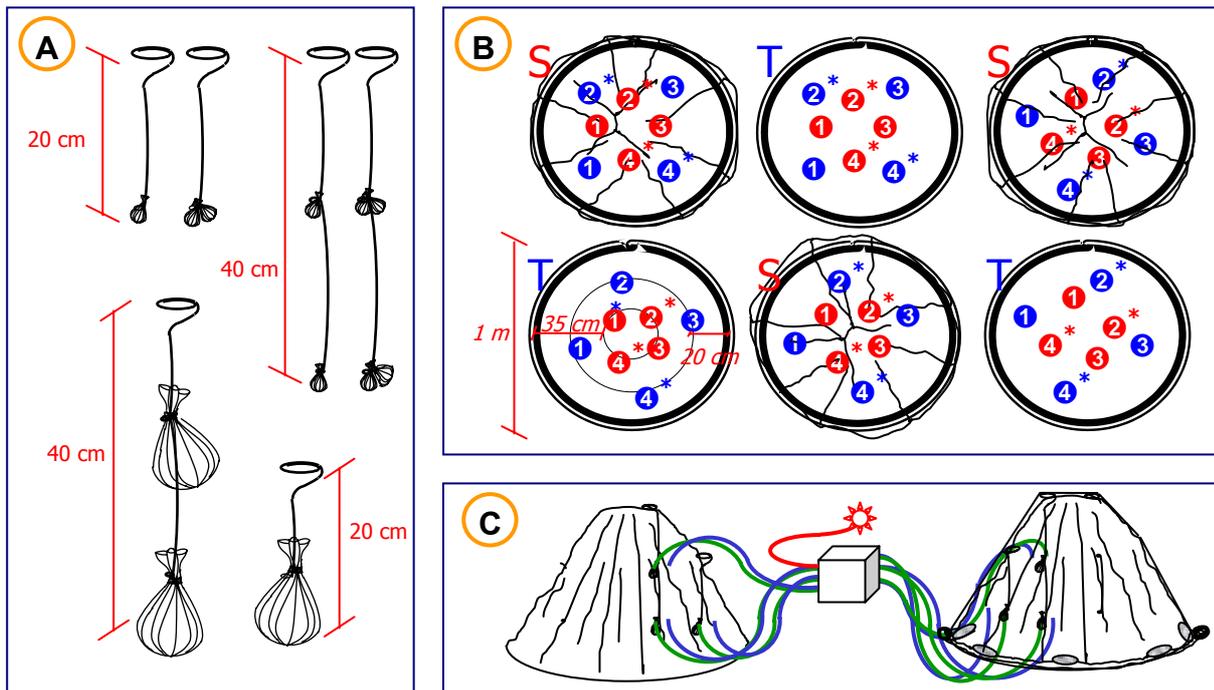
estos dispositivos se preparó para estaciones interiores con dos profundidades (20 y 40 cm.) de enterrado de las bolsitas y la otra mitad para estaciones exteriores con solo una profundidad de enterrado (20 cm) (Veáse más adelante: *Ubicación de las estaciones en los montículos*). El alambre de acero galvanizado presentaba en un extremo un pliegue perpendicular concebido para limitar la profundidad del enterrado y uno o dos bucles circulares colocados a tal distancia del origen que al atar de los mismos las bolsitas éstas quedaran a 20 y 40 cm (Fig. 4.3). En aquellos dispositivos donde la solarización se evaluó sobre masas de huevos y huevos libres, las dos bolsas se ataron al mismo bucle pero manteniéndolas separadas.

En el segundo experimento sólo se evaluó la influencia de la solarización sobre huevos libres. En este caso, para la confección de las bolsas se empleó una tela de tejido comercial de nylon de luz de malla de aproximadamente 5 µm. La tela se cortó en trozos cuadrangulares de aproximadamente 30 cm de lado. Sobre dichos trozos se colocaron 500 cm<sup>3</sup> del sustrato viverístico empleado que se infestaron con 10 cm<sup>3</sup> de suspensión acuosa conteniendo 10.000 huevos. Las bolsas con el sustrato infestado se cerraron de forma similar a la descrita en el primer experimento, se dispusieron sobre trozos de alambre de acero galvanizado realizados de idéntica forma y se sujetaron a éstos de la misma manera.

#### ***4.2.1.4. Ubicación de las estaciones en los montículos-Registro de temperaturas***

Para la colocación de las bolsitas en los montículos de sustrato los alambres preparados para una sola profundidad (20 cm) se colocaron equidistantes entre sí en una circunferencia concéntrica al borde del montículo, ubicada aproximadamente a 20 cm del borde (estaciones exteriores, Fig. 4.3, B)), en los montículos sin solarizar (tratamiento **Nsol-20E**) y en los solarizados (tratamiento **Sol-20E**). Los alambres preparados para dos profundidades se colocaron equidistantes entre sí en una circunferencia ubicada a 35 cm del borde. De esta forma quedaron determinados otros cuatro tratamientos: estación interior sin solarizar a 20 cm. de profundidad (**Nsol-20I**), estación interior sin solarizar a 40 cm. de profundidad (**Nsol-40I**), estación interior solarizada a 20 cm. de profundidad (**Sol-20I**) y estación interior solarizada a 40 cm. de profundidad (**Sol-40I**). Como repeticiones de los tratamientos se consideraron las estaciones correspondientes a una misma combinación de profundidad y posición ubicadas en diferentes montículos (tres repeticiones para tratamientos sin solarizar y tres para tratamientos solarizados). Por cada montículo se dispusieron cuatro estaciones exteriores, cada una de ellas correspondientes a las cuatro

diferentes fechas de extracción que se establecieron a los 6, 10, 17 y 22 días del inicio del experimento. Una distribución similar se dispuso para las estaciones interiores. Las bolsitas conteniendo los huevos libres se dispusieron en todas las estaciones, mientras que aquellas que contenían masas de huevos sólo se colocaron en las que correspondían a los muestreos a realizar a los 10 y 22 días después de la inoculación (estaciones 2 y 4, respectivamente, Fig. 4.3, B)). De forma adicional se prepararon bolsitas con inóculo por cada combinación de tratamiento y repetición (18 en total) que no se enterraron, sino que sirvieron como controles o como lecturas correspondientes al tiempo 0.



**Fig. 4.3.** Experimento de solarización **A)** Dispositivos de alambre para regular la profundidad y bolsas de inóculo. Arriba izq.: dispositivos preparados para las estaciones exteriores en el primer experimento, conteniendo solo una bolsita por bucle (huevos libres) y dos bolsitas (huevos libres y masas). Arriba der.: alambres preparados para las estaciones interiores con un bucle para cada profundidad (20 y 40 cm). Abajo: alambres preparados para la segunda prueba con bolsas de mayor tamaño conteniendo en todos los casos sólo un bucle para cada profundidad. **B)** Vista en planta esquematizada de los montículos mostrando la disposición de las estaciones: obsérvese la disposición alternante de los montículos solarizados (S) y testigos (T). Las estaciones señaladas en rojo son las internas, con dos profundidades de muestreo, y las azules son las exteriores, con solo una profundidad. El número señalado en las estaciones corresponde a cada una de las cuatro fechas de muestreo y aquellas señaladas con un asterisco indican que llevaban, en el primer experimento, una bolsita de inóculo con huevos libres y otra con masas de huevos. **C)** Esquema de la disposición de las estaciones de control de la temperatura: los cables verdes se dirigen a los termopares situados en el interior de las bolsitas (tres hacia la izquierda, al montículo testigo, y tres hacia la derecha, al montículo solarizado). A cada una de estos seis termopares corresponde una estación localizada en el mismo sitio pero fuera de las bolsitas (cables azules). El cable rojo se dirige a la estación que registra la temperatura del aire.

Tras los resultados del primer experimento en 1999, en el experimento siguiente del año 2000 no se incluyeron los tratamientos **Nsol-20E** y **Sol-20E**. Asimismo y como se

expuso previamente, en esta ocasión no se evaluó el efecto de los tratamientos sobre las masas de huevos.

La temperatura en el interior de los montículos, así como la del aire, fueron registradas de forma continua durante todo el tiempo que duró el experimento. En cada una de las estaciones de control se colocó un sensor térmico de termopar (Taylor y Jackson, 1986). Los sensores se conectaron mediante cable de termopar a una estación portátil (CR10X® Datalogger, Campbell Scientific, Logan UT, EEUU) que promedió cada 10 min los datos de temperatura registrados de forma automática a cada min. La primera estación de control se destinó a evaluar la temperatura del aire y se colocó sujeta a un soporte vertical 2 m por encima del terreno. Las restantes se colocaron en el interior de dos de los montículos, uno cubierto de plástico y el otro sin cubrir. En cada una de las tres ubicaciones previstas para el inóculo (circunferencia exterior a 20 cm de profundidad, circunferencia interior a 20 cm y circunferencia interior a 40 cm de profundidad) se dispusieron dos estaciones de control, una directamente en el sustrato y otra en el interior de una bolsita preparada en forma similar a las descritas previamente, con objeto de determinar un posible efecto de aislamiento térmico. A cada montículo, en consecuencia, correspondieron seis estaciones con lo cual se utilizaron un total de 13 termocuplas, incluida la que se destinó a registrar la temperatura del aire (Tabla 4-1).

**Tabla 4.1.** Ubicación de las diferentes estaciones de control de la temperatura con sus códigos correspondientes.

Estaciones			Código
Interior del montículo sin solarizar	Dentro de las bolsas	Circunferencia exterior. 20 cm de profundidad	<b>Nsol-B-20E</b>
		Circunferencia interior. 20 cm de profundidad	<b>Nsol-B-20I</b>
		Circunferencia interior. 40 cm de profundidad	<b>Nsol-B-40I</b>
	Fuera de las bolsas	Circunferencia exterior. 20 cm de profundidad	<b>Nsol-S-20E</b>
		Circunferencia interior. 20 cm de profundidad	<b>Nsol-S-20I</b>
		Circunferencia interior. 40 cm de profundidad	<b>Nsol-S-40I</b>
Interior del montículo solarizado	Dentro de las bolsas	Circunferencia exterior. 20 cm de profundidad	<b>Sol-B-20E</b>
		Circunferencia interior. 20 cm de profundidad	<b>Sol-B-20I</b>
		Circunferencia interior. 40 cm de profundidad	<b>Sol-B-40I</b>
	Fuera de las bolsas	Circunferencia exterior. 20 cm de profundidad	<b>Sol-S-20E</b>
		Circunferencia interior. 20 cm de profundidad	<b>Sol-S-20I</b>
		Circunferencia interior. 40 cm de profundidad	<b>Sol-S-40I</b>
Temperatura del aire			<b>Air</b>

En el experimento efectuado en 2000 no se incluyeron las estaciones colocadas sobre la circunferencia exterior (Nsol-B20E, Nsol-20E, Sol-B20E y Sol-20E), ya que se decidió eliminar los tratamientos correspondientes en razón de los resultados obtenidos en 1999.

Con objeto de representar gráficamente la variación de la temperatura durante el día se calculó para cada fracción horaria la temperatura media correspondiente al periodo completo ( $T_h$ ). Con esos datos se calcularon, para cada estación, los siguientes parámetros:

temperatura diaria media ( $T_{\text{dia}} = (\sum_n T_h)/n$ , donde  $n$  es el número total de fracciones horarias consideradas en un día, en este caso  $24 * 6 = 144$ ), temperatura máxima media diaria ( $T_{\text{max}}$ ), temperatura mínima media diaria ( $T_{\text{min}}$ ) e intervalo térmico ( $T_{\text{max}} - T_{\text{min}}$ ).

#### **4.2.1.5. Evaluación de la viabilidad del inóculo**

En cada uno de los períodos de muestreo, las bolsas con el inóculo se retiraron de su estación y se depositaron en un frigorífico a 4 °C hasta que se realizó la evaluación. En el primer experimento el efecto de la solarización sobre la supervivencia de los huevos del nematodo se evaluó siguiendo el método de Ehwaeti *et al.* (1998) para estimación de la viabilidad. Las bolsitas que contenían los huevos libres se abrieron, el caolín contenido en las mismas se lavó sobre un tamiz de 5 µm de malla y se recogieron los huevos que permanecieron retenidos sobre dicho tamiz. Los huevos recogidos se depositaron en una placa de Petri estéril de 5,5 cm cuyo volumen se completó con ADE y se procedió a su recuento. Posteriormente los huevos en las placas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 20 días, a lo largo de los cuales se renovó el agua de la suspensión bajo microscopio estereoscópico cada tres días con especial precaución de no retirar en la operación huevos o juveniles que pudieran haber eclosionado. Finalizado el periodo de incubación, se procedió a la observación de cada placa y se realizó el recuento de los juveniles eclosionados. El nivel de eclosión de los huevos se calculó por el porcentaje del número de juveniles presentes al final de la incubación respecto del total de huevos en cada placa al comienzo de la incubación. La viabilidad de los huevos contenidos en las masas se evaluó de forma similar a la descrita en lo que se refiere a la extracción y la incubación. Al finalizar el periodo de incubación se contó el número de juveniles eclosionados y los huevos que quedaron retenidos en las masas sin eclosionar después de disolver las mismas en solución diluida de hipoclorito de sodio (ver 3.2.1.2). Para el cálculo del porcentaje de eclosión se consideró el número inicial de huevos como la suma de los juveniles eclosionados más los huevos retenidos en las masas sin eclosionar al final del experimento.

En el segundo experimento, la supervivencia de los huevos se evaluó mediante un bioensayo de infectividad en plantas de tomate. A tal fin, el sustrato contenido en cada una de las bolsas extraídas se retiró y se colocó en una maceta troncocónica de arcilla de 500 cm<sup>3</sup> e inmediatamente después se transplantó a cada una de ellas una plántula de tomate del cv. Tres Cantos obtenida de forma similar a la descrita para la multiplicación de inóculo de *Meloidogyne* spp. (ver 3.2.1.2). Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento durante 60 días a 25 °C y al final de ese tiempo se realizó la extracción y posterior recuento de los huevos y nematodos contenidos en suelo y raíz mediante las

técnicas descritas previamente (ver 2.2.2). La población final fue el resultado de la sumatoria del recuento en suelo más el de las raíces. La población final relativa se calculó por el porcentaje que representó la población total final en cada unidad muestral respecto de la correspondiente en la bolsa control que se mantuvo sin enterrar (tiempo de solarización = 0).

#### **4.2.1.6. Análisis estadístico**

En ambos experimentos, los datos de porcentaje de eclosión de juveniles, población final absoluta, y población final relativa se sometieron a análisis de varianza (ANOVA). Las medias de un mismo tratamiento correspondientes a diferentes tiempos de exposición se compararon mediante el contraste de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (LSD) a  $P = 0,05$ . Con objeto de normalizar los datos previamente al análisis estadístico, los valores del número de nematodos por planta en el segundo de los experimentos se transformaron según la fórmula  $y = \log_{10}(x + 1)$ . Asimismo, dentro de grupos con el mismo tiempo de exposición las interacciones entre los distintos tratamientos se determinaron mediante contrastes ortogonales de un grado de libertad ( $P = 0,05$ ). En el experimento del año 1999 las agrupaciones consideradas para este análisis de las interacciones se efectuaron en forma secuencial considerando, en ese orden, el efecto de la posición en el montículo, el efecto de la profundidad, el tratamiento propiamente dicho (solarizado vs. no solarizado) y, por último el tipo de inóculo (huevos libres vs. masas). En el experimento efectuado en el año 2000 sólo se consideraron las interacciones debidas a la profundidad y al tratamiento, en ese orden, debido a que la reformulación del diseño experimental había eliminado los otros posibles efectos. Con los valores de porcentaje de eclosión, población final y población final relativa en los tratamientos no solarizados, se realizó un análisis de regresión lineal con el tiempo como variable independiente utilizando el programa estadístico Statistix (NH Analytical Software, Roseville, MN, EEUU). Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y el patrón de distribución de residuos respecto de los valores esperados, se usaron para valorar la adecuación de los datos al modelo (Campbell y Madden, 1990). Con los datos de porcentaje de eclosión de los tratamientos solarizados se realizó un análisis de regresión no lineal en función del tiempo mediante el programa PlotIT (Scientific Programming Enterprises Haslett, MI, EEUU).

#### **4.2.2. EFECTO PROTECTOR DE LA MICORRIZACIÓN**

Para determinar el efecto protector de las micorrizas contra la infección y capacidad patogénica de nematodos noduladores y lesionadores de raíz en plantones de olivo se

realizaron dos experimentos. En el primero de ellos se evaluó el efecto protector de tres micorrizas frente a *P. vulnus* y *M. incognita* y en el segundo el efecto protector de una micorriza frente a *M. incognita* y *M. javanica*.

#### **4.2.2.1. Inóculo utilizado**

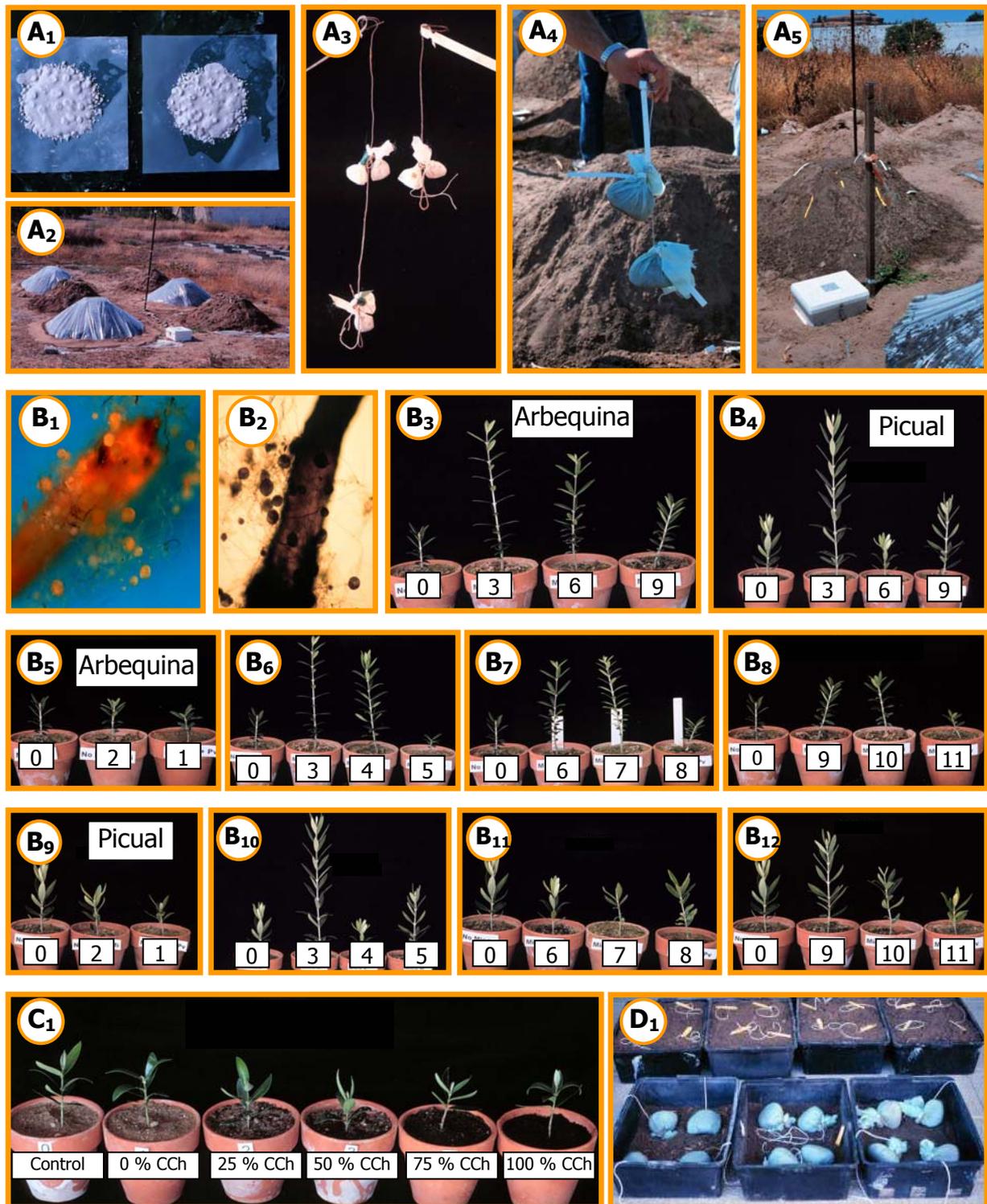
En los dos experimentos se emplearon las mismas poblaciones de *P. vulnus*, *M. incognita* y *M. javanica* que se habían utilizado en las pruebas de patogenicidad (ver 3.2.3.1). La multiplicación del inóculo, la extracción y el ajuste de la concentración se realizaron de forma similar a la descrita oportunamente (ver 3.2.1.3 para *P. vulnus* y 3.2.1.1 para *Meloidogyne* spp.).

#### **4.2.2.2. Material vegetal empleado y método de inoculación**

Los tratamientos incluidos en cada uno de los experimentos resultaron de la combinación factorial de las poblaciones de nematodos y las micorrizas empleadas, según se detallará más adelante. En el primer experimento los tratamientos se aplicaron sobre plantas de 'Picual' y 'Arbequina', mientras que en el segundo experimento sólo se utilizaron plantas de 'Picual', debido a la falta de material micorrizado.

En el primer experimento se emplearon plantones de 45 días de edad provenientes de un vivero comercial y obtenidos por micro-propagación. Las plantas venían presentadas en contenedores múltiples con celdas de 10 cm<sup>3</sup> conteniendo el sustrato de enraizamiento (mezcla de turba y fibra de coco en partes iguales) y presentaban un buen estado general en el momento de su recepción. Se utilizaron plantas inoculadas con tres micorrizas diferentes, para las cuales se mantuvo la denominación comercial del viverista: micorriza M, constituida exclusivamente por el hongo *Glomus mossae* (Nicol y Gerd.) Gerd. y Trappe, micorriza E, *Glomus intraradices* (Schenck y Smith) y micorriza C, mezcla de *G. intraradices* y *Glomus fasciculatum* (Thaxter sensu Gerd.) Gerd. & Trappe. En el segundo experimento se emplearon plantas de 'Picual' similares en edad, estado y presentación a las empleadas en el primero y sólo se utilizó la micorriza C.

En los dos experimentos las plantas se transplantaron a raíz desnuda a macetas troncocónicas de terracota de 500 cm<sup>3</sup>, siguiendo el procedimiento descrito para el segundo experimento de patogenicidad (ver 3.2.3.4). El sustrato empleado fue similar al utilizado en dicho ensayo y la inoculación fue simultánea al trasplante, utilizando para la misma 10 ml de la suspensión conteniendo el inóculo. La densidad de inóculo empleada fue de 10.000 nematodos/planta, en el caso de *Meloidogyne* spp., y de 2.000 nematodos/planta, en el caso



**Fig. 4.2.** Metodología empleada en el estudio del control de nematodos fitoparásitos en viveros de olivo. **A) Desinfestación de sustratos por solarización:** A<sub>1</sub>) Caolín sobre el cual se depositaron los huevos de *M. incognita* (Experimento del año 1999) A<sub>2</sub>) Vista general del experimento donde se observan los seis montículos. A<sub>3</sub>) Vista de los dispositivos reguladores de la profundidad de enterrado (Experimento del año 1999) A<sub>4</sub>) Colocación de las bolsas en los montículos (año 2000) A<sub>5</sub>) Registro de las temperaturas. **B) Primer experimento del efecto protector de las micorrizas:** B<sub>1</sub>) y B<sub>2</sub>) Micorrizas sobre raíces de olivo B<sub>3</sub>) y B<sub>5</sub>) a B<sub>8</sub>) Plantas de 'Arbequina' en el primer experimento del efecto protector de la micorrización (0 = plantas sin micorrizar y sin inocular, 1 = control sin micorrizar inoculada con *P. vulnus*, 2 = control sin micorrizar inoculada con *M. incognita*, 3 = micorriza C sin inocular, 4 = micorriza C inoculada con *P. vulnus*, 5 = micorriza C inoculada con *M. incognita*, 6 = micorriza E, sin inocular, 7 = micorriza E inoculada con *P. vulnus*, 8 = micorriza E inoculada con *M. incognita*, 9 = micorriza M, sin inocular, 10 = micorriza M inoculada con *P. vulnus* y 11 = micorriza M inoculada con *M. incognita*) B<sub>4</sub>) y B<sub>9</sub>) a B<sub>12</sub>) Plantas de 'Picual' en el primer experimento del efecto protector de la micorrización **C) Efecto de la enmienda con compost de corcho sobre el crecimiento de plántones de vivero:** C<sub>1</sub>) Vista de los diferentes tratamientos **D) Desinfestación de sustratos por biofumigación:** D<sub>1</sub>) Vista general de los tratamientos.



de *P. vulnus*. Los tratamientos resultantes en el primer experimento y sus códigos fueron los siguientes: 0 (control sin micorrizar y sin inocular), 1 (control sin micorrizar, inoculado con *P. vulnus*), 2 (control sin micorrizar, inoculado con *M. incognita*), 3 (micorriza C, sin inocular), 4 (micorriza C, inoculado con *P. vulnus*), 5 (micorriza C, inoculado con *M. incognita*), 6 (micorriza E, sin inocular), 7 (micorriza E, inoculado con *P. vulnus*), 8 (micorriza E, inoculado con *M. incognita*), 9 (micorriza M, sin inocular), 10 (micorriza M, inoculado con *P. vulnus*) y 11 (micorriza M, inoculado con *M. incognita*). En el segundo experimento los tratamientos resultantes y sus códigos fueron los siguientes: 0 (control sin micorrizar y sin inocular), 1 (control micorrizado, sin inocular), 2 (control sin micorrizar, inoculado con *M. incognita*), 3 (micorrizado, inoculado con *M. incognita*), 4 (control sin micorrizar, inoculado con *M. javanica*) y 5 (micorrizado, inoculado con *M. javanica*). El número de repeticiones por tratamiento fue de 10 plantas, en el primer experimento, y de 16 plantas en el segundo.

#### **4.2.2.3. Condiciones de crecimiento de los plantones**

Las condiciones de crecimiento de las plantas fueron similares en los dos experimentos realizados. Con posterioridad a la inoculación, las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento de ambiente controlado siguiendo un patrón completamente aleatorizado y se mantuvieron en esa situación durante 100 días. El ambiente de la cámara se mantuvo en condiciones controladas similares a las que se emplearon para el los diferentes experimentos relatados en el Capítulo III (ver 3.2.1.1). La programación de los riegos y de la aplicación de solución nutritiva también fue similar a la empleada en el segundo experimento de patogenicidad (ver 3.2.3.5), sólo que en este caso la concentración de los diferentes nutrientes en la solución empleada en la fertirrigación fue modificada para atender a las condiciones especiales que ocurren en las plantas micorrizadas (Pérez, 2000): i.e., se mantuvo la suplementación con quelatos de hierro y la concentración en todas las sales, con excepción del fosfato monopotásico, que se redujo cuatro veces. Las plantas se condujeron a un solo eje, para lo cual se procedió a eliminar los brotes axilares de forma similar a como se procedió durante el segundo experimento de patogenicidad.

#### **4.2.2.4. Evaluación del crecimiento de las plantas y de las poblaciones de nematodos**

En los dos experimentos el crecimiento de los plantones de olivo se evaluó de forma similar a la utilizada en el segundo experimento de patogenicidad y empleando los mismos parámetros (ver 3.2.3.6). En esta ocasión, por tratarse de plantas micropropagadas en las

cuales no cabía distinguir entre “tronco” y “rama”, solo se consideró un parámetro de crecimiento del diámetro caulinar. Asimismo, la evaluación de las poblaciones de nematodos en las plantas inoculadas se efectuó mediante análisis nematológicos de suelo y raíz según las técnicas descritas oportunamente. Se adoptaron los mismos parámetros empleados en los experimentos de patogenicidad y la evaluación y transformación de los datos fue igualmente similar. El análisis estadístico utilizado fue, del mismo modo, similar al que se había empleado en el experimento de patogenicidad, tanto para los parámetros de crecimiento como para los parámetros poblacionales.

#### **4.2.3. EFECTO DE LA ENMIENDA DEL SUSTRATO CON COMPOST DE CORCHO SOBRE LA PATOGENICIDAD DE *M. INCOGNITA***

El potencial del compost de corcho como desinfectante de sustratos infestados con *M. incognita* y el efecto de dicha práctica sobre el crecimiento de plantones de olivo se estudió en las condiciones controladas que se relatan a continuación.

##### **4.2.3.1. Inóculo utilizado**

El inóculo consistió en la misma población de *M. incognita* que se había utilizado en los experimentos de patogenicidad y en los de protección mediante micorrización. Los métodos empleados en la multiplicación del inóculo, la extracción y el ajuste de la concentración fueron similares a los descritos oportunamente (ver 3.2.1.1).

##### **4.2.3.2. Material vegetal empleado y método de inoculación**

En este estudio se emplearon plantones de olivo del cv. Picual de 45 días de edad provenientes de un vivero comercial y obtenidos por micropropagación. El estado y presentación de los plantones fueron similares al de los utilizados en el experimento sobre el efecto protector de la micorrización (ver 4.2.2.2).

Como sustrato se utilizaron mezclas de una fracción de suelo mineral y de una enmienda orgánica, en diferentes proporciones. El suelo mineral fue una mezcla esterilizada de arena fina y limo en proporción 2:1 v/v, similar a la utilizada en experimentos anteriores. La enmienda orgánica fue compost de corcho elaborado en la Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola de la Universidad de Sevilla. En su elaboración se emplearon residuos sin valor comercial provenientes de las primeras etapas del aprovechamiento del

corcho (Pérez y Pérez, 1996) triturados hasta reducirlos a fracciones inferiores a los 5 mm de diámetro y sometidos a un proceso de compostaje aeróbico normalizado (Haugh, 1993). Las mezclas de suelo mineral y compost de corcho se realizaron en seis proporciones que constituyeron los diferentes tratamientos: 0 (control, 0 % de compost y sin infestar), 1 (0 % de compost, infestado), 2 (25 % de compost, infestado), 3 (50 % de compost, infestado), 4 (75 % de compost, infestado) y 5 (100 % de compost, infestado). En todos los casos, las proporciones fueron calculadas en volumen y se efectuaron 14 repeticiones por cada tratamiento.

El trasplante se realizó a raíz desnuda siguiendo los procedimientos descritos anteriormente (ver 3.2.3.3), y se emplearon macetas de arcilla de 500 cm<sup>3</sup>. La inoculación fue simultánea al trasplante y en la misma se agregaron a cada planta 10 ml de suspensión conteniendo 10.000 huevos y juveniles de *M. incognita*.

#### **4.2.3.3. Condiciones controladas de crecimiento de los plantones**

Los plantones se colocaron en una cámara de crecimiento de plantas de ambiente controlado, donde se dispusieron siguiendo un diseño en bloques completamente aleatorizados. El experimento se mantuvo durante 60 días y el control del ambiente, y la programación del riego y la fertilización se hicieron de forma similar a la adoptada en el segundo experimento de patogenicidad.

#### **4.2.3.4. Evaluación del crecimiento de las plantas y de la población de nematodos**

El crecimiento de la planta y la evolución de la población de *M. incognita* se evaluaron con los mismos parámetros y procedimientos empleados en experimentos sobre el efecto protector de la micorrización. (ver 4.2.2.4). La población relativa final se calculó como porcentaje de la población final en cada tratamiento respecto de la población final en el control infestado que no contenía enmienda de corcho.

#### **4.2.3.5. Análisis estadístico**

Los parámetros de crecimiento se sometieron a ANOVA y las medias se compararon mediante el contraste de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (LSD) y contrastes ortogonales de un grado de libertad ( $P = 0,05$ ). El mismo procedimiento se empleó para analizar los valores de la población final por planta y de la población relativa final. En este caso, y con objeto de normalizar los datos, previamente al análisis estadístico

los datos se transformaron según la fórmula  $y = \log_{10}(x + 1)$ . Con los valores de población final relativa se realizó un análisis de regresión no lineal en función del porcentaje de compost añadido, mediante el programa PlotIT (Scientific Programming Enterprises Haslett, MI, EEUU).

#### **4.2.4. EFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN**

El experimento que se describe a continuación fue efectuado con objeto de determinar el efecto desinfectante de la biofumigación con paja de sorgo en sustratos de uso viverístico.

##### **4.2.4.1. Inóculo utilizado**

Se empleó la misma población de *M. incognita* utilizada en todos los experimentos previos descritos en este capítulo y el precedente. También se procedió de manera similar para la multiplicación del inóculo, su extracción y el ajuste de la concentración.

##### **4.2.4.2. Preparación de los sustratos**

Los sustratos empleados en el presente experimento se prepararon añadiendo paja verde de sorgo o pasto del Sudán (*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf cv. Piper) picada en trozos de longitud no superior a 2 cm, a una mezcla estéril de arena fina y limo preparada según los procedimientos descritos anteriormente. La paja verde de sorgo se añadió en dos proporciones diferentes, 2 y 4 % p/p, calculadas en base al peso seco. Se dispuso de un control de sustrato sin adición de paja.

##### **4.2.4.3. Preparación de las bolsas**

El efecto de los tratamientos sobre la población del nematodo se evaluó sobre una fracción del sustrato correspondiente contenida en una bolsa de tela de malla fina. Estas bolsas se prepararon de forma similar a la descrita para el segundo experimento de solarización y cada una recibió 10.000 huevos + juveniles de *M. incognita* (ver 4.2.1.3). El cierre de las bolsas fue asegurado con una cuerda de material plástico y de la misma se dejó libre un segmento de aproximadamente 20 cm de cuyo extremo se ató una etiqueta de plástico que facilitara la identificación y extracción de las bolsas (Fig. 4.4).

#### **4.2.4.4. Disposición de los tratamientos y parámetros evaluados**

Las bolsas con inóculo y sustrato se dispusieron en bandejas de plástico de sección cuadrangular de 55 x 40 cm y 18 cm de profundidad. En cada una de las bandejas se colocaron cuatro bolsas, cada una de ellas correspondientes a las cuatro fechas de muestreo (5, 15, 30 y 60 días después de la infestación con *M. incognita*). Una bolsa suplementaria por cada bandeja se dejó sin enterrar representando un muestreo a tiempo 0. Una vez colocadas las bolsas sobre las bandejas se procedió a cubrirlas con el sustrato correspondiente a cada tratamiento hasta una altura de 15 cm. Sobre cada una de las diferentes concentraciones de paja de sorgo en el sustrato se estudiaron dos alternativas de manejo que fueron sellar con una cobertura de plástico opaco de 200 galgas cerrada herméticamente con cinta de embalaje y mantener sin sellado. De esta forma, se establecieron los siguientes tratamientos: 1 (control, sin enmienda y con cobertura plástica), 2 (control, sin enmienda y sin cobertura plástica), 3 (2 % de enmienda, con paja de sorgo con cobertura plástica), 4 (2 % de enmienda, con paja de sorgo sin cobertura plástica), 5 (4 % de enmienda, con paja de sorgo con cobertura plástica) y 6 (4 % de enmienda, con paja de sorgo sin cobertura plástica). Se efectuaron tres repeticiones por cada tratamiento, de tal forma que la cantidad total de bandejas fue de 18. Las bandejas se distribuyeron según un diseño completamente aleatorizado, en una cámara de crecimiento de plantas con temperatura controlada a 25 °C donde se mantuvieron hasta el final del experimento.

En cada fecha de muestreo, las bolsas extraídas se depositaron en una cámara fría a 4 °C hasta completar todas las fechas de muestreo. Finalizados los muestreos, se evaluó la viabilidad del inóculo mediante un bioensayo en plantas de tomate similar al efectuado en el segundo experimento de solarización que tuvo en consideración parámetros similares (ver 4.2.1.5). La población final relativa se calculó para cada tiempo de exposición al tratamiento en referencia al tiempo 0.

#### **4.2.4.5. Análisis estadístico**

El experimento se analizó de forma similar al experimento de solarización. Las medias correspondientes a un mismo tratamiento, pero con diferente tiempo de exposición al mismo, fueron comparadas entre sí por el método de la mínima diferencia significativa protegida de Fisher (LSD) a  $P = 0,05$ , mientras que los contrastes ortogonales de un grado de libertad ( $P = 0,05$ ) se utilizaron para analizar el efecto de los tratamientos sobre las medias correspondientes a un mismo tiempo de exposición. Las interacciones se evaluaron de forma secuencial, considerando en primera lugar el efecto del sellado con plástico y posteriormente el efecto de la concentración de la paja de sorgo en la mezcla.

## 4.3. RESULTADOS

### 4.3.1. EFECTO DE LA SOLARIZACIÓN: AÑO 1999

#### 4.3.1.1. *Variación diaria de las temperaturas*

En el experimento realizado en el año 1999 la temperatura del aire registró una media diaria de 28,6 °C y osciló entre una mínima media de 19,8 °C y una máxima media de 36,7 °C (Fig. 4.5, izq., Tabla 4-2). En el interior del montículo sin solarizar, la temperatura registrada a lo largo del día superó a la del aire, excepto durante el intervalo situado aproximadamente entre las 12:00 y las 19:00. A su vez, en todos los tratamientos las temperaturas medias diarias registradas dentro del montículo superaron a las del aire. La amplitud de los intervalos térmicos registrados en el interior del montículo sin solarizar fue menor que la verificada en la temperatura del aire. A su vez el intervalo de las temperaturas en las diferentes estaciones dentro del montículo dependió de la profundidad de enterrado de las bolsas: las estaciones situadas a 40 cm registraron un intervalo de variación térmica menor que el alcanzado en las situadas a 20 cm. La variación de la temperatura en el interior de las bolsitas en cada estación resultó muy similar a la registrada en su correspondiente estación del suelo.

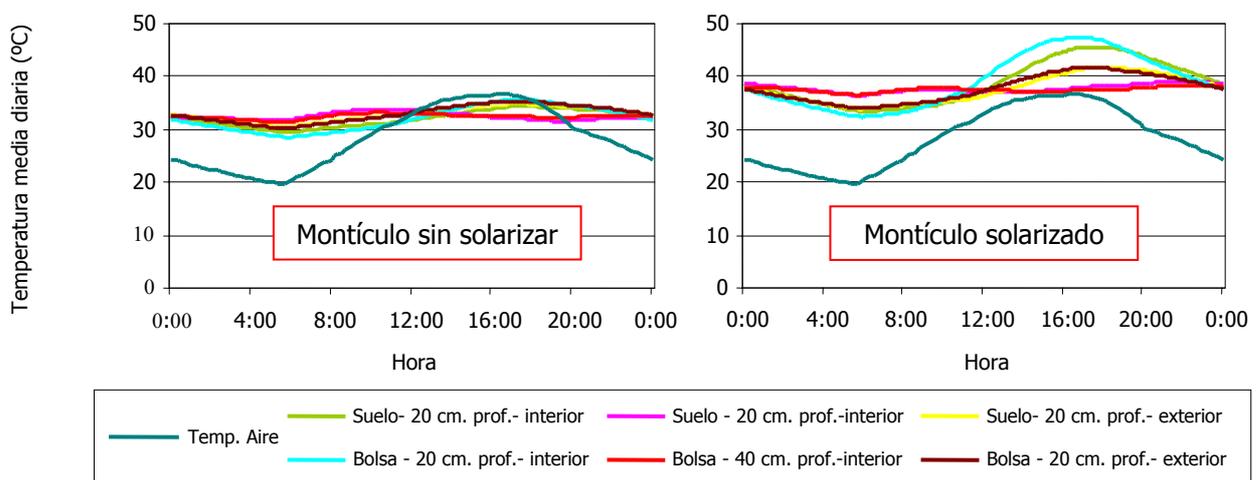
Las curvas de variación de la temperatura en las estaciones situadas a 20 cm de profundidad mostraron un único ciclo diario, mientras que las estaciones situadas a 40 cm de profanidad mostraron dos ciclos diarios, con dos mínimos y dos máximos. El ciclo diario en el interior del montículo mostró un desplazamiento respecto al de la temperatura del aire: la máxima temperatura del aire se registró a las 16:30, mientras que en las estaciones situadas a 20 cm de profundidad las máximas temperaturas se registraron entre las 17:00 y las 17:30, respectivamente. Una tendencia similar se observó en las mínimas que se registraron a las 5:30, para la temperatura del aire, y entre las 5:40 y las 5:50, en las estaciones mencionadas.

En el interior del montículo solarizado las temperaturas fueron, en todo momento del día, superiores a las del aire (Fig. 4.5, der.). Por otra parte, las medias diarias en las estaciones situadas dentro del montículo solarizado superaron en todos los casos en más de 8 °C a la temperatura media del aire. La estación situada en el interior de la bolsita en la circunferencia interior a 20 cm de profundidad fue la que registró la mayor temperatura máxima media diaria (47,35 °C, Tabla 4.2). En el interior del montículo las temperaturas máximas se alcanzaron con un leve retraso temporal respecto a la temperatura máxima del aire en las estaciones situadas a 20 cm de profundidad (máximas registradas entre las 16:40 y las 18:00) y con un retraso más acentuado en las estaciones situadas a 40 cm de profundidad (máximas registradas entre las 21:40 y las 22:10). Prácticamente no existió retraso, en cambio, entre la hora en que se registraron las temperaturas mínimas del aire y las temperaturas mínimas en el interior del montículo (todas verificadas entre las 5:40 y las 6:00).

**Tabla 4.2.** Parámetros térmicos registrados en las estaciones correspondientes a los diferentes tratamientos en la prueba de solarización llevada a cabo en 1999<sup>a</sup>.

Estación	T <sub>dia</sub> <sup>b</sup>	T <sub>max</sub> <sup>c</sup>		T <sub>min</sub> <sup>d</sup>		Intervalo térmico <sup>e</sup>
		Valor	Hora de registro	Valor	Hora de registro	
Air	28,6	36,7	16:30	19,8	5:30	16,9
Nsol-B-20E	32,9	35,4	17:00	30,2	5:40	5,2
Nsol-B-20I	32,0	35,6	17:10	28,5	5:50	7,1
Nsol-B-40I	32,4	33,3	10:00	31,4	5:40	1,9
Nsol-S-20E	32,9	34,7	17:10	30,7	5:40	4,0
Nsol-S-20I	32,0	34,4	17:30	29,4	5:50	4,9
Nsol-S-40I	32,5	33,8	10:00	31,6	19:10	2,2
Sol-B-20E	37,6	41,7	17:10	34,0	5:50	7,8
Sol-B-20I	39,2	47,4	16:40	32,4	5:50	15,0
Sol-B-40I	37,5	38,3	22:10	36,5	5:40	1,8
Sol-S-20E	37,5	41,7	18:00	33,9	5:50	7,8
Sol-S-20I	38,8	45,6	17:30	33,4	6:00	12,3
Sol-S-40I	37,6	39,1	21:40	36,4	5:40	2,6

<sup>a</sup> Las temperaturas se registraron con sensores térmicos de termopar conectados a una estación portátil de registro continuo. Los parámetros se calcularon en base a una serie de datos constituida por el promedio de las temperaturas registradas diariamente en cada fracción horaria de 10 m durante todo el experimento. <sup>b</sup> Temperatura diaria media ( $T_{dia} = (\sum_n T_n)/n$ , donde  $n$  es el número total de fracciones horarias consideradas en un día, en este caso  $24 * 6 = 144$ ), <sup>c</sup> Temperatura máxima media diaria. <sup>d</sup> Temperatura mínima media diaria. <sup>e</sup>  $T_{max} - T_{min}$ .



**Fig. 4.5.** Evolución diaria de las temperaturas registradas en 1999 en el interior del montículo sin solarizar (izq.) y en el interior del montículo solarizado (der.).

#### 4.3.1.2. Evaluación de la viabilidad del inóculo

En todos los casos, y con independencia del tratamiento de que se tratase, la viabilidad del inóculo expresada como porcentaje de eclosión de huevos se redujo en forma proporcional al tiempo de exposición (Tabla 4.3). Del mismo modo en todos los casos, con excepción del tratamiento Nsol-40I sobre huevos libres, el porcentaje de eclosión de huevos resultó significativamente inferior al inicial ( $P < 0,05$ ) desde la primera fecha de muestreo (6 días, para los huevos libres y 10 días para las masas de huevos). Los controles sin solarizar mostraron una tasa constante de reducción de la viabilidad a través del tiempo ya que en las lecturas posteriores a partir de esa segunda fecha de evaluación mostraron porcentajes de eclosión significativamente más bajos hasta la fecha del último registro. Los tratamientos solarizados, en cambio, mostraron un descenso brusco en la eclosión que en todos los casos

determinó porcentajes de eclosión inferiores al 5 % en la segunda fecha de lectura. Estos tratamientos solarizados no mostraron en ningún caso diferencias significativas entre el registro efectuado en la segunda fecha de evaluación y los realizados en fechas posteriores.

**Tabla 4.3.** Efecto del tiempo de exposición a la solarización sobre la eclosión de huevos de *M. incognita*. Experimento del año 1999<sup>a</sup>

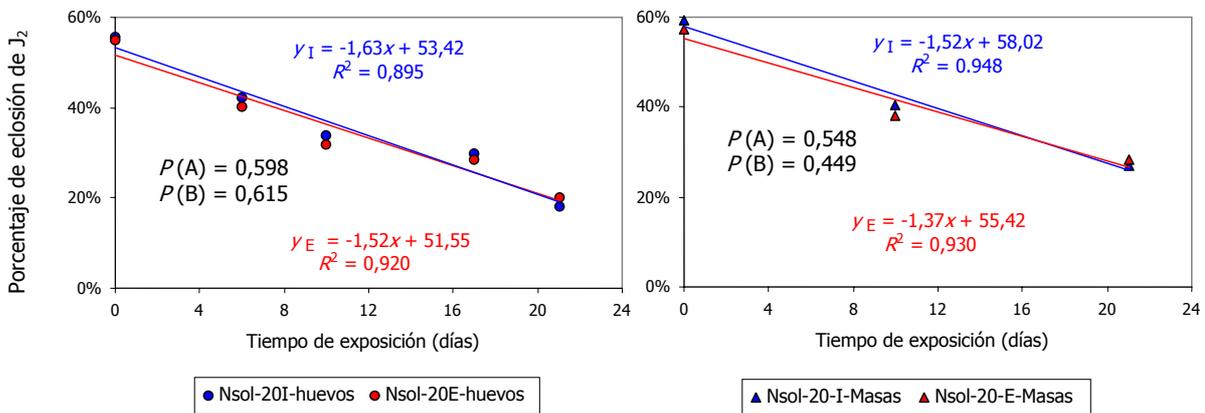
Tipo de inóculo	Tratamiento	Nº	Eclosión de huevos para cada fecha de muestreo (%) <sup>b</sup>				
			0 días	6 días	10 días	17 días	21 días
Huevos libres	Nsol20E	1	54,9 <sup>c</sup>	40,2 <sup>b</sup>	31,9 <sup>c</sup>	28,4 <sup>c</sup>	20,1 <sup>d</sup>
	Nsol20I	2	55,5	42,1 <sup>b</sup>	33,7 <sup>c</sup>	29,7 <sup>c</sup>	18,1 <sup>d</sup>
	Nsol40I	3	53,7	47,7 <sup>ab</sup>	45,9 <sup>b</sup>	42,4 <sup>bc</sup>	36,0 <sup>c</sup>
	Sol20E	4	48,8	1,2 <sup>b</sup>	0,4 <sup>b</sup>	0,3 <sup>b</sup>	0,6 <sup>b</sup>
	Sol20I	5	50,5	0,8 <sup>b</sup>	1,1 <sup>b</sup>	0,4 <sup>b</sup>	0,7 <sup>b</sup>
	Sol40I	6	47,2	3,8 <sup>b</sup>	2,4 <sup>b</sup>	1,0 <sup>b</sup>	0,6 <sup>b</sup>
Masa de huevos	Nsol20E	7	57,3	- <sup>d</sup>	38,1	-	28,4 <sup>c</sup>
	Nsol20I	8	59,2	-	40,4	-	27,1 <sup>c</sup>
	Nsol40I	9	57,7	-	47,0	-	37,3 <sup>c</sup>
	Sol20E	10	57,2	-	2,2	-	1,3 <sup>b</sup>
	Sol20I	11	55,8	-	2,5	-	1,4 <sup>b</sup>
	Sol40I	12	58,8	-	3,2	-	1,5 <sup>b</sup>
Contrastes ortogonales <sup>e</sup>							
Posición	1 vs. 2		ns	0.0144	ns	ns	ns
	4 vs. 5		ns	ns	ns	ns	ns
	7 vs. 8		ns	-	ns	-	ns
	10 vs. 11		ns	-	ns	-	ns
Profundidad	1 vs. 3		ns	<0.0000	- <sup>f</sup>	-	-
	2 vs. 3		ns	<0.0000	-	-	-
	(1-2) vs. 3		ns	-	<0.0000	<0.0000	<0.0000
	(4-5) vs. 6		ns	0.0005	ns	ns	ns
	(7-8) vs. 9		ns	-	0.0004	-	<0.0000
	(10-11) vs. 12		ns	-	ns	-	ns
Tratamiento	1 vs. (4-5)		ns	<0.0000	-	-	-
	2 vs. (4-5)		ns	<0.0000	-	-	-
	(1-2) vs. (4-5-6)		ns	-	<0.0000	<0.0000	<0.0000
	3 vs. 6		ns	<0.0000	-	-	-
	3 vs. (4-5-6)		ns	-	<0.0000	<0.0000	<0.0000
	(7-8) vs. (10-11-12)		ns	-	<0.0000	-	<0.0000
	9 vs. (10-11-12)		ns	-	<0.0000	-	<0.0000
Tipo de inóculo	(1-2) vs. (7-8)		ns	-	<0.0000	-	<0.0000
	3 vs. 9		ns	-	ns	-	ns
	(4-5-6) vs. (10-11-12)		ns	-	ns	-	ns

<sup>a</sup> Los datos son la media de seis repeticiones por tratamiento. El análisis nematológico se efectuó sobre muestras de 10 cm<sup>3</sup> contenidas en bolsitas de nylon de 5 µm de luz de malla situadas en el interior de montículos de sustrato viverístico. <sup>b</sup>Porcentaje de J<sub>2</sub> eclosionados durante 20 días de incubación a 25 °C en oscuridad sobre el total de huevos presentes en cada bolsita. <sup>c</sup> Las medias en una misma fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el contraste de la mínima diferencia significativa (LSD) protegida de Fisher. <sup>d</sup> Dato no registrado. <sup>e</sup> Probabilidad estimada para el estadístico  $t$  del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns =no significativo ( $P > 0,05$ ). <sup>f</sup> Interacción no considerada

El análisis de la varianza mostró que en el inicio del experimento no hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre la proporción de huevos eclosionados en el inóculo sometido a los diferentes tratamientos (fecha de muestreo 0). En cambio, los tratamientos influyeron significativamente ( $P < 0,001$ ) sobre la proporción de huevos eclosionados en las otras cuatro fechas consideradas. La posición interior o exterior de la muestra en el montículo (evaluada mediante los siguientes contrastes ortogonales de tratamiento: 1 vs. 2, 4 vs. 5, 7 vs. 8 y 10 vs. 11) no tuvo efecto significativo ( $P > 0,05$ ), con excepción de los

registros efectuados en los controles sin solarizar sobre huevos libres en los muestreos a los 6 días: en este caso particular el porcentaje de eclosión determinado por la presencia de  $J_2$  fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en la muestra extraída de la estación interior (Nsol-20I) respecto a la exterior (Nsol-20E) (Tabla 4.3).

El análisis de regresión lineal sobre el tiempo de tratamiento del porcentaje de huevos eclosionados en las bolsas no solarizadas situadas a 20 cm de profundidad mostró un ajuste apropiado con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) superiores al 85 % en todos los casos y presentó un patrón de residuos al azar (Fig. 4.6). En cambio, en las bolsas sometidas a solarización el porcentaje de eclosión de huevos en ningún caso se ajustó adecuadamente a un modelo lineal. La comparación entre los coeficientes de las curvas de regresión correspondientes a tratamientos situados a la misma profundidad pero en diferente posición del montículo indica que, considerando el período completo del experimento, el efecto de la posición no fue significativo ( $P > 0,05$ ).

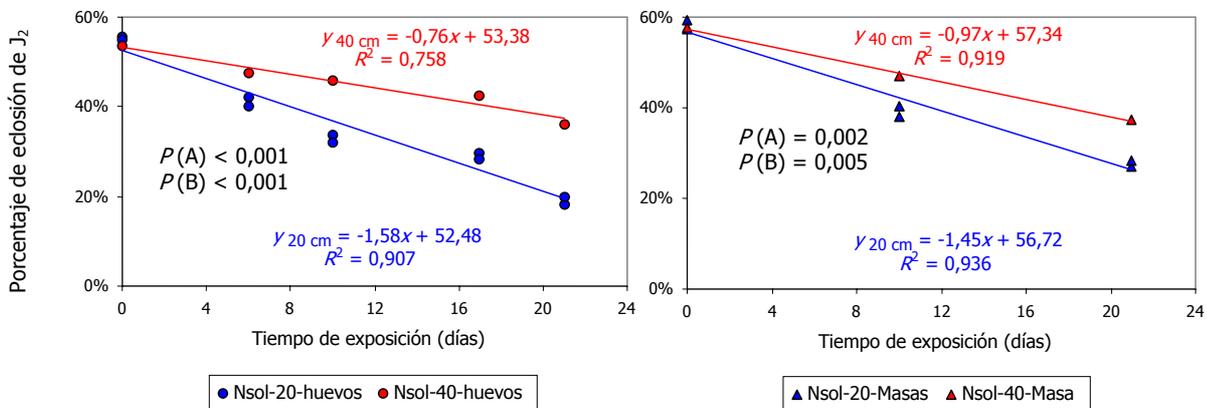


**Fig. 4.6.** Regresión lineal del porcentaje de eclosión de *M. incognita* determinado por la presencia de  $J_2$  en función del tiempo de exposición a los tratamientos de solarización (Año 1999): efecto de la posición en el montículo de bolsas con huevos libres (izq.) y con masas de huevos (der.). En cada regresión se indica la probabilidad del estadístico "P" para la comparación de las pendientes de las rectas ( $P(A)$ ) y para la comparación de las ordenadas en el origen ( $P(B)$ ).

Los contrastes ortogonales efectuados con posterioridad a los realizados para determinar el efecto de la posición de las bolsitas se hicieron considerando los tratamientos Nsol-20I y Nsol-20E en forma conjunta, exceptuando las situaciones concretas en que se había observado que ese efecto era significativo (Nsol-20E y Nsol-20I para huevos libres en los muestreos realizados a los 6 días de la inoculación) (Tabla 4.3). En los tratamientos controles sin solarizar, la posición en profundidad de las bolsitas tuvo un efecto significativo para todos los muestreos considerados a partir de los 6 días de exposición. Asimismo, en los controles no solarizados y en las muestras sometidas a 6 días de exposición, la ubicación de las bolsas a 40 cm en el interior del montículo (Nsol-40I) determinó sobre huevos libres un porcentaje de eclosión significativamente más alto ( $P < 0,05$ ) que cuando aquéllas se ubicaron a 20 cm de profundidad en la región interior o exterior del montículo (Nsol-20I y

Nsol-20E). A su vez cuando los tiempos de exposición fueron de 10, 17 y 21 días, el porcentaje de eclosión de huevos libres fue significativamente más alto ( $P < 0,05$ ) en los tratamientos colocados a 40 cm que en los colocados a 20 cm de profundidad. El porcentaje de eclosión a partir de masas de huevos en los tratamientos sin solarizar fue significativamente más alto ( $P < 0,05$ ) cuando la muestra había estado situada a 40 cm de profundidad que cuando había estado a 20 cm, para tiempos de exposición de 10 y 21 días. Comparativamente, la solarización determinó que el efecto de la profundidad no fuese significativo ( $P > 0,05$ ) para ninguno de los contrastes y en ninguna de las fechas consideradas, exceptuando cuando se comparó el efecto del enterrado a 20 cm con el de 40 cm (contraste (4-5) vs. 6) en el muestreo efectuado a los 6 días. En este caso el porcentaje de eclosión de huevos en las muestras solarizadas ubicadas a 40 cm en el interior (Sol-40I) fue significativamente más alto ( $P < 0,05$ ) que en aquellas tratadas de forma similar pero ubicadas a 20 cm de profundidad (Sol-20I y Sol-20E).

La comparación de las pendientes y las ordenadas en el origen de las rectas de regresión correspondientes a tratamientos situados a diferente profundidad dentro de los montículos nos muestran que, si consideramos el período completo del experimento, la profundidad de enterrado de las muestras tuvo efecto significativo (Fig. 4.7): la tasa de reducción de la eclosión fue significativamente inferior en los tratamientos situados a 20 cm de profundidad con respecto a los situados a 40 cm, independientemente del tipo de inóculo.

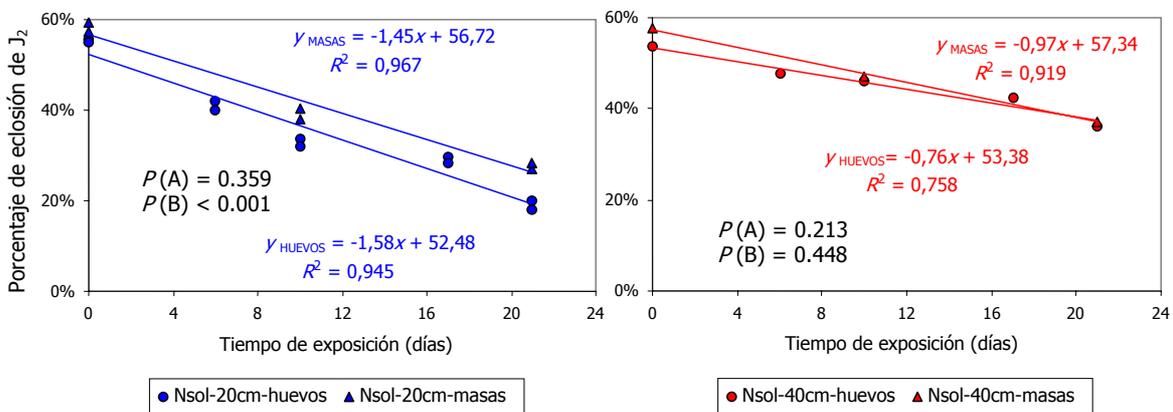


**Fig. 4.7.** Regresión lineal del porcentaje de eclosión de *M. incognita* determinado por la presencia de  $J_2$  en función del tiempo de exposición a los tratamientos de solarización (Año 1999): efecto de la profundidad en el montículo sobre viabilidad en huevos libres (izq.) y en masas de huevos (der.). En cada regresión se indica la probabilidad del estadístico "F" para la comparación de las pendientes de las rectas ( $P(A)$ ) y para la comparación de las ordenadas en el origen ( $P(B)$ ).

Habiéndose comprobado que la profundidad en los tratamientos solarizados sólo presentaba un efecto significativo en el muestreo efectuado a los 6 días sobre huevos libres, para el resto de las combinaciones de posición, profundidad y fecha de muestreo estos tratamientos fueron en adelante considerados en forma conjunta. Todos los contrastes realizados para determinar el efecto de la solarización (1 vs. 4-5, 2 vs. 4-5, 1-2 vs. 4-5-6, 3 vs.

6, 3 vs. 4-5-6, 7-8 vs. 10-11-12 y 9 vs. 10-11-12) indicaron que ésta influyó significativamente en todas las combinaciones posibles de posición, profundidad y fecha de muestreo (Tabla 4.3). En todos los casos, la solarización determinó una reducción significativa ( $P < 0,05$ ) de la eclosión respecto al testigo.

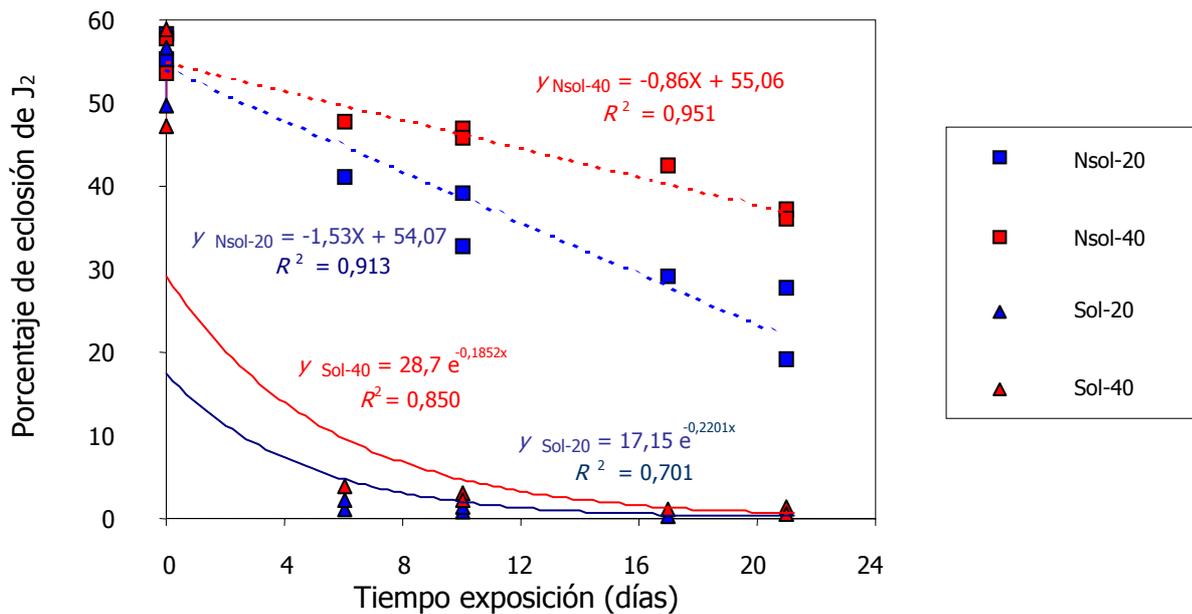
El tipo de inóculo tuvo una influencia significativa sólo en el caso de las estaciones de control sin solarizar situadas a 20 cm de profundidad. En este caso, el porcentaje de eclosión de los huevos contenidos en las masas fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) al que mostraron los huevos libres para las dos fechas de muestreo consideradas a partir del comienzo del experimento (Tabla 4.3). El tipo de inóculo no incidió significativamente ( $P > 0,05$ ) sobre los resultados en los tratamientos de solarización ni en el control sin solarizar ubicado a 40 cm de profundidad. La comparación de las rectas de regresión lineal correspondientes a los dos tipos de inóculo utilizados (huevos libres y masas de huevos) dentro de los tratamientos control sin solarizar muestran que este factor no influyó significativamente para las estaciones situadas a 40 cm de profundidad y que lo hizo sólo parcialmente para las estaciones situadas a 20 cm: la ordenada al origen correspondiente a la recta de regresión de las masas de huevos fue significativamente mayor que la correspondiente a la de huevos libres ( $P < 0,05$ ), mientras que las pendientes de ambas rectas no presentaron diferencias significativas entre sí ( $P > 0,05$ ) (Fig. 4.8).



**Fig. 4.8.** Regresión lineal del porcentaje de eclosión de *M. incognita* determinado por la presencia de  $J_2$  en función del tiempo de exposición a los tratamientos de solarización (Año 1999): efecto del tipo de inóculo sobre la viabilidad a 20 cm de profundidad (izq.) y a 40 cm de profundidad (der.). En cada regresión se indica la probabilidad del estadístico "F" para la comparación de las pendientes de las rectas ( $P(A)$ ) y para la comparación de las ordenadas en el origen ( $P(B)$ ).

La comparación de las rectas de regresión obtenidas para los controles sin solarizar, por una parte, y los contrastes ortogonales obtenidos en los tratamientos solarizados permitieron excluir del análisis el efecto de la posición en el montículo y el efecto de la fuente del inóculo. Por este motivo, ambos factores no fueron incluidos en el diseño

experimental del estudio de solarización efectuada en el año 2000. Esta simplificación nos permite, por otra parte, presentar los resultados de la prueba del año 1999 considerando cuatro efectos o tratamientos de carácter principal que resultan de combinar los considerados originalmente en el diseño experimental: Nsol-20cm, Nsol-40 cm, Sol-20 cm y Sol-40cm (Fig. 4.9). Los tratamientos que incluyeron solarización permitieron calcular con ajustes adecuados ( $R^2 = 0,850$ , para Sol-40, y  $R^2 = 0,701$ , para Sol-20) ecuaciones exponenciales para la expresión del porcentaje de eclosión en función del tiempo de exposición al tratamiento.



**Fig. 4.9.** Efecto del tratamiento (control vs. solarizado) y la profundidad (20 cm vs. 40 cm) sobre la supervivencia del inóculo de *M. incognita* en el interior de montículos de sustratos viverísticos sometidos a solarización.

### 4.3.2. EFECTO DE LA SOLARIZACIÓN: AÑO 2000

#### 4.3.2.1. Variación diaria de las temperaturas

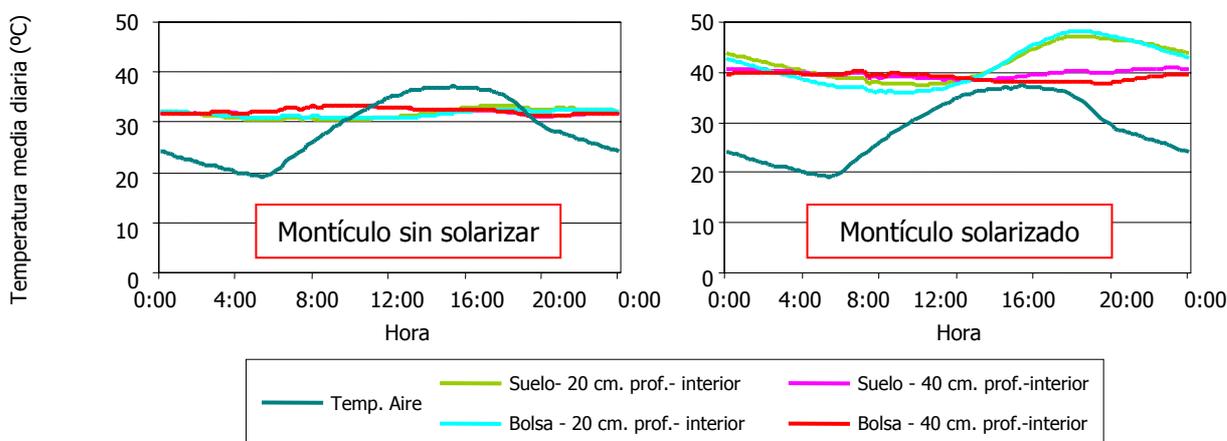
En el experimento del año 2000 la variación de la temperatura fue bastante similar a la observada en el año 1999. La temperatura del aire registró una media diaria de 28,6 °C y varió entre un mínimo de 19,2 °C y un máximo de 37,2 °C (Tabla 4.4). La temperatura registrada en el interior del montículo no solarizado fue superior a la del aire durante todo el día, con excepción del intervalo situado aproximadamente entre las 11:00 y las 18:30 (Fig. 4-6, izq.). A su vez, la temperatura media registrada en el interior del montículo no solarizado fue, en todos los casos, superior a la del aire. El intervalo térmico más amplio (18,0 °C) se verificó para la temperatura del aire. Las estaciones situadas en el interior de los montículos no solarizado registraron amplitudes térmicas mucho más pequeñas (entre

1,9 °C y 3,0 °C). En las estaciones situadas a 20 cm de profundidad las temperaturas mínimas y máximas se alcanzaron con un cierto retraso respecto a la temperatura del aire que fue más acentuado que el registrado en el año 1999. La variación de la temperatura en las estaciones situadas a 40 cm de profundidad volvió a mostrar dos ciclos diarios y un desplazamiento muy marcado en la ocurrencia de las temperaturas extremas.

**Tabla 4.4.** Parámetros térmicos registrados en las estaciones correspondientes a los diferentes tratamientos en la prueba de solarización llevada a cabo en 2000<sup>a</sup>.

Estación	$T_{\text{dia}}^b$	$T_{\text{max}}^c$		$T_{\text{min}}^d$		Intervalo térmico <sup>e</sup>
		Valor	Hora de registro	Valor	Hora de registro	
<b>Air</b>	28,6	37,2	15:20	19,2	5:20	18,0
<b>Nsol-B-20I</b>	31,7	32,7	18:00	30,8	10:30	1,9
<b>Nsol-B-40I</b>	32,3	33,4	8:00	31,2	19:50	2,2
<b>Nsol-S-20I</b>	31,7	33,4	17:40	30,4	5:40	3,0
<b>Nsol-S-40I</b>	32,2	33,2	9:50	31,0	19:50	2,2
<b>Sol-B-20I</b>	41,4	48,2	18:10	35,8	8:20	12,4
<b>Sol-B-40I</b>	39,1	40,3	7:10	37,8	19:30	2,5
<b>Sol-S-20I</b>	42,0	47,2	18:20	37,5	10:30	9,7
<b>Sol-S-40I</b>	39,7	40,9	23:00	38,5	13:10	2,4

<sup>a</sup>Las temperaturas se registraron con sensores térmicos de termopar conectados a una estación portátil de registro continuo. Los parámetros se calcularon en base a una serie de datos constituida por el promedio de las temperaturas registradas diariamente en cada fracción horaria de 10 m durante todo el experimento. <sup>b</sup>Temperatura diaria media ( $T_{\text{dia}} = (\sum_n T_n)/n$ , donde  $n$  es el número total de fracciones horarias consideradas en un día, en este caso  $24 * 6 = 144$ ), <sup>c</sup>Temperatura máxima media diaria. <sup>d</sup>Temperatura mínima media diaria. <sup>e</sup> $T_{\text{max}} - T_{\text{min}}$ .



**Fig. 4.10.** Evolución diaria de las temperaturas registradas en el año 2000 en el interior del montículo sin solarizar (izq.) y en el interior del montículo solarizado (der.).

En el interior del montículo solarizado, la temperatura fue nuevamente superior a la del aire durante todo el día (Fig. 4.10, der.). Al igual que ocurrió en el año 1999, la temperatura media diaria registrada en el interior del montículo solarizado superó en más de 8 °C a las del aire. La máxima temperatura media diaria (42,0 °C) se alcanzó en la estación situada en el interior a 20 cm de profundidad fuera de la bolsita (Sol-S-20I), mientras que la temperatura máxima media más elevada (48,2 °C) se produjo en la misma posición pero en el interior de la bolsita (Sol-B-20I). El intervalo de variación de la temperatura del suelo en el montículo solarizado fue inferior al de la temperatura del aire, pero superior al de la

temperatura del montículo no solarizado. Nuevamente, como en el año 1999, los intervalos térmicos fueron más bajos a 40 cm que a 20 cm. El desplazamiento de la temperatura máxima con respecto a la temperatura del aire no fue, en ningún caso, inferior a las 2:30 horas y otro tanto ocurrió con la temperatura mínima.

#### 4.3.2.2. Evaluación de la viabilidad del inóculo

De forma similar a lo que sucedió en el primer experimento de solarización en 1999, en el experimento del 2000 la viabilidad del inóculo, estimada indirectamente a través de la reproducción del nematodo en el bioensayo en plantas de tomate, disminuyó a medida que aumentó el tiempo de exposición a los tratamientos (Tabla 4.5). Nuevamente pudo comprobarse que el descenso en la viabilidad era mucho más pronunciado en los tratamientos sometidos a solarización.

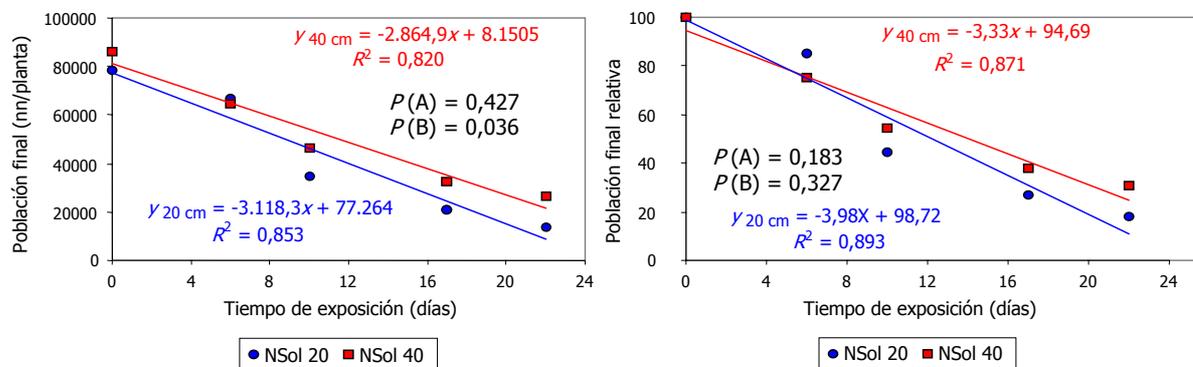
**Tabla 4.5.** Parámetros poblacionales de *M. incognita* obtenidos en el bioensayo efectuado con las muestras extraídas en la prueba de supervivencia del inóculo a la solarización (Año 2000)<sup>a</sup>

Tratamiento	Nº	Población final (nº de nematodos/planta)					Población final relativa (%) <sup>b</sup>			
		0 días	6 días	10 días	17 días	22 días	6 días	10 días	17 días	22 días
Nsol20I	1	78.313,3a	66.656,3a	34.839,7b	21.159,7c	14.046,0d	85,1a <sup>c</sup>	44,5b	27,1c	17,9c
Nsol40I	2	86.072,0a	64.757,3ab	46.592,7b	32.578,0c	26.642,3c	75,2a	54,1b	37,9bc	31,0c
Sol20I	3	59.909,0a	106,3b	233,7bc	42,7bc	94,0c	0,2a	0,4a	0,1a	0,2a
Sol40I	4	63.051,0a	91,0b	23,0bc	1318,0bc	57,0c	0,2a	0,1a	2,2a	0,1a
Contrastes ortogonales <sup>d</sup>										
1 vs. 2		ns <sup>d</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	0,0466	0,0463	0,0018
3 vs. 4		ns	ns	0,0024	0,0377	ns	ns	ns	0,6764	ns
(1-2) vs. (3-4)		ns	<0,0001	-	-	<0,0001	<0,0001	-	-	-
(1-2) vs. 3		ns	- <sup>e</sup>	<0,0001	<0,0001	-	-	-	-	-
(1-2) vs. 4		ns	-	<0,0001	0,0006	-	-	-	-	-
1 vs. (3-4)		ns	-	-	-	-	-	<0,0001	0,0003	0,0002
2 vs. (3-4)		ns	-	-	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001

<sup>a</sup>Los datos son la media de seis repeticiones por tratamiento. El análisis nematológico se efectuó sobre plantas de tomate que servían como bioensayo del efecto de los tratamientos. Las plantas crecieron en macetas que contenían 500 cm<sup>3</sup> del sustrato sometido al tratamiento en el interior de bolsas de nylon de malla fina colocadas en el interior de los montículos. <sup>b</sup>Pfr = [(Nº total de nematodos/planta)<sub>x</sub> / (Nº de total nematodos/planta)<sub>0</sub>] \* 100, donde (Nº de total nematodos/planta)<sub>x</sub> = número total de nematodos por planta en la muestra correspondiente al tiempo de exposición x y (Nº total de nematodos/planta)<sub>0</sub> = número total de nematodos por planta en la muestra correspondiente al tiempo 0. <sup>c</sup>Las medias en una fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente (P = 0,05) según el contraste de la mínima diferencia significativa (LSD) protegida de Fisher. ns = no significativo (P > 0,05). <sup>d</sup>Probabilidad estimada para el estadístico t del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns = no significativo (P > 0,05). <sup>e</sup>Interacción no considerada.

El análisis de la varianza mostró que al inicio del experimento el potencial infectivo de los huevos fue similar en cada uno de los tratamientos (P = 0,140). En los controles no solarizados la profundidad a que se enterraron las bolsas que contenían los huevos no incidió significativamente sobre la población final de nematodos por planta en el bioensayo (P < 0,05). Sin embargo, tras 10 días de solarización la infectividad de las muestras colocadas a 20 cm indicada por la población final de nematodos en el bioensayo fue significativamente

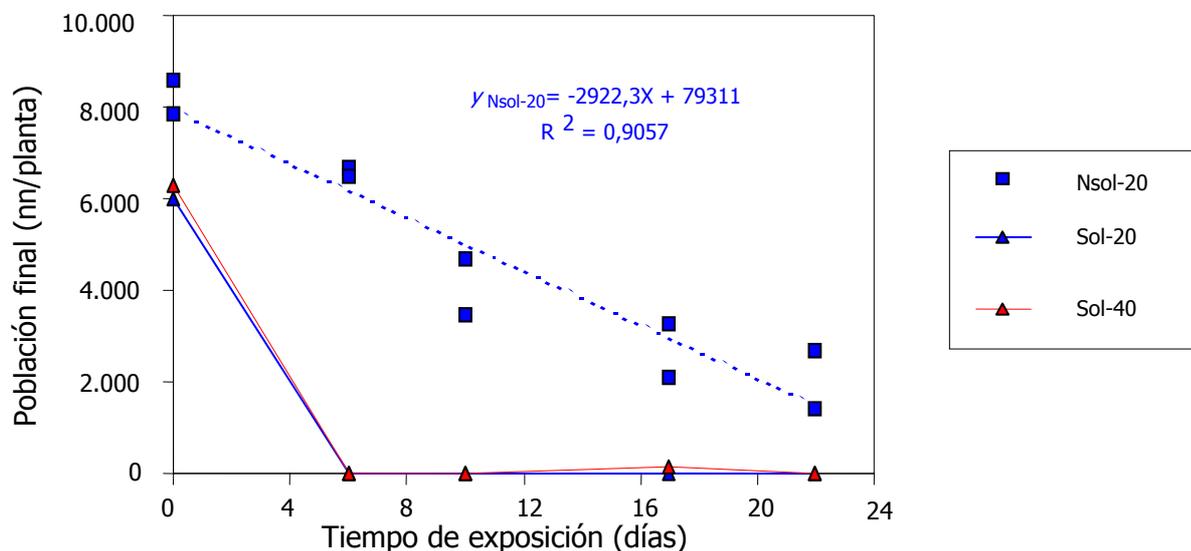
mayor ( $P < 0,05$ ) que la correspondiente a las muestras colocadas a 40 cm (Tabla 4.5). Asimismo, el efecto de la profundidad de enterrado de la muestra resultó también significativo tras 17 de solarización, aunque en este caso la máxima infectividad correspondió a las muestras ubicadas a 40 cm en el interior del montículo. En adelante, por tanto, para el análisis se consideró a las dos profundidades en forma independiente. La profundidad de enterrado del sustrato con los huevos incidió significativamente sobre la infectividad de éstos indicada por la población final relativa media que se alcanzó en todos los muestreos realizados a partir de los 10 días de comenzado el experimento y hasta el final del mismo. Este parámetro fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en las muestras obtenidas en las estaciones situadas a 40 cm comparado con el obtenido en las muestras a 20 cm a los 10, 17 y 22 días. Sin embargo, la comparación de las rectas de regresión (Fig. 4.10) muestra que, considerando el periodo completo de desarrollo del experimento, la profundidad de enterrado no afectó significativamente la tendencia de disminución de infectividad en el tiempo, i.e., los valores de población final relativa en las muestras controles ( $P = 0,183$ , para la comparación de las pendientes de las rectas de regresión y  $P = 0,327$ , para la comparación de sus ordenadas en el origen). La población final absoluta se vio afectada solo en forma parcial, ya que la comparación de las rectas de regresión presenta valores significativos para la comparación de las ordenadas al origen ( $P = 0,036$ ) y no significativos para la comparación de las pendientes ( $P = 0,427$ ).



**Fig. 4.10.** Efecto de la profundidad de enterrado de *M. incognita* en montículos no solarizados sobre su infectividad en tomate indicada por la población del nematodo alcanzada en el bioensayo (Año 2000): Regresión lineal sobre el tiempo de la población final relativa (der.). Se indica en cada uno de los gráficos la probabilidad del estadístico "F" para la comparación de las pendientes de las rectas ( $P(A)$ ) y para la comparación de las ordenadas en el origen ( $P(B)$ ).

El efecto de la solarización sobre los dos parámetros considerados resultó significativo en todos los contrastes analizados y para todas las fechas de muestreo a partir de los 6 días del comienzo del experimento. En todos los casos, las poblaciones medias finales absoluta y relativa correspondientes al tratamiento solarizado, i.e., la infectividad de los huevos tras la solarización, fueron significativamente más bajas ( $P < 0,05$ ) que las del correspondiente control sin solarizar.

La comparación de los parámetros de las rectas de regresión de la población final de nematodos sobre el tiempo de solarización demostró que la profundidad de enterrado en el montículo no incidió significativamente sobre la tendencia de reducción de infectividad del inóculo en el tiempo en los controles sin solarizar. Esto nos permite mostrar, en un resumen de los resultados, las dos profundidades dentro de los controles en forma conjunta (Fig. 4.11).



**Fig. 4.11.** Efecto de la solarización y la profundidad de enterrado (20 cm vs. 40 cm) de huevos de *M. incognita* en el interior de montículos de sustratos viverísticos sobre su infectividad en plantas de tomate indicada por la población final de nematodos alcanzada.

### 4.3.3. EFECTO PROTECTOR DE LA MICORRIZACIÓN CONTRA LA PATOGENICIDAD DE NEMATODOS SOBRE EL OLIVO: PRIMER EXPERIMENTO

#### 4.3.3.1. Influencia sobre los parámetros de crecimiento de la planta

##### 4.3.3.1.1. Cultivar Arbequina

Las plantas control no inoculadas pero micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* (micorriza C, tratamiento 3) alcanzaron los valores máximos en todos los parámetros de crecimiento considerados (Tabla 4.6). El crecimiento relativo en este tratamiento fue de 431,8 %, 276,6% y 173,5 % en la altura del tallo, el diámetro del tallo y el número de nudos, respectivamente, mientras que el peso fresco final alcanzó 4,1 g en la parte aérea y 3,8 g en la raíz. En cambio, los valores mínimos de dichos parámetros de crecimiento se alcanzaron en plantas inoculadas con *P. vulnus* (Tabla 4.6). Las plantas micorrizadas con *G. mossae* (micorriza M) e inoculadas con *P. vulnus* (tratamiento 10) presentaron el crecimiento relativo más bajo de la altura del tallo (23,0 %) y el valor mínimos del peso fresco final de la parte aérea (0,7 g) y de la raíz (0,9 g). El crecimiento relativo más bajo del diámetro del tronco (120,8 %) se obtuvo en plantas micorrizadas con *G. intraradices* e inoculadas con *P. vulnus* (tratamiento 7), mientras que el mínimo crecimiento relativo del número de nudos

(27,6 %), tuvo lugar en plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* e inoculadas con *P. vulnus* (tratamiento 4) (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6.** Influencia de la micorrización de plántulas de olivo 'Arbequina' con *Glomus intraradices* (E), *G. mosseae* (M) o *G. intraradices* + *G. fasciculatum* (C) sobre las infecciones de raíces por *P. vulnus* y *M. incognita*<sup>a</sup>

Nº Tratamiento	Especie micorriza <sup>b</sup>	Especie nematodo	Crec. relativo altura tallo <sup>c</sup>	Crec. relativo diámetro del tallo <sup>d</sup>	Incremento relativo número de nudos <sup>e</sup>	Peso fresco parte aérea (g)	Peso fresco raíz (g)
0	0	0	1,47	2,37	0,82	1,42	2,24
1	0	<i>P. vulnus</i>	0,60	1,53	0,36	0,94	1,32
2	0	<i>M. incognita</i>	1,27	1,40	0,64	1,35	2,51
Contrastes ortogonales <sup>f</sup>							
0 vs.(1-2)			ns <sup>g</sup>	0,0055	ns	ns	ns
0 vs. 1			ns	0,0243	ns	ns	0,0272
0 vs. 2			ns	0,0099	ns	ns	ns
3	C	0	4,32	2,77	1,74	4,07	3,83
4	C	<i>P. vulnus</i>	0,51	1,53	0,28	0,75	0,88
5	C	<i>M. incognita</i>	3,67	2,70	1,53	3,13	3,10
Contrastes ortogonales							
0 vs. 3			0,0001	ns	0,0045	0,0000	0,0002
1 vs. 4			ns	ns	ns	ns	ns
2 vs. 5			0,0009	0,0006	0,0056	0,0002	ns
3 vs. (4-5)			0,0004	0,0448	0,0028	<0,0001	<0,0001
3 vs. 4			<0,0001	0,0011	<0,0001	<0,0001	<0,0001
3 vs. 5			ns	ns	ns	0,0449	ns
6	E	0	4,12	2,39	1,42	3,05	2,63
7	E	<i>P. vulnus</i>	0,58	1,21	0,40	0,70	1,25
8	E	<i>M. incognita</i>	3,75	2,11	1,69	3,69	3,68
Contrastes ortogonales							
0 vs. 6			0,0003	ns	ns	0,0006	ns
1 vs. 7			ns	ns	ns	ns	ns
2 vs. 8			0,0006	ns	0,0012	0,0000	0,0052
6 vs. (7-8)			0,0017	0,0232	0,1744	0,0348	ns
6 vs. 7			<0,0001	0,0018	0,0016	<0,0001	0,0011
6 vs. 8			ns	ns	ns	ns	0,0118
9	M	0	2,27	2,45	1,18	1,79	1,82
10	M	<i>P. vulnus</i>	0,23	1,58	0,53	0,68	0,85
11	M	<i>M. incognita</i>	2,34	2,58	1,16	2,59	3,37
Contrastes ortogonales							
0 vs. 9			ns	ns	ns	ns	ns
1 vs. 10			ns	ns	ns	ns	ns
2 vs. 11			ns	0,0020	ns	0,0084	0,0382
9 vs. (10-11)			ns	ns	ns	ns	ns
9 vs. 10			0,0043	0,0202	0,0404	ns	0,0195
9 vs. 11			ns	ns	ns	0,0184	0,0003
Contrastes ortogonales globales							
0 vs. (3,6,9)			0,0004	ns	0,0172	0,0001	ns
1 vs. (4,7,10)			ns	ns	ns	ns	ns
2 vs. (5,8,11)			0,0008	0,0007	0,0019	0,0000	0,0104
(0-2) vs. (3-11)			0,0001	0,0321	0,0012	<0,0001	ns
(0-2) vs. (3-5)			0,0000	0,0093	0,0021	<0,0001	0,0156
(0-2) vs. (6-8)			0,0001	ns	0,0025	<0,0001	0,0385
(0-2) vs. (9-11)			ns	0,0438	ns	ns	ns

<sup>a</sup>Los datos corresponden a la media de 10 plantas por tratamiento, y se determinaron 100 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 2.000 nematodos/planta de *P. vulnus* y 10.000 huevos+/J<sub>2</sub>/planta de *M. incognita*. Los plántulas crecieron en macetas de arcilla (0,5 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1 °C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a 365 ± 20 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>0 = plántulas no micorrizadas; C = plántulas micorrizadas con una mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*; E = plántulas micorrizadas con *G. intraradices*; M = plántulas micorrizadas con *G. mosseae*. <sup>c</sup>Crecimiento relativo de la altura del tallo = (altura del tallo final - altura del tallo inicial)/altura del tallo inicial. <sup>d</sup>Crecimiento Relativo del diámetro del tallo = (diámetro del tallo final - diámetro del tallo inicial)/ diámetro del tallo inicial. <sup>e</sup>Incremento Relativo del número de nudos = (número de nudos final-número de nudos inicial)/ número de nudos inicial. <sup>f</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad. <sup>g</sup>ns = no significativo (*P* > 0,05).

La infección por *P. vulnus* y *M. incognita* del sistema radical de plantones de 'Arbequina' no micorrizados redujo significativamente ( $P < 0,05$ ) el crecimiento relativo del diámetro del tallo (Tabla 4.6). Por otra parte, el peso fresco final de la raíz de los controles sin inocular fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que el de los controles inoculados con *P. vulnus*.

La micorrización con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* (micorriza C) (tratamiento 3) incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) el crecimiento relativo de la altura del tallo, del número de nudos y del peso fresco de parte aérea y de raíz, respecto de las plantas control no micorrizadas (Tabla 4.6). A su vez, las plantas infectadas con *M. incognita* y micorrizadas con la micorriza C (tratamiento 5) superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a las infectadas con el mismo nematodo y no micorrizadas (tratamiento 2) en todos los parámetros de crecimiento con excepción del peso fresco de la raíz. Por el contrario, la micorrización con la micorriza C no contrarrestó significativamente ( $P > 0,05$ ) la reducción de crecimiento que originó la inoculación con *P. vulnus*. El efecto de la inoculación sobre los plantones micorrizados con la micorriza C resultó significativo ( $P < 0,05$ ) para todos los parámetros de crecimiento considerados. Los plantones sin inocular (tratamiento 3) superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a los plantones inoculados con *P. vulnus* y *M. incognita* tomados globalmente en todos los parámetros considerados. Asimismo, los plantones sin inocular superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) en todos los parámetros considerados a los plantones inoculados con *P. vulnus* (tratamiento 4). No se observó, en cambio, ninguna diferencia significativa entre las plantas micorrizadas e inoculadas con *M. incognita* y las micorrizadas sin inocular, salvo para el peso fresco de la parte aérea, que fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en los controles que en las plantas inoculadas con *M. incognita*.

La micorrización con *G. intraradices* (micorriza E) contrarrestó significativamente ( $P < 0,05$ ) el perjuicio resultante de la infección de la planta por *M. incognita*, de manera que el crecimiento relativo del diámetro del tallo, el peso fresco de la parte aérea y de la raíz de las plantas micorrizadas e inoculadas con el nematodo superaron a las correspondientes en plantas inoculadas pero no micorrizadas (Tabla 4.6). Por el contrario no se detectó efecto significativo ( $P > 0,05$ ) de la micorrización con esta micorriza sobre el crecimiento de las plantas controles ni de las plantas que fueron inoculadas con *P. vulnus*. Los contrastes ortogonales mostraron que las plantas controles micorrizadas superaban significativamente ( $P < 0,05$ ) a las plantas inoculadas con *P. vulnus* y *M. incognita* en el crecimiento relativo de la altura del tallo, crecimiento relativo del diámetro del tallo y peso fresco de la parte aérea. Asimismo, dichos controles superaron significativamente a las plantas inoculadas con *P. vulnus* en todos los parámetros de crecimiento que se consideraron ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, con

respecto a las plantas inoculadas con *M. incognita* sólo se observó un efecto significativo de la inoculación sobre el peso fresco final de las raíces, que fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en las plantas inoculadas con *M. incognita* que en las plantas control no inoculadas.

Las plantas micorrizadas con *G. mossae* (micorriza M) e inoculadas con *M. incognita* (tratamiento 11) presentaron valores de crecimiento relativo del diámetro del tallo, peso fresco de parte aérea y de raíz significativamente más altos ( $P < 0,05$ ) que los que se registraron en las plantas no micorrizadas e infectadas por estos mismos nematodos (Tabla 4.6). Sin embargo, no se observó efecto significativo de la micorrización con esta micorriza sobre el crecimiento de las plantas control ni de las plantas inoculadas con *P. vulnus* ( $P > 0,05$ ). No obstante, las plantas inoculadas con *P. vulnus* mostraron valores de crecimiento relativo significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) a los controles no inoculados, excepto en el peso de la parte aérea. La inoculación con *M. incognita*, no tuvo efecto significativo ( $P > 0,05$ ) sobre ninguno de los parámetros de crecimiento, con excepción del peso fresco de la parte aérea y de la raíz que resultaron significativamente mayores ( $P < 0,05$ ) en las plantas inoculadas que en las controles sin inocular.

Los contrastes ortogonales generales mostraron que los controles micorrizados considerados globalmente (tratamientos (3,6,9)) superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a los controles sin micorrizar (tratamiento 0) en el crecimiento relativo de la altura del tallo, el incremento relativo del número de nudos y el peso fresco de la parte aérea (Tabla 4.6). No existieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), en cambio, entre las plantas micorrizadas e inoculadas con *P. vulnus* y las micorrizadas sin inocular. Las plantas micorrizadas e inoculadas con *M. incognita* (tratamiento 2), en cambio, superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a las inoculadas con este mismo nematodo y no micorrizadas en todos los parámetros considerados (tratamientos (5,8,11)). Del mismo modo, las plantas micorrizadas consideradas en forma conjunta (tratamientos 3-11) presentaron valores significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) a los controles sin micorrizar (tratamientos 0-2). Las plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* (micorriza C, tratamientos 3-5) superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a los controles sin micorrizar (tratamientos 0-2) en todos los parámetros. Algo similar ocurrió con las plantas micorrizadas con *G. intraradices* (micorriza E, tratamientos 6-8) que, con la única excepción del crecimiento relativo del diámetro del tallo, superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a los controles no micorrizados en todos los parámetros de crecimiento considerados. En cambio, las plantas micorrizadas con *G. mosseae* (micorriza M) consideradas de forma global sólo presentaron diferencias significativas de crecimiento con respecto a los controles en el crecimiento relativo del diámetro del tallo, que fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en las plantas micorrizadas que en las no micorrizadas.

#### 4.3.3.1.2. Cultivar Picual

De manera similar a lo que ocurrió en 'Arbequina', en 'Picual', las plantas control sin inocular micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* (micorriza C, tratamiento 3) mostraron los valores máximos en la mayoría de los parámetros de crecimiento: crecimiento relativo de la altura del tallo (739,8 %), incremento relativo del número de nudos (326,1 %) y peso fresco final de la parte aérea (6,5 g) (Tabla 4.7). Las plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* (micorriza C) e inoculadas con *M. incognita* (tratamiento 5) presentaron los valores máximos en el incremento relativo del número de nudos (340,5 %) y en el peso fresco final de la raíz (6,5 g). Los valores mínimos de todos estos parámetros de crecimiento se encontraron en plantas inoculadas con *P. vulnus* (Tabla 4.7). El incremento relativo más bajo del diámetro del tallo (138,2 %) tuvo lugar en plantas control *no micorrizadas* e inoculadas con *P. vulnus* (tratamiento 1). Los valores más bajos en el incremento relativo de la altura del tallo (7,6 %), el incremento relativo del número de nudos (17,3 %), el peso fresco final de la parte aérea (0,7 g) y el peso fresco final de las raíces (1,6 g), ocurrieron en plantas micorrizadas con *G. mossae* (micorriza M) e inoculadas con *P. vulnus* (tratamiento 10).

Entre las plantas no micorrizadas, los contrastes ortogonales indicaron que la inoculación sólo presentó efecto significativo sobre dos de los parámetros considerados: el crecimiento relativo del diámetro del tallo y el incremento relativo del número de nudos. Las plantas control sin inocular presentaron en estos parámetros valores significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) a los producidos en las plantas inoculadas con *P. vulnus* y/o *M. incognita* (Tabla 4.7).

Las plantas control micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* (micorriza C) superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a los controles no micorrizados en el crecimiento relativo de altura del tallo, el incremento relativo del número de nudos y el peso fresco de la parte aérea y de la raíz (Tabla 4.7). Por su parte, las plantas inoculadas con *P. vulnus* y micorrizadas con micorriza C (tratamiento 4) superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a las inoculadas sin micorrizar (tratamiento 1) en todos los parámetros considerados. Lo mismo ocurrió en todos los casos con las plantas inoculadas con *M. incognita* ( $P < 0,05$ ). En el grupo de plantas micorrizadas observamos que el crecimiento relativo de la altura del tallo y el incremento relativo del número de nudos resultaron significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en los controles respecto de las plantas inoculadas con *P. vulnus* y/o *M. incognita*. El peso fresco final de las raíces, en cambio, fue significativamente superior ( $P > 0,05$ ) en las plantas inoculadas con *M. incognita* que en los controles sin inocular.

**Tabla 4.7.** Influencia de la micorrización de plantones de olivo 'Picual' con *Glomus intraradices* (E), *G. mosseae* (M) o *G. intraradices* + *G. fasciculatum* (C) sobre las infecciones de raíces por *P. vulnus* y *M. incognita*<sup>a</sup>

Nº Tratamiento	Especie micorriza <sup>b</sup>	Especie nematodo	Crec. relativo altura tallo <sup>c</sup>	Crec. relativo diámetro tallo <sup>d</sup>	Crec. relativo número de nudos <sup>e</sup>	Peso fresco parte aérea (g)	Peso fresco raíz (g)
0	0	0	1,63	2,51	1,57	1,85	2,67
1	0	<i>P. vulnus</i>	0,30	1,38	0,38	1,29	2,46
2	0	<i>M. incognita</i>	1,10	1,59	0,96	2,28	3,61
Contrastes ortogonales <sup>f</sup>							
0 vs, (1-2)			ns <sup>g</sup>	0,0044	0,0008	ns	ns
0 vs, 1			ns	0,0065	0,0001	ns	ns
0 vs, 2			ns	0,0254	0,0445	ns	ns
3	C	0	7,40	3,22	3,26	6,52	5,42
4	C	<i>P. vulnus</i>	3,23	3,33	2,17	6,03	5,72
5	C	<i>M. incognita</i>	3,58	3,40	2,39	5,85	6,54
Contrastes ortogonales							
0 vs, 3			<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1 vs, 4			0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2 vs, 5			0,0011	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
3 vs, (4-5)			<0,001	ns	0,0003	ns	ns
3 vs, 4			<0,001	ns	0,0004	ns	ns
4 vs, 5			<0,001	ns	0,0047	ns	0,0393
6	E	0	0,81	1,99	0,99	1,21	1,93
7	E	<i>P. vulnus</i>	0,19	1,67	0,24	0,95	2,41
8	E	<i>M. incognita</i>	1,10	1,99	0,84	1,45	2,64
Contrastes ortogonales							
0 vs, 6			ns	ns	ns	ns	ns
1 vs, 7			ns	ns	ns	ns	ns
2 vs, 8			ns	ns	ns	ns	ns
6 vs, (7-8)			ns	ns	ns	ns	ns
6 vs, 7			ns	ns	0,0143	ns	ns
6 vs, 8			ns	ns	ns	ns	ns
9	M	0	1,88	2,45	1,63	2,95	2,76
10	M	<i>P. vulnus</i>	0,07	1,47	0,17	0,74	1,56
11	M	<i>M. incognita</i>	0,55	2,34	0,71	1,15	2,32
Contrastes ortogonales							
0 vs, 9			ns	ns	ns	ns	ns
1 vs, 10			ns	ns	ns	ns	ns
2 vs, 11			ns	ns	ns	ns	0,0180
9 vs, (10-11)			0,0163	0,0175	<0,0001	0,0004	ns
9 vs, 10			0,0165	0,0175	<0,0001	0,0007	0,0275
9 vs, 11			ns	ns	0,0028	0,0054	ns
Contrastes ortogonales							
0 vs, (3,6,9)			0,0051	ns	ns	0,0013	ns
1 vs, (4,7,10)			ns	0,0211	0,0547	0,0146	ns
2 vs, (5,8,11)			ns	0,0036	ns	ns	ns
(0-2) vs, (3-11)			0,0025	ns	0,0049	0,0001	0,0277
(0-2) vs, (3-5)			<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
(0-2) vs, (6-8)			ns	ns	ns	ns	ns
(0-2) vs, (9-11)			ns	ns	ns	ns	0,0259

<sup>a</sup>Los datos son la media de 10 plantas por tratamiento, y se determinaron 100 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 2.000 nematodos/planta de *P. vulnus* y 10.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *M. incognita*. Los plantones crecieron en macetas de arcilla (0,5 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1 °C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a 365 ± 20 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>0 = plantones no micorrizados; C = plantones micorrizados con una mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*; E = plantones micorrizados con *G. intraradices*; M = plantones micorrizados con *G. mosseae*. <sup>c</sup>Crecimiento Relativo de la altura del tallo = (altura del tallo final - altura del tallo inicial)/altura del tallo inicial. <sup>d</sup>Crecimiento Relativo del diámetro del tallo = (diámetro del tallo final - diámetro del tallo inicial)/ diámetro del tallo inicial. <sup>e</sup>Incremento Relativo del número de nudos = (número de nudos final-número de nudos inicial)/ número de nudos inicial. <sup>f</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad. <sup>g</sup> ns = no significativo (*P* > 0,05).

No se observaron diferencias significativas (*P* > 0,05) en los parámetros de crecimiento entre ninguna de las plantas control micorrizadas con *G. intraradices* (micorriza

E) y las correspondientes no micorrizadas, ya fueran éstas no inoculadas, inoculadas con *P. vulnus* o inoculadas con *M. incognita* (Tabla 4.7). Dentro del grupo de las plantas micorrizadas no se detectaron diferencias significativas entre las plantas control y las inoculadas con *P. vulnus* y *M. incognita*, en ninguno de los parámetros de crecimiento evaluados, excepto en el incremento relativo del número de nudos, que fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en las plantas control no inoculadas que en las plantas inoculadas con *P. vulnus*.

El único contraste que indicó efecto significativo en la comparación entre las plantas control micorrizadas con *G. mossae* (micorriza M) y los respectivos controles no micorrizados fue el que comparó el peso fresco de las raíces en las plantas inoculadas con *M. incognita*: en este caso el parámetro fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en las plantas no micorrizadas que en las que lo fueron (Tabla 4.7). Dentro de las plantas micorrizadas pudo comprobarse que los controles presentaron valores de crecimiento relativo significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) al de las plantas inoculadas con *P. vulnus* y *M. incognita*, en todos los parámetros de crecimiento relativo, excepto en el peso fresco de la raíz. En forma similar, las plantas control presentaron crecimiento relativo significativamente superior ( $P < 0,05$ ) al de las plantas inoculadas con *P. vulnus* en todos los parámetros considerados. Las plantas control no inoculadas presentaron valores significativamente más altos ( $P < 0,05$ ) que las plantas inoculadas con *M. incognita* en el incremento relativo de número de nudos y peso fresco final de la parte aérea.

Las plantas control micorrizadas consideradas globalmente (tratamientos (3,6,9)) superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a las no micorrizadas (tratamiento 0) en el crecimiento relativo de la altura del tallo y en el peso fresco de la parte aérea (Tabla 4.7). A su vez, las plantas inoculadas con *P. vulnus* y micorrizadas (tratamientos (4,7,10)) superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a las inoculadas con ese mismo nematodo y no micorrizadas (tratamiento 1) en el crecimiento relativo del diámetro del tallo, el incremento relativo del diámetro del tallo y el peso fresco de la parte aérea. Las plantas no micorrizadas inoculadas con *M. incognita* (tratamiento 2) presentaron un crecimiento relativo del diámetro del tallo significativamente más bajo ( $P < 0,05$ ) que las plantas micorrizadas inoculadas con ese mismo nematodo (tratamientos 5,8,11). Las plantas micorrizadas consideradas globalmente (tratamientos 3-11) presentaron un crecimiento significativamente más alto ( $P < 0,05$ ) que los controles no micorrizadas (tratamientos 0-2) en todos los parámetros de crecimiento considerados, a excepción del crecimiento del diámetro del tallo (Tabla 4.7). Asimismo, las plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* (micorriza C. tratamientos 3-5) crecieron significativamente más ( $P < 0,05$ ) que las plantas sin micorrizar (tratamientos 0-2) en todos los parámetros evaluados (Tabla 4.7). Por el contrario, en las

plantas micorrizadas con *G. intraradices* (micorriza E, tratamientos 6-8) ninguno de los parámetros de crecimiento presentó diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) con respecto a los registrados en las plantas no micorrizadas (tratamientos 0-2). Finalmente, las plantas micorrizadas con *G. mossae* (micorriza M, tratamientos 9-11) tampoco mostraron diferencias de crecimiento en ninguno de los parámetros considerados, a excepción del peso fresco de la raíz que fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en las plantas control que en las micorrizadas.

#### **4.3.3.2. Reproducción de los nematodos**

##### **4.3.3.2.1. Cultivar Arbequina**

La densidad de población de *P. vulnus* por cada 100 cm<sup>3</sup> de suelo osciló entre un mínimo de 77,6, en las plantas control no micorrizadas, y un máximo de 161,6 en las plantas micorrizadas con *G. intraradices* (micorriza E). El análisis de la varianza mostró que no existieron diferencias significativas debidas a la micorrización entre las plantas inoculadas con *P. vulnus* ( $P = 0,136$ ). Entre las plantas inoculadas con *M. incognita*, la densidad de población por cada 100 cm<sup>3</sup> de suelo osciló entre un mínimo de 34,2, para el control no micorrizado, y un máximo de 53,3 para las plantas micorrizadas con *G. mossae* (micorriza M). Del mismo modo, el análisis de la varianza mostró que no hubo efecto significativo de la micorrización sobre la densidad de *M. incognita* en el suelo ( $P = 0,133$ ).

La densidad de población de *P. vulnus* en la raíz varió entre un mínimo de 2.228,7 nematodos por g de raíz (en las plantas micorrizadas con *G. intraradices*), y un máximo de 3.736,8 nematodos/g de raíz (en las plantas control no micorrizadas). La densidad de población de *M. incognita* en la raíz, osciló entre 4.180,2 nematodos/g de raíz (en las plantas micorrizadas con *G. intraradices*), y 6.032,0 nematodos/g de raíz (en las plantas control no micorrizadas). El análisis de la varianza mostró que la micorrización no afectó significativamente la población nematodos en la raíz en las plantas inoculadas con *P. vulnus* ( $P = 0,565$ ), ni en las plantas inoculadas con *M. incognita* ( $P = 0,089$ ).

La población final de *P. vulnus* en plantas inoculadas osciló entre 2.565,7 nematodos por planta (en los controles no micorrizados), y 3.265,3 nematodos por planta (en las plantas micorrizadas con *G. intraradices*). Las plantas inoculadas con *M. incognita* registraron una población final que fluctuó entre 14.287,7 nematodos por planta (en los controles sin micorrizar) y 16399,0 nematodos por planta (en las plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*). El análisis de varianza indicó que la micorrización no tuvo un efecto significativo sobre la población final en plantas inoculadas con *P. vulnus* ( $P = 0,052$ ) ni en plantas inoculadas con *M. incognita* ( $P = 0,169$ ).

Los valores medios de la tasa de reproducción de nematodos oscilaron entre un mínimo de 1,28 (en plantas no micorrizadas inoculadas con *P. vulnus*), y un máximo de 1,64 (en plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* e inoculadas con *M. incognita*). Las plantas no micorrizadas inoculadas con *P. vulnus* presentaron una tasa de reproducción significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) a la que registraron las plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* e inoculadas con *P. vulnus*, las plantas micorrizadas con *G. intraradices* e inoculadas con *P. vulnus* y las plantas micorrizadas consideradas globalmente e inoculadas con *P. vulnus* (Tabla 4.8).

**Tabla 4.8.** Reproducción de *P. vulnus* y *M. incognita* en plántones de olivo cv. Arbequina micorrizados con *Glomus intraradices* (E), *G. mosseae* (M) o *G. intraradices* + *G. fasciculatum* (C) y no micorrizados<sup>a</sup>

Nº Tratamiento	Especie Micorriza <sup>b</sup>	Especie nematodo	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo	Nematodos/ g raíz	Pf <sup>c</sup> (nematodos/planta)	Rf (Pf/Pi) <sup>d</sup>
1	0	<i>P. vulnus</i>	77,6 ± 47,1	3.736,8 ± 3.660,1	2.565,7 ± 621,1	1,28
4	C	<i>P. vulnus</i>	78,7 ± 57,0	3.298,3 ± 1.060,1	3.044,8 ± 299,3	1,52
7	E	<i>P. vulnus</i>	161,6 ± 123,9	2.228,7 ± 905,1	3.265,3 ± 667,6	1,63
10	M	<i>P. vulnus</i>	88,3 ± 74,9	3.247,4 ± 1.300,3	2.825,7 ± 572,6	1,41
2	0	<i>M. incognita</i>	34,2 ± 28,0	6.032,0 ± 1.721,2	14.282,7 ± 2.202,9	1,43
5	C	<i>M. incognita</i>	52,2 ± 31,2	5.711,5 ± 2.699,6	16.399,0 ± 1.902,2	1,64
8	E	<i>M. incognita</i>	46,4 ± 41,3	4.180,2 ± 6.22,4	15.590,0 ± 1.630,5	1,56
11	M	<i>M. incognita</i>	53,3 ± 18,9	4.938,9 ± 1.831,0	15.354,0 ± 2.347,8	1,54

Contrastes ortogonales <sup>e</sup>						
1 vs. 4			ns <sup>f</sup>	ns	ns	0,0179
1 vs. 7			ns	ns	ns	0,0016
1 vs. 10			ns	ns	ns	ns
1 vs. (4,7,10)			ns	ns	ns	0,0055
4 vs. (7,10)			ns	ns	ns	ns
7 vs. (4,10)			ns	ns	ns	ns
10 vs. (4,7)			ns	ns	ns	ns
2 vs. 5			ns	ns	ns	ns
2 vs. 8			ns	ns	ns	ns
2 vs. 11			ns	ns	ns	ns
2 vs. (5,8,11)			ns	ns	ns	ns
5 vs. (8,11)			ns	ns	ns	ns
8 vs. (5,11)			ns	ns	ns	ns
11 vs. (5,8)			ns	ns	ns	ns

<sup>a</sup>Los datos son la media de 10 plantas por tratamiento, y se determinaron 100 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 2.000 nematodos/planta de *P. vulnus*, y 10.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *M. incognita*. Los plántones crecieron en macetas de arcilla (0,5 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1 °C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a 365 ± 20 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> 0 = plántones no micorrizados; C = plántones micorrizados con una mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*; E = plántones micorrizados con *G. intraradices*; M = plántones micorrizados con *G. mosseae*. <sup>c</sup> Población final total de nematodos en suelo y en raíz. <sup>d</sup> Tasa de reproducción (población final/población inicial) <sup>e</sup> Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns = no significativo ( $P > 0,05$ ). <sup>f</sup> ns = no significativo ( $P > 0,05$ ).

#### 4.3.3.2.1. Cultivar Picual

La densidad de población de *P. vulnus* en suelo varió entre un mínimo de 36,9

nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo en plantas micorrizadas con la micorriza C (mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*), y un máximo de 134,7 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo, en plantas control no micorrizadas (Tabla 4.9). El análisis de la varianza mostró que la micorrización no influyó significativamente sobre la densidad de población del nematodo en suelo en las plantas inoculadas con *P. vulnus* ( $P = 0,807$ ). Entre las plantas inoculadas con *M. incognita*, la densidad de población del nematodo mínima en suelo fue de 28,2 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo (plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*), mientras que el máximo (53,8 nematodos/100 cm<sup>3</sup> de suelo) se registró en plantas control no micorrizadas. Al igual que ocurrió con las plantas inoculadas con *P. vulnus*, el análisis de varianza mostró que la micorrización no influyó significativamente sobre la densidad de población de *M. incognita* en suelo ( $P = 0,061$ ).

**Tabla 4.9.** Reproducción de *P. vulnus* y *M. incognita* en plántones de olivo cv. Picual micorrizados con *Glomus intraradices* (E), *G. mosseae* (M) o *G. intraradices* + *G. fasciculatum* (C) y no micorrizados<sup>a</sup>

Nº Tratamiento	Especie Micorriza <sup>b</sup>	Especie nematodo	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo	Nematodos/ g raíz	Pf <sup>c</sup> (nematodos/ planta)	Rf (Pf/Pi) <sup>d</sup>
1	0	<i>P. vulnus</i>	134,7 ± 243,7	1022,7 ± 590,5	2.605,3 ± 1.249,9	1,30
4	C	<i>P. vulnus</i>	36,9 ± 28,0	436,2 ± 121,31	2.536,6 ± 303,4	1,27
7	E	<i>P. vulnus</i>	44,8 ± 35,0	1039,0 ± 254,6	2.587,9 ± 279,9	1,29
10	M	<i>P. vulnus</i>	41,5 ± 46,9	1717,4 ± 926,4	2.437,5 ± 375,1	1,22
2	0	<i>M. incognita</i>	53,8 ± 31,2	4434,1 ± 1797,1	14.380,8 ± 2.199,6	1,44
5	C	<i>M. incognita</i>	28,2 ± 12,6	2527,8 ± 755,2	15.664,3 ± 1.778,5	1,57
8	E	<i>M. incognita</i>	55,1 ± 37,0	6040,8 ± 2002,2	15.009,2 ± 1.500,6	1,50
11	M	<i>M. incognita</i>	37,1 ± 26,0	7061,1 ± 3152,9	14.697,2 ± 2.157,8	1,47

Contrastes ortogonales <sup>e</sup>						
1 vs. 4			ns <sup>f</sup>	0,0006	ns	ns
1 vs. 7			ns	ns	ns	ns
1 vs. 10			ns	0,0068	ns	ns
1 vs. (4,7,10)			ns	ns	ns	ns
4 vs. (7,10)			ns	<0,0001	ns	ns
7 vs. (4,10)			ns	ns	ns	ns
10 vs. (4,7)			ns	<0,0001	ns	ns
2 vs. 5			ns	0,0024	ns	ns
2 vs. 8			ns	0,0432	ns	ns
2 vs. 11			ns	0,0072	ns	ns
2 vs. (5,8,11)			ns	ns	ns	ns
5 vs. (8,11)			ns	<0,0001	ns	ns
8 vs. (5,11)			ns	0,0115	ns	ns
11 vs. (5,8)			ns	0,0003	ns	ns

<sup>a</sup>Los datos son la media de 10 plantas por tratamiento, y se determinaron 100 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 2.000 nematodos/planta de *P. vulnus*, y 10.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *M. incognita*. Los plántones crecieron en macetas de arcilla (0,5 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1 °C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a 365 ± 20 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> 0 = plántones no micorrizados; C = plántones micorrizados con una mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*; E = plántones micorrizados con *G. intraradices*; M = plántones micorrizados con *G. mosseae*. <sup>c</sup> Población final total de nematodos en suelo y en raíz. <sup>d</sup> Tasa de reproducción (población final/población inicial) <sup>e</sup> Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; ns = no significativo ( $P > 0,05$ ). <sup>f</sup> ns = no significativo ( $P > 0,05$ ).

La densidad de población de *P. vulnus* en la raíz de las plantas osciló entre 463,2/g de raíz en las plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*, y 1.714,4/g de raíz en las micorrizadas con *G. intraradices*. La densidad de población de *P. vulnus* en la raíz de las plantas control no micorrizadas fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) a la registrada en plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* y significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) a la que se produjo en plantas micorrizadas con *G. intraradices*. A su vez, el número de nematodos por gramo de raíz en las plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) al registrado en el resto de las plantas micorrizadas consideradas globalmente. Entre las plantas inoculadas con *M. incognita*, la densidad de población en la raíz osciló entre 2.527,8/g de raíz en plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*, y 7.061,1/g de raíz en plantas micorrizadas con *G. mossae*. Las plantas control no micorrizadas presentaron una densidad de población en la raíz significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) a la registrada en las plantas micorrizadas con *G. mossae* y en las micorrizadas con *G. mossae*. Sin embargo, las plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* presentaron una densidad de población en la raíz significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) que la registrada en plantas no micorrizadas (Tabla 4.9).

La población final de nematodos en plantas inoculadas con *P. vulnus* osciló entre un mínimo de 2.437,5 nematodos por planta en plantas micorrizadas con *G. mossae* y un máximo de 2.605,3 nematodos por planta en plantas control no micorrizadas. No existieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) para este parámetro entre los tratamientos de micorrización en plantas inoculadas con este nematodo. En las plantas inoculadas con *M. incognita*, la población final osciló entre 14.380,8 nematodos por planta en las plantas control sin inocular y 15.664,3 nematodos por planta en las plantas inoculadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*. Asimismo, tampoco en este caso existieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los diferentes tratamientos de micorrización (Tabla 4.9).

La tasa media de reproducción de los nematodos de estudio registró un valor mínimo de 1,22 en plantas micorrizadas con *G. mossae* e inoculadas con *P. vulnus*, y un máximo de 1,57 en plantas inoculadas con *M. incognita* y micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* (Tabla 4.9). Si bien el análisis de la varianza mostró la existencia de un efecto significativo de los tratamientos sobre la tasa de reproducción ( $P = 0,025$ ) ninguno de los contrastes considerados en nuestro análisis mostró la existencia de diferencias significativas ( $P > 0,05$ ).

#### 4.3.4. EFECTO PROTECTOR DE LA MICORRIZACIÓN CONTRA LA PATOGENICIDAD DE NEMATODOS SOBRE EL OLIVO: SEGUNDO EXPERIMENTO

##### 4.3.4.1. Influencia sobre los parámetros de crecimiento de la planta

Las plantas inoculadas con *M. incognita* y micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* presentaron los valores máximos del crecimiento relativo de la altura del tallo (378,4 %), incremento relativo del número de nudos (131,7 %) y peso fresco de la parte aérea (4,9 g) (Tabla 4.10). El máximo crecimiento relativo del diámetro del tallo (65,7 %) correspondió a las plantas control no inoculadas y micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*, mientras que el máximo peso de la raíz (5,8 g) se encontró en plantas inoculadas con *M. javanica* y micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* (Tabla 4.10).

**Tabla 4.10.** Influencia de la micorrización de plantones de olivo 'Picual' con *G. intraradices* + *G. fasciculatum* (C) sobre las infecciones de raíces por *M. incognita* y *M. javanica*<sup>a</sup>.

Nº Tratamiento	Especie de micorriza <sup>b</sup>	Especie de nematodo	Crec. relativo altura tallo <sup>c</sup>	Crec. relativo diámetro tallo <sup>d</sup>	Incremento relativo número de nudos <sup>e</sup>	Peso fresco parte aérea (g)	Peso fresco raíz (g)
0	0	0	0,33	0,17	0,44	1,67	3,72
1	C	0	2,88	0,66	1,20	4,43	4,86
2	0	<i>M. incognita</i>	0,32	0,32	0,51	1,22	2,84
3	C	<i>M. incognita</i>	3,78	0,37	1,37	4,87	4,51
4	0	<i>M. javanica</i>	0,29	0,47	0,59	1,08	2,90
5	C	<i>M. javanica</i>	1,46	0,35	1,20	4,36	5,81
Contrastes <sup>f</sup>							
0 vs. 1			ns <sup>g</sup>	ns	<0,0001	<0,0001	0,0125
0 vs. 2			ns	ns	ns	ns	ns
0 vs. 4			ns	ns	ns	ns	ns
0 vs. (2,4)			ns	ns	ns	ns	ns
1 vs. 3			ns	ns	ns	ns	ns
1 vs. 5			ns	ns	ns	ns	ns
1 vs. (3,5)			ns	ns	ns	ns	ns
2 vs. 3			ns	ns	<0,0001	<0,0001	0,0029
4 vs. 5			ns	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001
(0,1) vs. (2-5)			ns	ns	ns	ns	ns
(0,1) vs. (2,3)			ns	ns	ns	ns	ns
(0,1) vs. (4,5)			ns	ns	ns	ns	ns

<sup>a</sup> Los datos corresponden a la media de 16 plantas por tratamiento, y se determinaron 100 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 10.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *Meloidogyne* spp. Los plantones crecieron en macetas de arcilla (0,5 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1 °C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a 365 ± 20 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> 0 = = plantones no micorrizados; C = plantones micorrizados con una mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*. <sup>c</sup> Crecimiento Relativo de la altura del tallo = (altura del tallo final - altura del tallo inicial)/altura del tallo inicial. <sup>d</sup> Crecimiento Relativo del diámetro del tallo = (diámetro tallo final - diámetro tallo inicial)/diámetro tallo inicial. <sup>e</sup> Incremento Relativo del número de nudos = (número de nudos final-número de nudos inicial)/ número de nudos inicial. <sup>f</sup> Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; <sup>g</sup> ns =no significativo (*P* > 0,05).

En las plantas no micorrizadas inoculadas con *M. javanica* se registraron los valores más bajos de crecimiento relativo en la altura del tallo (29,5 %), peso fresco de la parte aérea (1,1 g) y peso fresco de la raíz (2,9 g) (Tabla 4.10). El mínimo crecimiento relativo del diámetro del tallo (17,3 %) y el mínimo incremento relativo del número de nudos (43,9 %) se registraron en plantas control no inoculadas ni micorrizadas.

El análisis de la varianza mostró que los tratamientos no tuvieron efecto significativo sobre el crecimiento relativo de altura del tallo ( $P = 0,180$ ), ni sobre el crecimiento relativo del diámetro del tallo ( $P = 0,104$ ). Sin embargo, sí hubo un efecto significativo de los tratamientos sobre el resto de los parámetros considerados en la planta. Los contrastes ortogonales mostraron que el incremento relativo del número de nudos, el peso fresco de la parte aérea y el peso fresco de la raíz fueron significativamente superiores en los tratamientos micorrizados con respecto a cada respectivo control sin micorrizar, tanto en plantas sin inocular, como en las inoculadas con *M. incognita* o con *M. javanica* (Tabla 4.10).

#### 4.3.4.2. Reproducción de los nematodos

La densidad de población de *M. incognita* en suelo osciló entre 28,2/100 cm<sup>3</sup>, en sin micorrizar y 31,0/100 cm<sup>3</sup> en micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* (Tabla 4.11). El análisis de la varianza mostró que no existieron diferencias significativas para este parámetro entre los diferentes tratamientos ( $P = 0.083$ ).

**Tabla 4.11.** Reproducción de *M. incognita* y *M. javanica* en plantones de olivo cv. Picual micorrizados con *G. intraradices* + *G. fasciculatum* (C) y no micorrizados<sup>a</sup>

Nº Tratamiento	Especie Micorriza <sup>b</sup>	Especie nematodo	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo	Nematodos/ g raíz	Pf <sup>c</sup> (nematodos/ planta)	Rf (Pf/Pi) <sup>d</sup>
2	0	<i>M. incognita</i>	28,2 ± 0,1	4.960,5 ± 2.914,7	11.878,4 ± 2.167,1	1,19
3	C	<i>M. incognita</i>	31,0 ± 9, 1	3.072,9 ± 1.410,6	13.054,8 ± 3.835,8	1,31
4	0	<i>M. javanica</i>	27,6 ± 5,9	4.982,4 ± 3.803,8	11.612,7 ± 2.478,3	1,16
5	C	<i>M. javanica</i>	25,1 ± 3,6	1.881,2 ± 429,81	10.575,5 ± 1.485,9	1,06
Contrastes ortogonales <sup>e</sup>						
2 vs. 3			ns <sup>f</sup>	0.0044	ns	ns
4 vs. 5			ns	<0.0001	ns	ns
(2,4) vs. (3,5)			ns	<0.0001	ns	ns
2 vs. 4			ns	ns	ns	ns
3 vs. 5			ns	0.0044	ns	ns
(2-3) vs. (4-5)			ns	0.0382	ns	ns

<sup>a</sup>Los datos son la media de 10 plantas por tratamiento, y se determinaron 100 días después de la inoculación. La inoculación con cada población de nematodo se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 10.000 huevos+J<sub>2</sub>/planta de *Meloidogyne* spp. Los plantones crecieron en macetas de arcilla (0,5 L de capacidad), y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 11 C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a 365 ± 20 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>0 = = plantones no micorrizados; C = plantones micorrizados con una mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*. <sup>c</sup>Población final total de nematodos en suelo y en raíz. <sup>d</sup>Tasa de reproducción (población final/población inicial) <sup>e</sup>Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; <sup>f</sup>ns =no significativo ( $P > 0,05$ ).

La menor densidad de población de nematodos en la raíz de la planta se registró en plantas micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* e inoculadas con *M. javanica* (1.881,2), mientras que la densidad de población más alta (4.982,4) se alcanzó en plantas no micorrizadas e inoculadas con *M. javanica* (Tabla 4.11). La densidad de población de nematodos en raíz fue significativamente mayor en los tratamientos no micorrizados que en los respectivos tratamientos micorrizados, tanto cuando se compararon plantas inoculadas con *M. incognita* o con *M. javanica* por separado, como cuando se compararon ambas especies globalmente (Tabla 4.11). El número medio de nematodos por gramo de raíz fue significativamente más alto ( $P < 0,05$ ) en plantas inoculadas con *M. incognita* que en las inoculadas con *M. javanica*, tanto en las plantas micorrizadas, como cuando se consideraron globalmente las plantas micorrizadas y no micorrizadas (Tabla 4.11).

La población final osciló entre 10.575,5 nematodos por planta en plantas inoculadas con *M. javanica* y micorrizadas con mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* y 13.054,8 nematodos por planta en plantas inoculadas con *M. incognita* y micorrizadas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*. Sin embargo, la micorrización de las plantas con la mezcla de *G. intraradices* y *G. fasciculatum* no influyó significativamente en la población final y tasa de reproducción de ambos nematodos (Tabla 4.11).

#### **4.3.4. EFECTO DE LA ENMIENDA DEL SUSTRATO CON COMPOST DE CORCHO SOBRE LA PATOGENICIDAD DE *M. INCOGNITA***

##### **4.3.4.1. Efecto sobre los parámetros de crecimiento de la planta**

El máximo valor del crecimiento relativo de la altura del tallo (95,6 %) correspondió a plantas inoculadas con *M. incognita* y cultivadas en un sustrato conteniendo 25 % de compost de corcho (Tabla 4.12). El valor más bajo de dicho parámetro fue 48,7 % y se obtuvo en plantas inoculadas con *M. incognita* y cultivadas en sustrato sin compost de corcho. El análisis de varianza mostró que el efecto de los tratamientos no afectó significativamente al crecimiento relativo de la altura del tallo de la planta ( $P = 0,621$ ).

El crecimiento relativo del diámetro del tallo varió entre 41,1 % (plantas inoculadas con *M. incognita* y cultivadas en sustrato con 75 % de compost de corcho) y 84,8 % (plantas inoculadas cultivadas en 100 % de compost de corcho). Sin embargo, en ningún caso los contrastes ortogonales indican diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre las plantas control no inoculadas y las plantas inoculadas. Tampoco existieron diferencias

significativas ( $P > 0,05$ ) entre las plantas inoculadas y cultivadas en sustrato sin compost y las plantas inoculadas y cultivadas en sustratos con 25, 50 y 75 % de compost. Sin embargo, el incremento relativo del diámetro del tallo fue significativamente más alto ( $P < 0,05$ ) en plantas inoculadas que crecieron en 100 % de compost de corcho, que en aquéllas que habiendo sido inoculadas crecieron en la mezcla de suelo artificial sin compost de corcho).

**Tabla 4.12.** Influencia de las infecciones de raíces por *M. incognita* sobre el crecimiento de plantones de olivo 'Picual' cultivado en sustratos con diferentes concentraciones de compost de corcho<sup>a</sup>

Nº Tratamiento	Inoculación con <i>M. incognita</i>	Concentración de compost de corcho en el sustrato (% V/V)	Crec. relativo altura tallo <sup>b</sup>	Crec. relativo diámetro tallo <sup>c</sup>	Incremento relativo número de nudos <sup>d</sup>	Peso fresco parte aérea (g)	Peso fresco raíz (g)
0	Control	0	0,91	0,66	0,99	2,78	4,84
1	Inoculado	0	0,49	0,49 bc	0,19 b	2,29	3,41 ab
2	Inoculado	25	0,96	0,78 ab	1,01 a	2,76	5,35 a
3	Inoculado	50	0,62	0,78 ab	0,99 a	2,07	3,94 ab
4	Inoculado	75	0,59	0,41 c	1,06 a	2,07	3,46 ab
5	Inoculado	100	0,67	0,85 a	1,18 a	2,15	3,30 b
Contrastes <sup>e</sup>							
	0 vs. 1		ns <sup>f</sup>	0,2562	0,0013	ns	0,0540
	0 vs. 2		ns	0,4332	0,9343	ns	0,4915
	0 vs. 3		ns	0,4419	0,9716	ns	0,2201
	0 vs. 4		ns	0,1000	0,7773	ns	0,0640
	0 vs. 5		ns	0,2123	0,4497	ns	0,0387
	1 vs. 2		ns	0,0571	0,0010	ns	0,0098
	1 vs. 3		ns	0,0590	0,0015	ns	0,4735
	1 vs. 4		ns	0,6035	0,0005	ns	0,9381
	1 vs. 5		ns	0,0188	0,0001	ns	0,8843

<sup>a</sup> Los datos son la media de 14 plantas por tratamiento, y se determinaron 70 días después de la inoculación. La inoculación se llevó a cabo en el momento del transplante. Las plantas se inocularon con 10.000 huevos +  $J_2$ /planta de *M. incognita*. Los plantones crecieron en macetas de arcilla de 500 cm<sup>3</sup> y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a  $24 \pm 1$  °C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a  $365 \pm 20$   $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . <sup>b</sup>Crecimiento relativo de la altura del tallo = (altura del tallo final - altura del tallo inicial)/altura del tallo inicial. <sup>c</sup>Crecimiento relativo del diámetro del tallo = (diámetro tallo final - diámetro tallo inicial)/diámetro tallo inicial. <sup>d</sup>Incremento relativo del número de nudos = (número de nudos final - número de nudos inicial)/ número de nudos inicial. <sup>e</sup> Probabilidad estimada para el estadístico *t* del contraste lineal de un sólo grado de libertad; <sup>f</sup> ns =no significativo ( $P > 0,05$ ).

El incremento relativo del número de nudos varió entre 18,6 % (plantas inoculadas cultivadas en suelo sin compost de corcho) y un 117,9 % (plantas inoculadas cultivadas en 100 % de compost de corcho) (Tabla 4.12). Este parámetro resultó significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en las plantas control no inoculadas que crecieron en suelo artificial sin compost de corcho que en las plantas inoculadas cultivadas en el mismo tipo de sustrato. Asimismo, este parámetro fue significativamente inferior en plantas inoculadas que crecieron en suelo sin compost de corcho que en plantas inoculadas cultivadas en suelo con 25, 50, 75 y 100 % de compost de corcho.

El peso fresco de la parte aérea tuvo su mínimo valor (2,1 g) en plantas inoculadas con *M. incognita* creciendo en sustrato con 50 y 75 % de compost de corcho y el máximo (2,8 g) en plantas control control no inoculadas que crecieron sin enmienda (Tabla 4.12). El análisis de la varianza mostró que el peso fresco de la parte aérea no fue influido por la infección del nematodo o el contenido de compost de corcho en el sustrato ( $P = 0,548$ ).

El peso fresco final de las raíces osciló entre 3,3 g en plantas inoculadas que crecieron en 100 % de compost de corcho y 5,4 g en plantas inoculadas que crecieron en suelo conteniendo 25 % de compost de corcho (Tabla 4.12). Este parámetro fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en las plantas control no inoculadas cultivadas en sustrato sin enmienda que en plantas inoculadas que crecieron en 100 % de compost de corcho inoculado. A su vez, el peso fresco de la raíz en plantas inoculadas cultivadas en suelo con 25 % de compost de corcho fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que el de plantas inoculadas que crecieron en ausencia de enmienda.

El análisis de regresión mostró un ajuste muy bajo en todas las ecuaciones que relacionaban las variables de crecimiento como función lineal de la concentración de compost en el sustrato ( $R^2 = 0,001$  para el crecimiento relativo de la longitud del tallo;  $R^2 = 0,080$  para el crecimiento relativo del diámetro del tallo;  $R^2 = 0,006$  para el incremento relativo del número de nudos;  $R^2 = 0,003$ , para el peso de la parte aérea y  $R^2 = 0,012$ , para el peso final de la raíz).

#### **4.3.4.2. Efecto sobre la reproducción del nematodo**

Todos los parámetros de población de nematodos considerados (número de nematodos por cada 100 cm<sup>3</sup> de suelo, número de nematodos por gramo de raíz, población final por planta y población final relativa) disminuyeron proporcionalmente al incremento de la concentración de compost de corcho en el sustrato (Tabla 4.13). Las plantas control inoculadas cultivadas en sustrato sin compost de corcho presentaron la máxima densidad de población de nematodos en suelo, en raíz, así como la mayor población. Asimismo, la máxima población final relativa de nematodos (18,7 %) se produjo en plantas inoculadas que crecieron en sustrato con el 25 % de compost de corcho. Sin embargo, los valores más bajos para todos los parámetros de población de *M. incognita* se presentaron en plantas inoculadas que crecieron en sustrato compuesto por 100% de compost de corcho.

**Tabla 4.13.** Reproducción de *M. incognita* en plántones de olivo de 'Picual' que crecieron en sustratos enmendados con diferentes concentraciones de compost de corcho<sup>a</sup>.

Nº Tratamiento	Inoculación con <i>M. incognita</i>	Concentración de compost de corcho en el sustrato (% V/V)	Nematodos/ 100 cm <sup>3</sup> suelo	Nematodos/ g raíz	Pf <sup>b</sup> (nematodos/planta)	PFR <sup>c</sup> (%)
1	Inoculado	0	21.4 ± 6.4a <sup>d</sup>	3248.3 ± 2297.0a	8378.5 ± 2468.1a	
2	Inoculado	25	4.71 ± 1.9b	348.5 ± 225.4b	1564.7 ± 716.9b	18.7a
3	Inoculado	50	3.7 ± 1.5b	159.7 ± 139.8c	572.7 ± 521.9c	6.8b
4	Inoculado	75	1.7 ± 0.6c	71.5 ± 57.5d	247.5 ± 217.01d	3.0bc
5	Inoculado	100	1.3 ± 0.6c	41.6 ± 76.3e	132.1 ± 200.1e	1.6c

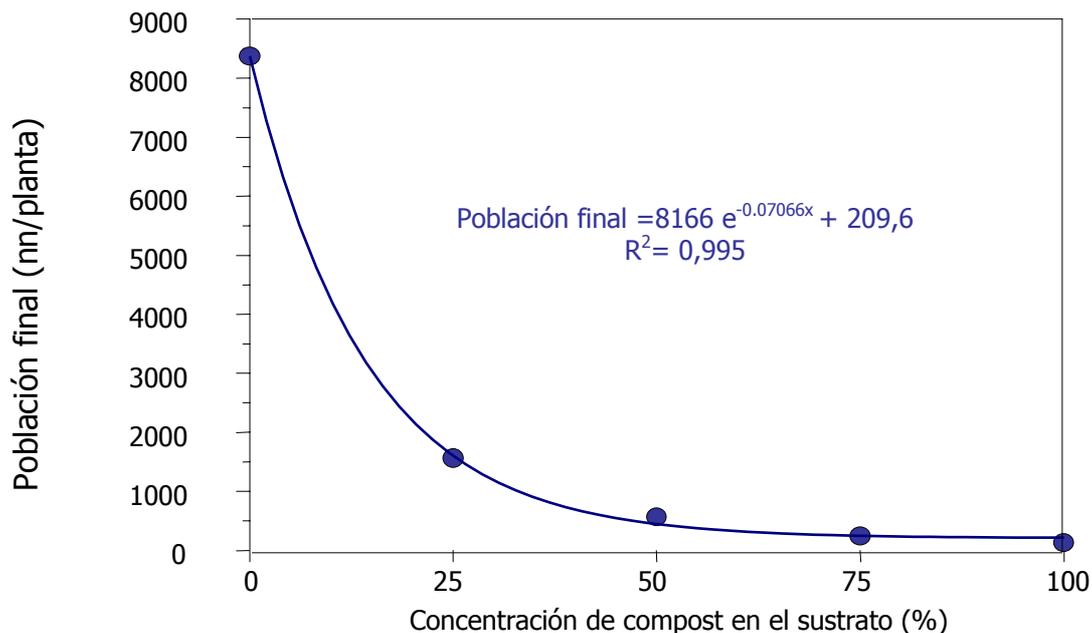
<sup>a</sup> Los datos son la media de 14 plantas por tratamiento, y se determinaron 70 días después de la inoculación. La inoculación se llevó a cabo en el momento del trasplante. Las plantas se inocularon con 10.000 huevos + J<sub>2</sub>/planta de *M. incognita*. Los plántones crecieron en macetas de arcilla de 500 cm<sup>3</sup> y se mantuvieron en una cámara de crecimiento de plantas ajustada a 24 ± 1 °C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta a 365 ± 20 μEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. <sup>b</sup> Población final total de nematodos en suelo y en raíz. <sup>c</sup> Pfr = [(Nº de nematodos/planta)<sub>x</sub> / (Nº de nematodos/planta)<sub>0</sub>] \* 100, donde (Nº de nematodos/planta)<sub>x</sub> = número de nematodos por planta en la muestra correspondiente a la concentración x y (Nº de nematodos/planta)<sub>0</sub> = número de nematodos por planta en la muestra correspondiente a la concentración 0. <sup>d</sup> Las medias de una misma columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente (P = 0,05) según el contraste de la mínima diferencia significativa (LSD) protegida de Fisher.

El número de nematodos por 100 cm<sup>3</sup> de suelo fue significativamente superior (P < 0,05) en plantas que crecieron sin enmienda de corcho que en las plantas que crecieron con 25 y 50 % de compost de corcho (Tabla 4.13). A su vez el número de nematodos por 100 cm<sup>3</sup> de suelo fue significativamente mayor (P < 0,001) en estas plantas que las que crecieron en suelo conteniendo los mayores porcentajes de enmienda (75 y 100 % de compost de corcho).

El número de nematodos por gramo de raíz y el número total de nematodos por planta disminuyeron progresiva y significativamente (P < 0,001) en función del incremento del porcentaje de enmienda de corcho (Tabla 4.13).

La población final relativa del nematodo en las raíces de las plantas que crecieron en un sustrato conteniendo 25 % de compost de corcho, calculada respecto de las plantas que crecieron sin enmienda, superó significativamente (P < 0,001) a la del resto de los tratamientos con enmienda. A su vez, el valor de este parámetro en plantas que crecieron en suelo con 50% de compost fue significativamente mayor (P < 0,001) que el de las plantas que crecieron en 100% de compost. No existieron diferencias significativas entre la población final relativa de las plantas que crecieron en suelo con 50 y 75 % de compost de corcho (P < 0,001) (Tabla 4.13).

El análisis de regresión no lineal mostró que la población final podía expresarse como función exponencial de la concentración de compost de corcho en el sustrato con un ajuste apropiado (R<sup>2</sup> = 0,995) (Fig 4.13).



**Fig. 4.13.** Relación entre la población final de *M. incognita* en plantones de olivo del cultivar Picual y la concentración de compost de corcho en el sustrato donde éstas crecieron

#### 4.3.5. EFECTO DE LA BIOFUMIGACIÓN

##### 4.3.5.1. Evaluación de la supervivencia del inóculo

En todos los tratamientos investigados en el bioensayo, la población final de *M. incognita* por planta disminuyó con el tiempo que el inóculo estuvo sometido a la biofumigación (Tabla 4.14). El análisis de varianza globalizado indicó que la dosis de enmienda, la cobertura plástica, el tiempo de exposición, y la interacción entre la dosis de enmienda x cobertura plástica afectaron significativamente la población final de *M. incognita* en el bioensayo ( $P < 0,001$ ,  $P = 0,016$ ,  $P < 0,001$ ,  $P < 0,001$ , respectivamente), en tanto que ninguna de las restantes interacciones entre los factores resultó significativa ( $P > 0,05$ ). La comparación de medias de la población final de *M. incognita* en las plantas inoculadas según los tiempos de exposición indicó que el valor registrado con 0 días de exposición fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) a todos los demás. De manera similar, la población final de *M. incognita* con 5 días de exposición fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) a la verificada con tiempos de exposición superiores. La población final de *M. incognita* en plantas inoculadas con el inóculo sometido a 15 días de exposición a la biofumigación fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) a la alcanzada con el que se sometió a 60 días de exposición. El valor que alcanzó este parámetro cuando el inóculo se expuso a 30 días de biofumigación no varió significativamente ( $P > 0,05$ ) de los registrados cuando el inóculo se

expuso a 15 y 60 días de biofumigación. El análisis de varianza no mostró ninguna diferencia significativa en la población final relativa entre los diferentes tiempos de exposición correspondientes a este tratamiento ( $P = 0,103$ ).

La población final relativa de nematodos en el sistema radical de las plantas que recibieron inóculo biofumigado, calculada respecto de las plantas que recibieron inóculo no biofumigado (con 0 días de exposición), también disminuyó progresivamente con el tiempo de exposición al tratamiento (Tabla 4.14). El análisis de varianza globalizado para este parámetro indicó que la dosis de enmienda, la cobertura plástica, el tiempo de exposición y todas las interacciones posibles entre los factores tuvieron efecto significativo sobre la población del nematodo ( $P < 0,001$ ). Por el contrario, el tiempo de exposición a la biofumigación no presentó efecto significativo sobre la población final relativa en los casos en que no se incorporó enmienda con paja de sorgo independientemente de que existiera cobertura plástica ( $P = 0,103$ ) o no ( $P = 0,123$ ). Asimismo, mientras que la enmienda con 4 % de paja de sorgo con cobertura plástica no tuvo efecto significativo ( $P = 0,070$ ) la incorporación de 2 % de paja de sorgo con cobertura plástica dio lugar a que, a medida que se aumentó el tiempo de exposición a la biofumigación, se obtuvieran valores de población final relativa significativamente inferiores a los obtenida con el inóculo sometido a tiempos de exposición menos prolongado ( $P < 0,001$ ). En el tratamiento 4 (2 % de paja de sorgo sin cobertura plástica) la población final relativa de nematodos obtenida con el inóculo expuesto a 5 días de biofumigación fue significativamente superior ( $P < 0,001$ ) a la obtenida con todos los tiempos de exposición más prolongados, que formaron entre sí un grupo homogéneo sin diferencias significativas entre sí. Un comportamiento idéntico de la población final relativa de nematodos en función del tiempo de exposición al tratamiento ( $P = 0,003$ ) se produjo en el tratamiento 6 (4 % de paja de sorgo sin cobertura plástica).

Los análisis ortogonales indicaron que el empleo de la cobertura plástica no tuvo influencia significativa sobre la población final de *M. incognita* en plantas de tomate que recibieron el inóculo sometido a periodos de biofumigación de 0, 5, 15 y 30 días (Tabla 4.14). Sin embargo, cuando el inóculo se expuso a 60 días de biofumigación, la cobertura plástica incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) la infectividad del inóculo indicada por la densidad de población final respecto de los tratamientos sin cobertura plástica. No obstante, si consideramos la población final relativa, la cobertura plástica influyó significativamente en todos los tiempos de exposición, exceptuando el de 30 días, pero de forma variable. La población final relativa en las plantas que recibieron inóculo biofumigado durante 5 y 60 días no expuesto a cobertura plástica fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que en las que

recibieron inóculo que se mantuvo bajo cobertura plástica. Con 15 días de exposición, en cambio, la población final relativa fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en las plantas que recibieron inóculo biofumigado bajo cobertura plástica.

**Tabla 4.14.** Influencia de la biofumigación con distintas dosis de enmienda de paja de sorgo sobre la infectividad de huevos y  $J_2$  de *M. incognita* en tomate<sup>a</sup>

Tratamiento			Población final (nº de nematodos/planta)					Población final relativa (%) <sup>b</sup>			
Nº	Cobertura plástica	Dosis enmienda (%)	0 días	5 días	15 días	30 días	60 días	5 días	15 días	30 días	60 días
			1	Con	0	493.888,6a <sup>c</sup>	439.633,3b	403.420,0c	347.984,0cd	26.9280,0d	89,0
2	Sin	0	379.061,3a	328.522,7b	283.520,0c	234.602,7cd	21.7098,7d	86,7	74,8	61,9	57,3
3	Con	2	108.622,7a	91.825,3b	36.312,0c	17.782,0cd	2.727,0d	84,5a	33,4b	16,4c	2,5d
4	Sin	2	85.042,0a	83.872,0b	29.546,0c	31.722,0cd	15.096,0d	98,6a	34,7b	37,3b	17,8b
5	Con	4	148.240,0a	102.646,0b	47.226,0c	12.376,0cd	3.515,3d	69,2	31,9	8,4	2,4
6	Sin	4	199.388,0a	160.208,0b	60.316,0c	30.362,0cd	13.634,0d	80,4a	30,3b	15,2b	6,8b

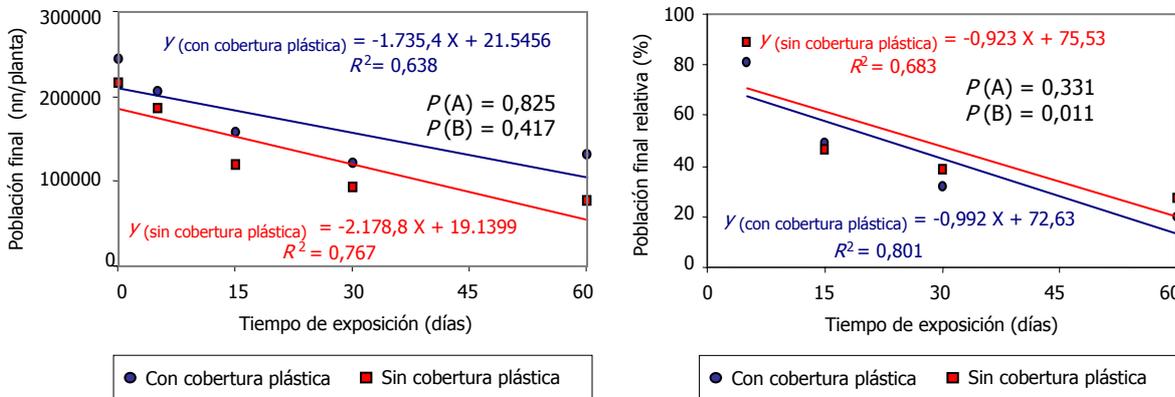
  

Contrastes ortogonales <sup>d</sup>										
Efecto de la cobertura plástica										
(1,3,5) vs. (2,4,6)	ns	ns	ns	ns	0,0121	0,0002	0,0421	ns	0,0001	
1 vs. 2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
3 vs. 4	ns	ns	ns	ns	0,0194	ns	ns	ns	ns	
5 vs. 6	ns	ns	ns	ns	0,0179	<0,0001	0,0017	ns	<0,0001	
Efecto de la dosis de enmienda										
(1,2) vs. (3,4)	<0,0001	0,0033	<0,0001	<0,0001	-	ns	ns	ns	<0,0001	
(1,2) vs. 3	- <sup>f</sup>	-	-	-	<0,0001	-	-	ns	-	
(1,2) vs. 4	-	-	-	-	0,0007	-	-	ns	-	
(1,2) vs. (5,6)	0,0001	0,0049	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001	0,0861	ns	0,0049	
(1,2) vs. 5	-	-	-	-	<0,0001	-	-	ns	-	
(1,2) vs. 6	-	-	-	-	0,0008	-	-	ns	-	
(3,4) vs. (5,6)	0,0040	ns	0,0370	Ns	-	<0,0001	0,0161	ns	0,0012	
3 vs. 5	-	-	-	-	ns	-	-	ns	-	
4 vs. 6	-	-	-	-	ns	-	-	ns	-	
(3,4) vs. 5	-	-	-	-	-	<0,0001	0,0006	ns	<0,0001	
(3,4) vs. 6	-	-	-	-	-	ns	ns	ns	ns	

<sup>a</sup>Los datos son la media de tres repeticiones por tratamiento. Las determinaciones se efectuaron sobre plantas de tomate que servían como bioensayo del efecto de los tratamientos sobre inóculo constituido por 10.000 huevos +  $J_2$  de *M. incognita*. Las macetas para crecimiento de las plantas contenían 500 cm<sup>3</sup> de sustrato sometido al efecto de los tratamientos en el interior de bolsas de nylon de malla fina colocadas en bandejas de plástico a 25 °C. <sup>b</sup>Pfr =  $[(N^\circ \text{ de nematodos/planta})_x / (N^\circ \text{ de nematodos/planta})_0] * 100$ , donde  $(N^\circ \text{ de nematodos/planta})_x$  = número de nematodos por planta en la muestra correspondiente al tiempo de exposición  $x$  y  $(N^\circ \text{ de nematodos/planta})_0$  = número de nematodos por planta en la muestra correspondiente al tiempo 0. <sup>c</sup>Las medias en una misma fila seguidas por la misma letra no difieren significativamente ( $P = 0,05$ ) según el contraste de la mínima diferencia significativa (LSD) protegida de Fisher. <sup>d</sup>Probabilidad estimada para el estadístico  $t$  del contraste lineal de un sólo grado de libertad; <sup>e</sup>ns = no significativo ( $P > 0,05$ ). <sup>f</sup>Interacción no considerada.

El análisis de regresión lineal y la comparación de las rectas de regresión mostró que, considerando los tratamientos de forma global en el tiempo, el empleo del plástico no tuvo efectos significativos sobre la población final alcanzada por el nematodo en las plantas del bioensayo en función del tiempo de exposición del inóculo a la biofumigación ( $P = 0,825$ , para la comparación de las pendientes y  $P = 0,417$ , para la comparación de las ordenadas en el origen, Fig. 4.14, izq.). Sin embargo, la comparación de las rectas de regresión de la población final relativa en función del tiempo de exposición a la biofumigación del inóculo mostró que el efecto del empleo del plástico sólo resultó parcialmente significativo ( $P =$

0,331, para la comparación de las pendientes y  $P = 0,011$ , para la comparación de las ordenadas en el origen, Fig. 4.14, der.).



**Fig. 4.14.** Regresión lineal de la población final absoluta y relativa de *M. incognita* en plantas de tomate sometidas a diferentes tiempos de exposición al tratamientos de biofumigación (considerando la totalidad de los tratamientos): efecto del empleo de cobertura plástica sobre la población final absoluta (izq.) y sobre la población final relativa (der.). Se indica en cada uno de los gráficos la probabilidad del estadístico "F" para la comparación de las pendientes de las rectas (P (A)) y para la comparación de las ordenadas en el origen (P (B)).

La colocación del plástico sobre suelo que no recibió paja de sorgo no tuvo efecto significativo ( $P > 0,05$ ) sobre la población final y población final relativa de *M. incognita*, independientemente del tiempo de exposición del inóculo del nematodo al tratamiento (Tabla 4.14). Los dos tratamientos sin adición de paja de sorgo fueron por tanto considerados como uno solo para los análisis posteriores, independientemente de que incluyeran o no cobertura plástica.

La colocación del plástico no tuvo efecto significativo ( $P > 0,05$ ) sobre la población final de nematodos en las plantas que recibieron inóculo adicionado con 2 % de paja de sorgo, cuando los tiempos de biofumigación fueron de 0, 5, 15 y 30 días (Tabla 4.14). En cambio, cuando el tiempo de exposición fue de 60 días la población resultó significativamente más baja en el tratamiento con cobertura plástica ( $P = 0,019$ ). La colocación del plástico, en cambio, no tuvo efecto significativo ( $P > 0,05$ ) sobre la población relativa en ningún caso, independientemente del tiempo de exposición que se considerara. En este caso no se efectuó la comparación de las curvas de regresión, ya que ninguno de los tratamientos con adición de paja de sorgo ajustaban adecuadamente al modelo lineal.

Entre los tratamientos que recibieron 4 % de paja de sorgo pudo observarse que, al igual que ocurrió con los que contenían 2 % de este material, la colocación del plástico no mostró efecto significativo ( $P > 0,05$ ) sobre la población final cuando el tiempo de exposición del inóculo a la biofumigación fue inferior a los 60 días (Tabla 4.14). Cuando el tiempo de

exposición fue de 60 días, la población final del nematodo en las plantas inoculadas en el bioensayo fue significativamente más baja ( $P < 0,05$ ) en el tratamiento con cobertura plástica. La población final relativa de nematodos resultó significativamente superior ( $P = 0,05$ ) en el tratamiento con cobertura plástica cuando el tiempo de exposición fue de 15 días, mientras que cuando ese tiempo fue de 5 y 60 días el valor registrado en los tratamientos con cobertura fue significativamente más bajo ( $P < 0,05$ ). En forma similar a lo que ocurrió en los tratamientos con 2 % de paja de sorgo, tampoco se efectuó la comparación de las curvas de regresión.

El contraste ortogonal entre los tratamientos sin paja de sorgo y los que recibieron 2 % de la misma mostraron que la población final de *M. incognita* en plantas de tomate inoculadas fue, independientemente del tiempo de exposición que se considerara, siempre significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en los tratamientos sin enmienda (Tabla 4.14). Los contrastes efectuados con el valor de la población final relativa, en cambio, mostraron que no hubo efecto significativo ( $P > 0,05$ ) de la adición de 2 % de paja sobre la infectividad del inóculo cuando éste se expuso a biofumigación durante 5 y 15 días. Cuando el inóculo se mantuvo en biofumigación durante 60 días, la población final relativa en las plantas inoculadas fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) en el tratamiento que recibió 2 % de paja de sorgo.

La comparación entre los tratamientos control y aquellos que contenían 4 % de paja de sorgo mostró que, para todos los tiempos de exposición considerados, la población final en las plantas que recibieron inóculo no expuesto a la enmienda con sorgo superó significativamente ( $P < 0,05$ ) a aquéllas en que el inóculo se mantuvo con 4 % de paja de sorgo (Tabla 4.14). La comparación también mostró que la población final relativa en los tratamientos control superó significativamente ( $P < 0,05$ ) a la de los tratamientos que contenían 4 % de paja de sorgo cuando los tiempos de biofumigación fueron de 5 días y 60 días. No se comprobaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) cuando el tiempo de exposición fue de 15 días.

La población final de nematodos en el bioensayo fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) para el inóculo sometido a los tratamientos con enmienda de 2 % de paja de sorgo que para el que contenía 4 % de paja de sorgo cuando los tiempos de exposición fueron de 0 días y 15 días (Tabla 4.14). No se observaron efectos significativos ( $P > 0,05$ ) sobre la población final de nematodos entre el inóculo expuesto a 2 y 4 % de sorgo cuando la biofumigación se prolongó durante 5, 30 y 60 días. La población final relativa alcanzada con inóculo expuesto a tratamientos con 2 % de paja de sorgo resultó significativamente

superior ( $P < 0,05$ ) a la que se obtuvo en los adicionados con 4 % sorgo y cubiertos con plástico. No se registraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre la adición de 2 % de paja de sorgo y la adición del 4 % del mismo material pero sin cobertura plástica.

## **4.4. DISCUSIÓN**

### **4.4.1. EXPERIMENTOS DE SOLARIZACIÓN**

#### **4.4.1.1. *Temperatura del suelo***

La aplicabilidad técnica de la solarización y su eficiencia como método de desinfestación están condicionadas por la meteorología del lugar de uso. Cabe considerar, en principio, que variables climáticas dependientes de la latitud, como son las referidas a la radiación solar, resultan fundamentales para la estimación del comportamiento térmico de los suelos sometidos a solarización (Mahrer, 1979; Wu *et al.*, 1995). La gran mayoría de los lugares donde se ha aplicado con éxito la solarización se hallan en la franja situada aproximadamente entre los 40 °N y los 40 °S (Katan, 1987) y las regiones situadas fuera de este franja se consideran áreas marginales, donde es necesario implementar técnicas especiales y extremar los cuidados en la elección de la época del año más apropiada (Horiuchi, 1984; Lazarovits *et al.*, 1991; Tamietti y Valentino, 2000). Las áreas circunmediterráneas aparecen como particularmente apropiadas para la implementación de tecnologías dependientes de la energía solar. Fue dentro de esta región, en Israel, donde la solarización fue inicialmente desarrollada y puesta a punto (Katan *et al.*, 1976). Posteriores estudios llevados a cabo en otras localidades del área confirmaron la aptitud del ambiente mediterráneo para emplear la solarización método de desinfestación de suelos y otros sustratos (Besri, 1983; Cartia, 1989). En particular, las condiciones del clima estival en Andalucía, caracterizadas por altas dotaciones de radiación solar global y elevadas temperaturas diurnas (Fernández Álvarez, 2001), contribuyen a valorar la aptitud de esta zona para la implementación con éxito de la solarización. Numerosas investigaciones previas avalan con los resultados obtenidos en diversos patosistemas esta valoración (González-Torres *et al.*, 1993; Melero-Vara *et al.*, 1995; López-Herrera *et al.*, 1996; López-Escudero y Blanco-López, 2001). Cabe, por otra parte, remarcar que la aptitud regional de Andalucía para la aplicación de la solarización se refuerza por las condiciones particulares del clima mediterráneo, caracterizado por bajas tasas estivales de nubosidad y pluviometría, en contraste con otras áreas de latitud similar donde la interrupción de los ciclos de

calentamiento en días nublados o lluviosos compromete parcialmente la eficacia de la práctica (Heald y Robinson, 1987).

Los registros térmicos obtenidos en nuestro trabajo confirman estas presunciones, ya que en las condiciones de los experimentos se consiguió un calentamiento del suelo mayor que el obtenido en otras áreas bajo condiciones similares. Las máximas medias diarias registradas a 20 cm de profundidad en el suelo solarizado (47,4 °C durante el año 1999 y 48,2 °C durante el año 2000) superan en más de 8 °C a las obtenidas a esa profundidad en Texas (Heald y Robinson, 1987), India (Gaur y Dhingra, 1991) o el centro-norte de Chile (Herrera *et al.*, 1999). Los incrementos de temperatura que se alcanzaron en nuestro estudio en el suelo solarizado comparado con el que no lo fue resultan similares a los registrados en las localidades mencionadas, pero las ganancias netas de temperatura tienen lugar sobre suelos que, en condiciones naturales, ya presentan temperaturas más altas. La capacidad de la cubierta plástica de servir como pantalla de retención de la radiación de baja longitud de onda resulta, por lo tanto en las condiciones de nuestro trabajo, adecuada y suficiente. Cabe auspiciar que la solarización efectuada en Andalucía en los meses de mayor insolación no requiera el empleo de ninguna de las tecnologías especiales recomendadas en otras situaciones, tal como el uso de materiales plásticos de mejor comportamiento que el polietileno (Cascone *et al.*, 2000), o la disposición de dobles capas de este material (Raymundo y Alcázar, 1986). Estas alternativas podrían constituir, para un ambiente como el de Andalucía, opciones apropiadas en meses considerados subóptimos para la solarización, como junio o septiembre.

El efecto de la solarización del suelo sobre *M. incognita* se estudió, en nuestro trabajo, utilizando muestras de huevos contenidas en bolsas de malla de nylon que los mantenían separados del resto del suelo. Es lícito suponer que esta disposición del inóculo pudiera haber determinado diferencias importantes entre la temperatura registrada en el interior de las bolsitas y la alcanzada en el suelo circundante. Sin embargo, los registros de temperatura muestran que, en ningún caso, la temperatura media en los ambientes difirió en más de 1 °C. Las condiciones de temperatura que tuvieron lugar en el interior de las bolsitas pueden considerarse similares a las que ocurrieron en el suelo y que, por lo tanto, el efecto biológico provocado sobre el inóculo hubiera sido similar si éste hubiese estado libre. Se confirman así los resultados obtenidos por Raymundo *et al.* (1986a), que emplearon una forma similar para la disposición del inóculo y pudieron registrar adecuadamente el efecto de los tratamientos.

Tradicionalmente, la solarización ha sido aplicada sobre suelo dispuesto en forma

horizontal. En estas condiciones la inclinación con que los rayos solares inciden sobre la superficie del suelo es constante. En las condiciones de nuestro estudio, con el suelo dispuesto en montículos cónicos, el ángulo de incidencia de la radiación solar varió según el sector del montículo solarizado que se considerara. En el centro del montículo la superficie del suelo y la película plástica que lo recubrió quedaron dispuestos de forma horizontal, mientras que en la parte externa la superficie adoptó una pendiente cercana a los 45 °C. Ésto determinó, por una parte, que la radiación solar incidiera en el centro del montículo formando un ángulo casi perpendicular con la superficie y que en la parte externa formara un ángulo mayor. Con ello, en este último sector del montículo tuvo lugar un mayor albedo o reflexión que debió repercutir en una menor transmitancia de la radiación solar incidente hacia el interior (Mahrer, 1979). Por otra parte, los sectores de la parte externa del montículo orientados hacia el norte quedaron necesariamente sombreados durante alguna parte del día, mientras que el centro resultó permanentemente expuesto a la radiación. Esta diferencia en la captación de energía radiante necesariamente influye sobre el incremento térmico que se alcanza en cada uno de los sectores del montículo y así lo confirmaron los resultados obtenidos en el primer experimento de solarización.

Suele mencionarse, como limitación al empleo de la solarización, que el aumento de las temperaturas no alcanza niveles suficientes en todo el espesor de suelo que requiere ser desinfestado. Greco *et al.* (1985), por ejemplo, sitúan en los 25 cm de profundidad el umbral por debajo del cual la solarización no es efectiva sobre huevos de *Heterodera carotae* Jones, mientras que Lazarovits *et al.* (1991) afirman que, en las condiciones de Canadá, la solarización solo consigue desinfestar los primeros 10 cm de suelo. En las condiciones de nuestro estudio las temperaturas máximas a los 20 cm de profundidad en el centro del montículo superaron ampliamente a las registradas a los 40 cm pero las temperaturas medias resultaron similares, ya que a la mayor profundidad el intervalo de variación térmica fue más estrecho.

#### **4.4.1.2. Efecto de los tratamientos sobre la viabilidad e infectividad del inóculo**

La solarización está considerada en términos generales como un método adecuado para la desinfestación de suelos o sustratos que contienen nematodos fitoparásitos. (Katan, 1987; Maas, 1987; Noling, 1995; Whitehead, 1998). Sin embargo la eficacia de la práctica sobre ciertas especies de nematodos ha sido puesta en entredicho y algunos autores, en particular, admiten que los resultados del control sobre *Meloidogyne* spp. resultan erráticos e

inconsistentes (Katan, 1981; Katan, 1987; Madulu y Trudgill, 1994). En tanto que algunos trabajos mencionan excelentes resultados en el control de *Meloidogyne* spp. mediante solarización (Cartia y Greco, 1987; Raymundo *et al.*, 1986b) otros, en cambio, refieren no haber conseguido control eficiente (Overman, 1981) o haber encontrado limitaciones serias, tal como la falta de efecto por debajo de los 10 cm de profundidad (Gaur y Dhingra, 1991; Herrera *et al.*, 1999) o una importante correlación entre la eficacia del tratamiento y la textura del suelo (Stapleton *et al.*, 1987). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran que, bajo las condiciones ambientales propias de Córdoba durante los meses de julio y agosto, la solarización logra un control satisfactorio de *M. incognita* en montículos de sustrato viverístico. En efecto, todas las comparaciones efectuadas en los dos experimentos realizados muestran que tanto la viabilidad como la infectividad del inóculo en las estaciones solarizadas fueron significativamente inferiores a las registradas en las correspondientes estaciones no solarizadas. Cabe, por otra parte, resaltar que en el presente trabajo el efecto de control sobre el nematodo se alcanzó al cabo de un período extremadamente corto de exposición al tratamiento (6 días), en contraste con lo registrado en otros estudios y condiciones, donde niveles similares de control requirieron hasta 2 meses de solarización (Overman y Jones, 1987; Raymundo *et al.*, 1986).

Como hemos señalado en el apartado anterior, la solarización se ha efectuado tradicionalmente sobre suelo dispuesto en forma horizontal y ha sido concebida fundamentalmente como una técnica para la desinfestación *in situ*. La posibilidad de solarizar pequeños volúmenes de sustrato viverístico contenidos en estructuras tridimensionales selladas, es una variante de la técnica desarrollada más recientemente y menos explorada en sus posibilidades (Giblin-Davis y Verkade, 1988, Stapleton *et al.*, 1999). Hemos señalado previamente que la dificultad para lograr el calentamiento en el interior y en las áreas que permanecen sombreadas durante alguna parte del día confieren dudas sobre las posibilidades de eficacia del método estudiado. Sin embargo, los antecedentes muestran que, cuando la operación se realiza bajo condiciones climáticas adecuadas y con la tecnología apropiada, se consigue la desinfestación del volumen completo del sustrato. Stapleton *et al.* (1999) consiguieron resultados satisfactorios en California, aplicando la solarización sobre pequeños volúmenes de sustrato viverístico destinados a ser empleados en viveros de olivo. Los resultados del presente trabajo muestran que la solarización de sustrato viverístico *ex situ* en montículos es también totalmente posible en las condiciones estivales de Córdoba, incluso considerando que el espesor del suelo hasta donde se realiza la evaluación es dos veces mayor que el considerado anteriormente (20 cm, en el trabajo de Stapleton *et al.* (1999), contra 40 cm, en nuestro caso).

En condiciones naturales los huevos de *Meloidogyne* spp. contenidos en masas pueden constituir una fracción importante del inóculo del nematodo presente en sustratos viverísticos, y se impone, por lo tanto, asegurar que los métodos desinfectantes a adoptar sean eficaces sobre este tipo de propágulo. La matriz gelatinosa que recubre los huevos en este género de nematodos tiene como función fundamental proteger a los mismos de la desecación (Wallace, 1968; Orion, 1995). Sin embargo, también se ha comprobado que contribuye a mantener la viabilidad de los huevos frente a otros agentes de estrés tal como la congelación (Vrain, 1978), el parasitismo microbiano (Orion y Kritzman, 1991; Sharon y Spiegel, 1993), la acción de enzimas (Punja y Zhang, 1993) y nematicidas sintéticos (Mojtahedi *et al.*, 1991b), y se ha sugerido que puede tener un efecto protector frente a las altas temperaturas (Daulton y Nussbaum, 1961). Los resultados del presente trabajo muestran que la matriz gelatinosa aumenta la supervivencia de los huevos en aquellas estaciones situadas a 20 cm sobre los tratamientos no solarizados. Probablemente, esto obedece a que el sector externo del montículo es el más expuesto a la desecación y es en esa condición donde la matriz gelatinosa puede mostrar todo su potencial como agente de protección. No se produjo, en cambio, un comportamiento diferencial en las estaciones situadas a 40 cm en suelo sin solarizar, donde las temperaturas fueron más estables y el suelo permaneció con mayor contenido de humedad. Tampoco se observaron diferencias entre la supervivencia de los huevos libres y los contenidos en masas en ninguna de las estaciones colocadas en suelo solarizado. Ésto sugiere que la matriz gelatinosa no protege a los huevos frente al efecto letal de las altas temperaturas que se alcanzan en la solarización bajo las condiciones de nuestro ensayo. Resulta apropiado especular que modificaciones adaptativas como la que representa la disposición de huevos en una matriz gelatinosa puedan adecuarse a las condiciones extremas propias del ambiente evolutivo. Sin embargo, temperaturas tan extremas y durante lapsos de tiempo tan prolongados como los que impone la solarización en las condiciones de nuestro ensayo escapan claramente a la situación más extrema que, previsiblemente, se le pueda haber impuesto a estos nematodos durante su evolución.

Los datos correspondientes a los tratamientos no solarizados indican que, si bien no se produjeron los descensos bruscos que ocurrieron en la solarización, a medida que aumentó el tiempo de permanencia en el montículo la viabilidad del inóculo disminuyó de manera proporcional. Este hecho confirma evidencias experimentales anteriores, en las que menciona que, aun sin alcanzar temperaturas que superaran el umbral letal, la permanencia prolongada a temperaturas moderadamente altas causa importantes reducciones en la viabilidad de los huevos de *Meloidogyne* spp. (Bergeson, 1959; Daulton y Nussbaum, 1961;

Bird, 1974; Stephan, 1982). Por otra parte, hay que tener en cuenta que el consumo de las reservas metabólicas de las que el huevo debe disponer hasta emerger e infectar un huésped susceptible, presenta una tasa más elevada cuanto mayor sea la temperatura. Estos hechos presentan importantes implicaciones desde el punto de vista práctico. En regiones de clima mediterráneo, caracterizadas por altos aportes de radiación solar durante el período estival, la exposición al sol de sustratos infestados puede reducir de manera importante la concentración de inóculo de nematodos fitoparásitos en relativamente poco tiempo aun sin recurrir al sellado con plástico. La eficacia de esta particular "solarización" de suelos sin cobertura plástica fue comprobada en Uzbekistán durante el período estival sobre *Meloidogyne* spp. (Rizaeva, 1983). Aruntyunov (1985) en Turkmenia, durante los meses de julio y agosto, consiguió desinfestar un suelo que contenía *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* colocándolo sobre una superficie de hormigón en una capa de 15 cm de espesor y exponiéndolo a la radiación solar sin cubrir. Esta posibilidad merece ser considerada si alguna circunstancia hace impracticable la solarización convencional. Por último, y como regla práctica de aplicación general, hay que resaltar que cuanto mayor sea el período que transcurra entre la extracción del sustrato y el comienzo de la crianza de los plantones de olivo, menor será la posibilidad de que haya inóculo viable para infectar al plantón. En sustratos viverísticos que provengan de la extracción de suelo de un terreno natural, si suponemos que con posterioridad a la extracción no se permite el crecimiento de malas hierbas, la densidad de inóculo se irá reduciendo sostenidamente hasta que no exista sobre el suelo otro huésped susceptible, en este caso el olivo.

El presente trabajo evaluó el potencial de la solarización como método de desinfestación de suelos que contenían *M. incognita*. Cabe, por consiguiente, preguntarse si este método, que demostró su eficacia en esta condición, resultaría igualmente apropiado en sustratos que contuvieran otros nematodos fitoparásitos de importancia económica para el olivo. La experiencia de Stapleton *et al.* (1999) brinda un argumento a favor de una respuesta positiva a esta pregunta, ya que en su experimento los autores consiguieron controlar a *T. semipenetrans*, *P. vulnus* y *C. xenoplax* en condiciones bastante similares a las nuestras. Por otra parte los resultados de Teva (2000) demuestran que *P. vulnus* puede controlarse con exposiciones de 2-4 min a 45 °C, una condición que se cumple sobradamente en los sectores superficiales de los montículos solarizados en nuestro experimento. La posibilidad de controlar adecuadamente a *Pratylenchus* spp. en el interior del montículo debería ser confirmada, pero cabe esperar que ocurra ya que los requerimientos térmicos para el control de *M. incognita* comprobados por Noling (1997) son más exigentes que los que halló Teva (2000) en el trabajo mencionado. En cuanto a la

posibilidad de que la solarización controle adecuadamente, en las condiciones de nuestro ensayo, otros patógenos de importancia para el olivo, los favorables resultados obtenidos sobre *V. dahliae* (Bejarano, datos no publicados) parecen confirmarla.

#### **4.4.2. EFECTO PROTECTOR DE LA MICORRIZACIÓN**

##### **4.4.2.1. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento de las plantas no inoculadas**

Los resultados del primer experimento sobre las plantas no micorrizadas confirman parcialmente los resultados que se obtuvieron en la prueba de patogenicidad descritos en el Capítulo precedente. En efecto, el parasitismo de *M. incognita* y *P. vulnus* en plántones de olivo 'Picual' y 'Arbequina', originó una reducción significativa del crecimiento del diámetro caulinar, con respecto al control no inoculado. En cambio, si bien se volvió a observar que el parasitismo por los nematodos afecta significativamente el incremento del número de nudos en el tallo, contrariamente a lo que se observó en el ensayo de patogenicidad, este efecto se presentó sobre 'Picual' y no sobre 'Arbequina'. En el segundo experimento no se reprodujeron los efectos negativos del parasitismo por los nematodos sobre el crecimiento de las plantas respecto de los controles no inoculados. Esta aparente falta de consistencia entre los resultados en los diferentes experimentos puede responder a diferencias entre el material vegetal empleado en ellas.

La inoculación con los hongos micorrícicos promovieron el crecimiento de las plantas de olivo en el primer experimento. Este hecho constituye un aporte suplementario a otras evidencias experimentales que refieren la importancia de las micorrizas en el establecimiento de frutales obtenidos por micropropagación (Fortuna *et al.*, 1996; Monticelli *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1993). Sin embargo, resulta de particular interés tratándose del olivo, una especie leñosa sobre la cual los beneficios de las micorrizas están, en términos relativos, poco considerados (Roldán-Fajardo y Barea, 1986). La promoción del crecimiento en plantas de vivero mediante estas asociaciones simbióticas constituye una alternativa prometedora en favor de la precocidad.

El análisis discriminado mostró que la micorriza C, constituida por una mezcla de de inóculo de *G. intraradices* y *G. fasciculatum*, era la que mostraba mayor efecto promotor del crecimiento. En el primer experimento esta micorriza fue en efecto, la única que promovió el crecimiento en ambos cultivares y la que determinó, sobre 'Arbequina', crecimientos significativamente más altos que los controles en mayor número de parámetros. Estos

resultados se confirmaron en el segundo experimento. El mejor comportamiento de esta micorriza puede obedecer al hecho de que provenga de un inóculo mixto compuesto por la mezcla de dos hongos micorrícicos. Se ha señalado que la inoculación con este tipo de micorrizas resulta recomendable, ya que constituye una aproximación apropiada a la condición natural de los agroecosistemas que contienen comunidades poliespecíficas de hongos micorrícicos vesículo-arbusculares (Schenck y Kinloch, 1980). Ciertos estudios muestran que las micorrizas múltiples promueven el crecimiento en mayor medida que los aislados constituidos por una única especie de hongo micorrícico (Daft Y Hogarth, 1983; Koomen *et al.*, 1987). Cabe especular que su mejor comportamiento responde a su diversidad, la cual le permitiría acceder una mayor ocupación de nichos y una mejor exploración rizosférica. Por otra parte, algunos antecedentes refieren el mejor comportamiento de las micorrizas mixtas frente a condiciones particulares de estrés, como la presencia en el suelo de fungicidas (Schreiner y Bethlenfalvay, 1997). Sin embargo, si bien el principio de elección de micorrizas mixtas puede servir como criterio orientativo, no hay que dejar de considerar que cada combinación de planta huésped y tipo de suelo presenta una respuesta particular y en ciertas ocasiones ocurre que las micorrizas monoespecíficas promueven el crecimiento vegetal en mayor medida (Yocom, 1985; Davies *et al.*, 2000).

La micorriza E, *G. intraradices*, promovió el crecimiento de los plantas no inoculadas con nematodos únicamente en 'Arbequina', lo que sugiere que su aptitud pudiera ser "cultivar-dependiente". Si bien se reconoce que, en términos estrictos, no existe especificidad en la asociación entre micorrizas y plantas huéspedes, se admite que diferentes especies de plantas, o incluso diferentes cultivares dentro de una misma especie, pueden presentar gran variación en su susceptibilidad ser infectados por un determinada especie de endomicorriza (Azcón y Ocampo, 1981). Ésto puede traducirse, a su vez, en diferencias en la compatibilidad funcional de las simbiosis micorrícicas (Gianinazzi-Pearson, 1984) y provocar que la efectividad de una micorriza sobre diferentes genotipos de una misma planta huésped no sea la misma (Sylvia, 1998), tal como sugieren los resultados de nuestro trabajo. Esta amplitud en el rango de respuesta funcional de diferentes plantas a diferentes asociaciones con hongos endomicorrícicos también explica que la micorriza M, *G. mossae*, no determinara ninguna de las promociones de crecimiento verificadas con las micorrizas C y E. Pérez (2000) comprobó la eficiencia de *G. mossae* como inóculo micorrícico de plantas de 'Picual' y 'Arbequina' en dos sustratos de crianza diferentes, arena y compost comercial. En contraste con nuestros resultados, el autor comprobó que la micorrización sobre sustrato inorgánico determinaba en 'Picual' incrementos de la longitud del tallo significativamente mayores que los verificados en el control. A su vez la micorrización determinó en su trabajo

incrementos significativos en la masa radical de ambos cultivares. Esta discrepancia en los resultados puede obedecer a diferencias entre los niveles de colonización de la raíz que se presentaban en ambos experimentos. Éste parámetro no fue evaluado en nuestro trabajo y eso impide comparar adecuadamente ambas situaciones.

#### **4.4.2.2. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento de las plantas inoculadas**

Las endomicorrizas protegen a las plantas del perjuicio causado por diversos patógenos, y ésta parece ser una de las funciones fundamentales de estas consociaciones en los ecosistemas (Newsham *et al.*, 1995; Sylvia y Chellemi, 2001). El fenómeno de la protección por micorrizas contra estreses provocados por patógenos de suelos está ampliamente reconocidos en enfermedades fúngicas (Kaye *et al.*, 1984), si bien también existen múltiples referencias al mismo en patosistemas constituídos por nematodos (Francl, 1993). Los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo empleando plantas micorrizadas muestran que este efecto protector tiene lugar en el olivo, aunque su ocurrencia en cada caso particular depende del cultivar, la micorriza y la especie de nematodo que se consideren, tal como discutiremos a continuación.

El primero de los experimentos mostró que la micorriza C protege tanto a 'Arbequina' como a 'Picual' del efecto patogénico de *M. incognita* sobre el crecimiento de los plantones, mientras que el segundo confirmó este resultado sobre 'Picual' y lo hizo extensivo respecto a *M. javanica*. Puede afirmarse incluso que el efecto protector de la micorriza C superó al que cabe esperarse en este tipo de interacciones. Francl (1993) afirma, como regla general, que las plantas micorrizadas infectadas por nematodos rinden más que las no micorrizadas infectadas por éstos pero menos que las micorrizadas no infetadas. La tendencia general de nuestros resultados muestra que el efecto de la micorriza C sobre el patosistema olivo-*Meloidogyne* coincide con la primera premisa y ésta en desacuerdo con la segunda, determinando así un resultado mejor al que cabía pronosticar. Cabe especular que el destacable comportamiento de esta micorriza mixta frente a la patogenicidad provocada por *Meloidogyne* spp. resida en la aptitud particular de cada una de las especies que la componen o que ésta pudiera deberse al efecto sinérgico de la combinación. La primera de las hipótesis se refuerza con antecedentes experimentales obtenidos en plantas herbáceas. En efecto, la micorrización con *G. fasciculatum* mostró proteger a las plantas del efecto patogénico de *Meloidogyne* spp. en cebolla (*Allium cepa* L.) (Kotcon *et al.*, 1985; McGuidwin *et al.*, 1985) y algodón (Saleh y Sikora, 1984), mientras que un comportamiento similar pudo

observarse con *G. intraradices* en algodón (Smith *et al.*, 1986) y melón (*Cucumis melo* L.) (Heald *et al.*, 1989). Sin embargo la respuesta de los patosistemas constituidos por *Meloidogyne* spp. y huéspedes leñosos a estas dos especies de micorrizas no resulta tan clara. Por una parte encontramos antecedentes que refieren la ausencia de efecto protector como el recogido por Atilano *et al.* (1981) en plántones de vid inoculados con *M. arenaria* y micorrizados con *G. fasciculatus* o el que surge de nuestro trabajo, donde la micorriza E, constituida por inóculo monoespecífico de *G. intraradices*, sólo restringió el efecto patogénico de *M. incognita* en 'Arbequina'. Estos fracasos en conseguir un efecto consistente de protección frente a *Meloidogyne* spp. con inóculos micorrícicos monoespecíficos de *G. fasciculatum* o *G. monoradices* parecen apoyar la segunda de las hipótesis acerca que de la buena aptitud de la micorriza C puede ser debida a su condición de micorriza mixta. La formulación de inóculos poliespecíficos ya había sido sugerida en varias ocasiones como un enfoque apropiado para conseguir una mejor protección de las micorrizas contra nematodos fitopatógenos (Cooper y Grandison, 1986; Grandison y Cooper, 1986). Los resultados de Calvet *et al.* (2001) muestran que este criterio puede ser aplicable en frutales, ya que en su trabajo consiguen proteger a plántones de melocotonero del efecto patogénico de *M. javanica* mediante la inoculación con una micorriza mixta compuesta por *G. intraradices*, *G. mosseae*, y *G. etunicatum* Becker y Gerdemann.

Por último el cuadro de variabilidad en el comportamiento de las plantas de olivo micorrizadas frente a *Meloidogyne* spp. se completa con los resultados obtenidos en el presente trabajo con la micorriza M, *G. mosseae*, que no protegió ni a 'Picual' ni a 'Arbequina' del efecto patogénico de *M. incognita*. Este resultado, que resulta más difícil de contrastar con antecedentes experimentales debido a la escasez de trabajos en los cuales se haya empleado a esta especie, se contrapone con los resultados de O'Bannon *et al.* (1979), que refieren haber protegido adecuadamente a plántones de limón del efecto patogénico de *T. semipenetrans* mediante la inoculación con *G. mosseae*. Esta especie, por otra parte, es una de las que integra la micorriza mixta empleada por Calvet *et al.* (2001) para proteger al melocotonero. Sin embargo, como hemos referido, en este caso particular la aptitud de la micorriza puede obedecer a su naturaleza de poliespecífica y no cabe, por lo tanto, concluir que *G. mosseae* por sí sola pudiera haber tenido un comportamiento apropiado.

La premisa de Francl (1993) acerca de la tendencia general del crecimiento de las plantas micorrizadas en respuesta a la coinfección con nematodos, se cumplió con *P. vulnus* en nuestro ensayo sólo parcialmente. En todos los casos, efectivamente, las plantas micorrizadas e inoculadas con el nematodo crecieron menos que los correspondientes controles micorrizados no inoculados. En cambio, el otro tipo de respuesta previsible que es

la que evidencia la ocurrencia de un mecanismo de protección (mayor crecimiento en las plantas micorrizadas e inoculadas que en las inoculadas sin micorrizar), sólo tuvo lugar en 'Picual' y cuando se empleó la micorriza C, sin que se pudiera comprobar su ocurrencia en ninguna de las otras cinco combinaciones posibles de cultivar y micorriza. Estos resultados que, en primera instancia, se contraponen a numerosos antecedentes que refieren cómo las micorrizas reducen las mermas de crecimiento en frutales coinfectados por nematodos endoparásitos migratorios con respecto a los controles no micorrizados (Pinochet *et al.*, 1996), constituyen una evidencia adicional acerca de la complejidad del fenómeno y confirman la necesidad de seguir explorándolo dentro de una abanico mayor de condiciones. A este respecto cabe mencionar que existen factores del diseño experimental no considerados como variables en nuestro trabajo, que condicionan profundamente la respuesta de los patosistemas planta-nematodo a la micorrización, como son el nivel de inóculo, la fertilidad del suelo, el porcentaje de tejido radical infectado por la micorriza y la duración del lapso de tiempo transcurrido entre la micorrización y la inoculación con el nematodo (Smith, 1987).

Está comprobado que factores densidad-dependientes afectan la respuesta de plantas herbáceas micorrizadas a la infección por nematodos (McGuidwin *et al.*, 1985) y, si bien esto mismo no pudo comprobarse en frutales (Smith y Kaplan, 1988), cabe especular que niveles de protección que no se consiguen con densidades de inóculo relativamente altas pueden lograrse cuando las poblaciones del agente son menos numerosas. La dotación de P es otro de los factores que afecta la respuesta de plantas micorrizadas a la infección por nematodos. La contribución de las micorrizas a la tolerancia de las plantas frente a la infección por nematodos reside en gran medida en la capacidad de estos simbiosistas de mejorar la absorción de P por parte del huésped. Se ha comprobado que en frutales infectados por nematodos endoparásitos migratorios el efecto protector de las micorrizas frente a la acción de nematodos, que se verifica en condiciones de baja dotación de P, puede no producirse cuando los niveles de este nutriente son adecuados (Smith y Kaplan, 1988; Calvet *et al.*, 1995; Pinochet *et al.*, 1996c; Pinochet *et al.*, 1998). Cabe suponer, en las condiciones de nuestro estudio, que por más que el P fuese añadido a la solución nutritiva en una concentración inferior a la habitual, la aportación de este nutriente haya quedado por encima del umbral que posibilita la expresión del efecto protector de las micorrizas contra la infección por nematodos endoparásitos migratorios. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que todos los frutales, y el olivo en particular, se muestran como cultivos con muy bajos requerimientos de este nutriente (Fernández-Escobar, 1998). Resulta apropiado suponer, por otra parte, que en aquellos casos donde el efecto protector de la micorriza es

cultivar-dependiente ello obedezca a diferencias en el requerimiento de P entre 'Picual' y 'Arbequina'.

La ocurrencia del mecanismo de protección de las micorrizas frente al daño provocado por nematodos fitopatógenos puede depender de otro factor no considerado en nuestros experimentos como es el nivel de colonización de la raíz. Se presume que este factor puede condicionar la aparición del fenómeno, desde el momento en que se asume que una competencia por espacio puede ser la que determine reducciones en la tasa de infección por parte del nematodo. Esta hipótesis recoge evidencias experimentales en contra y a favor, ya que mientras algunos trabajos concluyen que la protección contra el nematodo es independiente del porcentaje de raíz colonizada por la micorriza (Smith *et al.*, 1986; Zambolin y Oliveira, 1986; Cooper y Grandison, 1987), otros autores encuentran que el efecto protector solo se verifica cuando el porcentaje de micorrización excede un determinado umbral (Saleh y Sikora, 1984; Smith, 1987).

Cabe, por último, mencionar una última restricción a la extrapolación de nuestros resultados a condiciones reales de vivero, que es el hecho de haber realizado el experimento sobre sustrato pasteurizado. Esto impide conocer el papel que podrían representar en el sistema las micorrizas indígenas presentes de manera espontánea en un sustrato no estéril. La revisión de los antecedentes nos brinda algunos indicios sobre en este sentido. Sieverding (1991) destaca que las micorrizas indígenas, mejor adaptadas a las condiciones ambientales propias del sustrato, pueden resultar más apropiadas que los aislados micorrícicos introducidos y Pinochet *et al.* (1996c) resaltan este hecho como un criterio importante en la formulación de prácticas de protección de frutales basadas en estas simbiosis mutualistas. Este criterio general, de cualquier forma, requiere ser refrendado experimentalmente para cada condición particular ya que, en ciertas condiciones, las micorrizas alóctonas se comportan más adecuadamente que aquéllas que ya están presentes en el suelo o el sustrato (Calvet *et al.*, 2001).

#### **4.4.2.3. Efecto de la micorrización sobre la reproducción de los nematodos**

Los resultados de la reproducción de los nematodos en plántulas de 'Arbequina' en el primer experimento no permiten distinguir una tendencia clara acerca del efecto de la micorrización sobre los parámetros considerados. Sólo pudo comprobarse la mayor reproducción de *P. vulnus* en las plantas micorrizadas con las micorrizas C y M, que en las plantas control no micorrizadas. Esta promoción de la reproducción del nematodo en las plantas micorrizadas contribuye a explicar parcialmente porque no se detectó efecto

protector frente a *P. vulnus* en 'Arbequina'. No cabe atribuir este hecho a la presencia de un sistema radical más abundante en las plantas micorrizadas, ya que el peso fresco final de la raíces no presentó diferencias significativas entre las plantas micorrizadas y las no micorrizadas. Un resultado de estas características no registra antecedentes y merece ser confirmado en nuevos experimentos. La literatura menciona que la tasa de reproducción de nematodos endoparásitos en huéspedes leñosos micorrizados es inferior a la que se registra en los controles no micorrizados (Smith y Kaplan, 1988; Pinochet *et al.*, 1993b, 1995a), o bien similar (Camprubí *et al.*, 1993; Calvet *et al.*, 1995; Pinochet *et al.*, 1995b).

La micorrización de 'Arbequina' no afectó significativamente ninguno de los parámetros de reproducción de *M. incognita* durante el primero de los experimentos, ni siquiera en aquellos casos donde se había comprobado efecto sobre el crecimiento de las plantas. Este hecho sugiere que las micorrizas C y E, que protegieron a 'Arbequina' del efecto patogénico del nematodo, lo hicieron a través de un mecanismo de incremento de la tolerancia; vale decir que las micorrizas compensan el deterioro funcional que provoca el nematodo sobre la raíz y determinan que el crecimiento no se vea reducido pero sin afectar la infección por parte del nematodo ni su posterior desarrollo y reproducción. Habitualmente se asigna al P un papel preponderante en estos mecanismos de compensación (Smith, 1987; Smith y Kaplan, 1988; Francl, 1993), si bien se admite que pueden contribuir la mejor absorción de algunos micronutrientes (Smith *et al.*, 1986) y del agua (Hayman, 1982). Para la mejor comprensión de los mecanismos por los cuales las micorrizas aumentan la tolerancia a los nematodos debieran plantearse condiciones experimentales donde se contemplaran más detalladamente niveles variables en la provisión de determinados factores potencialmente limitantes.

Los resultados de la reproducción de nematodos sobre 'Picual' muestran que, en este cultivar, la micorrización afectó el nivel de infección de la raíz por parte del nematodo casi en todos los casos, si bien la naturaleza del efecto varió de dependiendo de la especie del nematodo y la micorriza. La micorriza C redujo significativamente la infección tanto de *P. vulnus* como de *M. incognita*. Este resultado obtenido sugiere que, en el caso de 'Picual', la inhibición del nematodo podría ser un motivo concurrente a la tolerancia en la explicación de los mecanismos del efecto protector. Sin embargo las diferencias en la tasa de reproducción no resultan significativas. Esto nos indica que las diferencias en el nivel de infección obedecen más probablemente a diferencias en el tamaño del sistema radical. El sistema radical de las plantas micorrizadas en el tratamiento 2 (plantas inoculadas con *M. incognita* y sin micorrizar) es significativamente más pequeño que en el tratamiento 5 (plantas inoculadas con *M. incognita* y micorrizadas con la micorriza C) i.e., un número similar de

juveniles emergidos a partir del inóculo dispusieron en las plantas micorrizadas de una superficie radical mayor y quedaron, por consiguiente, más "diluidos" en el volumen total de la raíz. La tendencia comprobada en el segundo experimento de micorrización, tanto con *M. incognita* como con *M. javanica*, resulta idéntica. Una explicación similar resulta aplicable para *P. vulnus*, ya que en este caso el peso final de las raíces en las plantas micorrizadas con la micorriza C e inoculadas superó significativamente al de las plantas inoculadas sin micorrizar.

La micorriza E promovió significativamente la infección de *M. incognita* y la micorriza M promovió la de los dos nematodos. Estos resultados, que no se ajustan a las patrones previsibles, pueden estar obedeciendo, del mismo modo que en el caso de las plantas micorrizadas con la micorriza C, a diferencias en el volumen de la raíz disponible para ser infectado por una misma cantidad de juveniles infectivos. En este caso, contrariamente a lo que ocurrió con la micorriza C, las plantas micorrizadas disponían de un volumen radical más reducido.

#### **4.4.3. EFECTO DE LA ENMIENDA DEL SUSTRATO CON COMPOST DE CORCHO SOBRE LA PATOGENICIDAD DE *M. INCOGNITA***

La adición de compost de corcho al sustrato afectó negativamente al desarrollo y reproducción de los nematodos en todos los parámetros considerados y este efecto fue mayor cuanto mayor fue la concentración de compost en el sustrato. Este resultado viene a confirmar la eficacia de las enmiendas orgánicas como alternativa adecuada a los métodos tradicionales de desinfección de nematodos en suelos y sustratos agrícolas (Akthar y Malik, 2000; D'Addabo, 1995; Akthar y Alam, 1993; Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987; Muller y Gooch, 1982). Cabe mencionar, en particular, el éxito obtenido en estudios en los que se emplearon materiales semejantes al empleado en nuestro trabajo, bien por su origen –esto es, residuos de la industria forestal o maderera (Miller *et al.*, 1973; Huebner *et al.*, 1983; Roan *et al.*, 1992)- o bien por su proceso de elaboración previo al empleo como enmiendas, vale decir compost aeróbicos (Van der Laan, 1956; McSorley y Gallaher, 1995).

Parece poco apropiado atribuir el fenómeno de supresión nematológica observado en nuestro experimento a fenómenos de control biológico. Muchos autores han encontrado que la la adición de grandes volúmenes de enmiendas orgánicas sirve como fuente nutritiva para microorganismos antagonistas de nematodos que se prexisten en el suelo, y que este fenómeno explica el control de en algunas ocasiones (Van der Boogert *et al.*, 1994; Godoy *et*

*al.*, 1983; Jaffee *et al.*, 1994; Patel *et al.*, 1991). Esta situación no podría haber tenido lugar en nuestro caso, ya que las enmiendas fueron agregadas a un sustrato pasteurizado. Podría especularse que potenciales agentes de control biológico estuvieran presentes en el compost y que éste hubiese servido como vehículo de los mismos. La presencia de antagonistas eficientes en las enmiendas añadidas al suelo puede conseguirse mediante la inoculación artificial de los mismos (Abu-Laban y Saleh, 1989), pero la ocurrencia espontánea de una situación de esta naturaleza es excepcional, está comprobada de manera incompleta y ha sido reportada en materiales orgánicos de constitución bien diferente a la del compost de corcho, como son estiércoles animales (Zhang y Noe, 1997).

La liberación de  $\text{NH}_4^+$  a partir de la descomposición microbiana de las enmiendas constituye uno de los mecanismos de acción más estudiados entre todos los que contribuyen a explicar el efecto supresivo de los abonos orgánicos (Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987; Stirling, 1991). Esta situación puede haber tenido lugar en nuestro experimento. Rodríguez-Kábana *et al.*, (1987) afirman que el efecto nematocida de las enmiendas tiene lugar cuando la relación C/N de las mismas es inferior a 20. La enmienda empleada en nuestro caso presenta una relación C/N cercana a 15 (Ordovás, *com. pers.*).

En muchas ocasiones, el efecto nematocida de las enmiendas orgánicas responde no a la liberación de sustancias nitrogenadas inorgánicas de bajo peso molecular, sino al desprendimiento de compuestos orgánicos complejos derivados del metabolismo secundario de las plantas superiores. Este fenómeno explica la supresividad que provocan los restos vegetales de ciertas plantas acreditadamente nematocidas (Halbrendt, 1996). Mian y Rodríguez-Kábana (1982) demostraron que la elección de restos industriales con altos contenidos de taninos y sustancias fenólicas es un criterio apropiado para la formulación de métodos eficientes de supresión de nematodos mediante enmiendas orgánicas. Si bien no existe una apropiada caracterización cuali-cuantitativa de los compuestos orgánicos complejos presentes en el compost de corcho, sí se sabe que el corcho comercial puede poseer múltiples sustancias fenólicas (Peña-Ñeira *et al.*, 2000; Varea *et al.*, 2001) y que algunos de los tejidos corticales que constituyen gran parte del residuo de su elaboración acumulan una importante cantidad de taninos. El efecto supresor verificado en nuestro experimento puede obedecer también a la presencia de este tipo de sustancias.

En este sentido y en nuestro caso particular interesaría conocer si esta supresividad atribuible a la presencia de sustancias fenólicas o tánicas responde simplemente a un efecto directo sobre los nematodos o si también concurren en ella mecanismos indirectos mediados por la respuesta del huésped, i.e., la generación de resistencia adquirida. Se ha demostrado

que las plantas que crecen en sustratos con altas concentraciones de sustancias fenólicas, invariablemente incrementan el contenido de sustancias análogas en los tejidos radicales (Alam *et al.*, 1977; Sitaramaiah y Singh, 1978) y ésto determina que, en muchas ocasiones, estas plantas registren tasas reducidas de infección por nematodos aun después de haber sido transferidas a un sustrato sin enmiendas (Sitaramaiah y Singh, 1974; Singh *et al.*, 1983). Si se corroborara que esta situación ocurre efectivamente en nuestro caso, la práctica de desinfestación de sustratos viverísticos mediante la adición de compost de corcho resultaría particularmente recomendable, ya que, al efecto probado de saneamiento se añadiría uno suplementario de protección, i.e., la planta adquiriría una resistencia que le permitiría hacer frente a potenciales infecciones posteriores al trasplante en las primeras etapas de desarrollo en el terreno definitivo, donde resulta importantísimo asegurar una adecuada implantación. La comprobación experimental de la presunta presencia de mecanismos de inducción de resistencia aparece, por lo tanto, como un objetivo primordial a ser considerado en el diseño de los experimentos que vayan a ser planteados a futuro dentro de esta línea de investigación.

La fitotoxicidad de las enmiendas orgánicas se menciona a menudo como una de las limitantes más importantes a su utilización en el control de enfermedades (Rodríguez-Kábana *et al.*, 1987; Lazarovits *et al.*, 2000). En particular, y si nos restringimos a materiales análogos al empleado en nuestro ensayo, la aparición de este tipo de fenómenos ha sido descrita en materiales caracterizados por altas concentraciones de tanino (Mian y Rodríguez-Kábana, 1982). Sin embargo, tradicionalmente se asume que la fase de estabilización previene la fitotoxicidad en los materiales sometidos a proceso de compostaje aeróbico (Haugh, 1993; Paredes *et al.*, 2000). Por otra parte, la posibilidad de que existieran efectos de esta naturaleza en el compost de corcho estudiado en nuestro trabajo había sido descartada mediante la realización de bioensayos efectuados por el equipo productor del mismo (Ordovás, *com. pers.*). La evaluación del crecimiento de los plantones en nuestro experimento no permite determinar claramente que exista una relación causa-efecto entre la concentración de compost en el sustrato y el incremento de biomasa en los plantones. No obstante, si bien no se registraron síntomas inequívocos de fitotoxicidad en la planta, ninguno de los parámetros de crecimiento se vio incrementado progresivamente a concentraciones crecientes del compost en el sustrato, tal como hubiera cabido esperar dada la reducción en las tasas de infección por el nematodo, que sí mostraron esa tendencia. Ésto sugiere que el efecto benéfico potencial que resultaría de la supresión del nematodo puede ser parcialmente anulado por la generación de un medio edáfico que, sin llegar al extremo de ser fitotóxico, sí resulta subóptimo para el desarrollo de los plantones. Las

funciones dosis-respuesta obtenidas en experimentos que estudiaron varios niveles de concentración de enmienda (Kaplan y Noe, 1993; Rodríguez-Kábana *et al.*, 1995) indican que la elección de la dosis óptima requiere una solución de compromiso entre el efecto benéfico de la supresión del patógeno y la inhibición del crecimiento de la planta por encima de un determinado umbral. Muchas veces encontraremos que la dosis óptima no es la que determina la máxima mortalidad del nematodo y en nuestro caso, probablemente, lo más recomendable sea emplear una concentración del 25 % de compost en el sustrato que, sin llegar a ocasionar la máxima mortalidad del nematodo, logra un control destacable (ca. 20 %) y a la vez demuestra a través de todos los parámetros que no afecta al crecimiento de los plantones.

Cabe mencionar, como limitante a la extrapolación de nuestros resultados a su aplicación real, que la eficacia de las enmiendas orgánicas como elemento supresor de enfermedades se ve profundamente afectada por su origen y por la naturaleza de los procesos de elaboración a que hayan sido sometidas (Nico, 2002). Materiales que se engloban bajo una misma denominación genérica pueden diferir ampliamente en características físicoquímicas determinantes para su aptitud como medio de control de enfermedades. Por este motivo, los resultados obtenidos en el presente trabajo requieren ser confirmados cada vez que se pretenda emplear un compost de corcho de origen diverso u obtenido bajo condiciones diferentes. La pertinencia de esta prevención es resaltada por la información acerca de la diversidad constitutiva del corcho en función de su origen geográfico (Conde *et al.*, 1999).

#### **4.4.4. DESINFESTACIÓN DEL SUSTRATO POR BIOFUMIGACIÓN**

El sorgo figura entre la lista de plantas con efecto alelopático reconocido sobre nematodos. Sus tejidos contienen un heterósido, la durrina, que por descomposición microbiana libera ácido cianhídrico (Davis, 1991). El efecto nematosupresor de los residuos del sorgo ha sido aprovechado generándolos *in situ* mediante la inclusión del cultivo en rotaciones o abonos verdes (Mojtahedi *et al.*, 1993, Viaene y Abawi, 1998; Rodríguez-Kábana *et al.*, 1991), o bien a través de la generación *ex situ* y posterior incorporación (Ritzinger y McSorley, 1998). Los resultados del presente trabajo confirman todos estos resultados, ya que muestran que la adición de paja de sorgo al sustrato viverístico determinaron reducciones significativas en la viabilidad del inóculo de *M. incognita* que se verifican en todas las situaciones, con independencia de la dosis que empleada y del uso o no de cobertura plástica.

Los niveles de control que se consiguieron con la práctica de biofumigación resultan,

sin embargo, muy inferiores a los que se lograron con la solarización. Los resultados del experimento de biofumigación admiten ser comparados con los obtenidos en el experimento de solarización del año 2000, ya que en ambos casos la viabilidad del inóculo se registró mediante bioensayos similares sobre un huésped del nematodo. Esta comparación nos permite comprobar que los valores de población final relativa registrados en la prueba de con 6 días de solarización son más bajos que los que tienen lugar con 60 días en el más eficiente de los tratamientos de biofumigación evaluados. La comparación de las pendientes de las curvas de regresión obtenidas en cada uno de los experimentos, por otra parte, nos da otra perspectiva esclarecedora sobre la eficacia relativa de ambas prácticas: la población final relativa desarrollada en la planta inoculada con el inóculo tratado presentó en los tratamientos no solarizados de la prueba del año 2000 una tasa diaria de reducción de la viabilidad del 4,0 % a 20 cm y el 3,3 % a los 40 cm, mientras que esta misma tasa en los tratamientos biofumigados considerados en forma global fue del 0,9 %, en los tratamientos sin cobertura plástica y del 1,0 %, en los tratamientos con cobertura plástica. Mantener el suelo expuesto al sol en los meses de verano sin cobertura plástica fue entre 3 y 4 veces más eficiente como método de desinfestación que la biofumigación.

Este análisis comparativo de las dos prácticas de desinfestación referidas conduce a recomendar la elección de la solarización, un método que requiere un consumo similar de recursos y brinda un resultado muy superior. Cabría considerar a la biofumigación como una opción apropiada para aquellas situaciones donde la programación de tareas en un vivero impida esperar hasta que las condiciones ambientales sean las adecuadas para la solarización o como una alternativa para zonas marginalmente aptas por el clima. Sin embargo, cabe señalar que el nivel de control conseguido en nuestro trabajo con la biofumigación requirió 3 meses durante los cuales temperatura ambiente se mantuviera constante a 25 °C. Es improbable concebir la ocurrencia de estas condiciones en áreas o épocas del año marginales para la solarización, sin recurrir al consumo suplementario de energía.

Considerar a la biofumigación por sí sola como un método eficiente de desinfestación requeriría modificar las condiciones con que se realizó en nuestro trabajo, a fin de conseguir un mayor porcentaje de control en menos tiempo. En principio, cabe considerar la incorporación de residuos vegetales diferentes de la paja de sorgo. En este sentido resultan particularmente prometedores los restos de crucíferas del género *Brassica* y otros, reconocidos por la presencia de glucosinolatos en sus tejidos y por la consiguiente posibilidad de liberar isotiocianatos con posterioridad a su incorporación (Mayton *et al.*, 1996; Sang *et al.*, 1984; Lazzeri y Manici, 2000 y veáse también 4.1.5.2). Esta alternativa

está siendo actualmente evaluada por nuestro grupo de trabajo. Por otra parte, cabe evaluar alternativas en cuanto a la elección de la cobertura plástica. En nuestro trabajo se comprobó que la colocación del plástico no contribuye en todas las situaciones a aumentar la eficacia de la práctica. Gamliel *et al.* (2000) señalan que permeabilidad selectiva a los gases de los diferentes materiales plásticos empleados en las cubiertas agrícolas es un aspecto poco explorado, subestimado y de cuyo conocimiento más apropiado podrían surgir importantes propuestas que mejoraran la eficiencia de la biofumigación.

#### **4.4.5. CONSIDERACIONES FINALES**

Una estrategia apropiada para el manejo de los nematodos fitopatógenos en viveros de olivo difícilmente pueda limitarse a la aplicación de una única técnica de control. Katan (1987) sostiene que “desarrollar una medida de control super efectiva no es viable y puede incluso resultar demasiado drástico”. Obtener patrones satisfactorios de sanidad en viveros de olivo necesariamente requiere depositar una especial atención en todas las etapas que tienen lugar hasta que el plantón sale a la venta e integrar armónicamente diferentes prácticas racionales de manejo que contribuyan a reducir la incidencia de los patógenos. Estos presupuestos básicos responden a los principios recomendados bajo la denominación genérica de “manejo integrado” (Roberts, 1983).

En un esquema racional de manejo de nematodos en un vivero de olivo cabe, por empezar, contemplar medidas de exclusión. Ninguna medida resulta más efectiva que el empleo de sustratos libres de patógenos para garantizar la sanidad de los plantones. Existen evidencias de que las especies con mayor capacidad potencial de daño, en particular nematodos noduladores y lesionadores, se reproducen fundamentalmente sobre terrenos cultivados y que la abundancia de las poblaciones de tales especies se vincula estrechamente a la “historia” agrícola de cada suelo. Esto nos indica que la provisión de sustrato de enraizamiento en terrenos considerados como de “bajo riesgo” –en particular ambientes naturales poco modificados o con pocos años de uso agrícola- ofrece más garantías de que los plantones no contendrán nematodos patógenos. Sin embargo, como hemos podido comprobar por los resultados del primer capítulo de esta tesis, habitualmente la elección de los sustratos de crianza de plantas de olivo obtenidas por enraizamiento no se rige por criterios de riesgo sanitario, sino por conveniencias de proximidad, disponibilidad, etc. Estas circunstancias son las que imponen muchas veces la necesidad de desinfectar los sustratos de crianza para asegurar la sanidad de los plantones.

Los experimentos efectuados en el presente capítulo nos han permitido comprobar que las tres prácticas de desinfestación evaluadas –solarización, enmienda del sustrato con compost de corcho y biofumigación- presentan un cierto grado de eficiencia en el control de nematodos. Sin embargo, cabe preguntarse si el control que cada una de ellas alcanza separadamente resulta suficiente o cumple con nuestras expectativas. Desde la perspectiva del diseño de normas sanitarias corresponde, por otra parte, establecer niveles de infestación máximos tolerables para ser incluidos en las normas. Estos patrones de tolerancia deben responder a presupuestos biológicos comprobados y su cumplimiento debe resultar posible para el viverista en condiciones de adecuada factibilidad técnico económica y sin que resulten del mismo perjuicios a la salud humana o al ambiente. Lamentablemente, a menudo resulta imposible establecer este tipo de estándares asumiendo relaciones funcionales realistas debido a que se carece de toda la información necesaria. Ferris y Noling (1987) resumen todos los factores que integran los modelos de toma de decisión para el diseño de estrategias de control para nematodos fitopatógenos e incluyen aquí funciones de daño y modelos predictivos sobre la evolución poblacional del patógeno. El grado de conocimiento alcanzado acerca de estos aspectos en el patosistema olivo-nematodos es a todas luces insuficiente y, al tratarse de un cultivo plurianual, surge el inconveniente adicional de que no existen modelos que predigan adecuadamente de qué manera reducciones del crecimiento que se verifican en la etapa de vivero repercuten posteriormente en el rendimiento de los árboles en la plantación definitiva (ver 3.4.4).

Por estas razones, para conocer si las prácticas evaluadas en el presente trabajo nos otorgan un grado aceptable de control debemos recurrir a referencias generales y de carácter orientativo. Hague y Gowen (1987) señalan, siguiendo un criterio concebido fundamentalmente para la aplicación de nematicidas sintéticos en cultivos anuales, que el *control total* se consigue cuando la población final, i.e., la población a final del ciclo del cultivo o la campaña, no supera a la población inicial, o sea la que existía antes de aplicar la medida de control. De esta forma, el porcentaje de control que se requiere para cada especie de nematodo está determinado por su tasa de reproducción a bajas densidades de población. Whitehead (1980), aplicando este criterio, determinó que el porcentaje de mortalidad que se requiere ante infestaciones con *Pratylenchus* spp. es del 95 % (asumiendo que la población se incrementa 20 veces durante el ciclo de cultivo) y el requerido para controlar a *Meloidogyne* spp. es del 99,9 % (asumiendo que la población se incrementa 1000 veces). Ante la falta de un criterio más apropiado, estas pautas puede servirnos de referencia en nuestro caso, asumiendo que, si bien el ciclo de cultivo es más largo en plantas leñosas que en cultivos anuales, las tasas de reproducción de los nematodos

resultan, en compensación, muy inferiores.

La solarización consiguió, en las condiciones de nuestro estudio, controles del nematodo situados entre el 98,5 y el 99,9 %. La desinfestación por enmienda con compost de corcho logró a la máxima dosis, un 98,7 % de reducción de la población del nematodo, mientras que la biofumigación con cobertura plástica y 4 % de paja produjo una reducción de 97,5 % a los 60 días. Estas cifras nos indican que todos los métodos, consiguen, por sí solos niveles de control similares o ligeramente por debajo del porcentaje deseable. Sin embargo, cada uno de ellos presenta alguna limitación que impone la necesidad de mejorar su eficacia. La solarización facilita un control muy eficiente bajo las condiciones de nuestro trabajo, pero su eficacia puede verse reducida sensiblemente bajo condiciones ambientales no tan adecuadas como las de Andalucía. Por otra parte, la programación habitual de las tareas de vivero determina que la etapa de crianza de los plantones obtenidos por estaquillado semileñoso nunca comience antes de la primavera (Sutter, 1994). Llevar a cabo la solarización en la época óptima del año exigiría recolectar el sustrato con una anticipación no menor a los 9 meses y demandaría mantener el sustrato ocioso durante los meses de otoño e invierno y garantizar que no ocurrieran reinfestaciones. El empleo del compost de corcho en aquellas concentraciones en que expresa su máximo potencial desinfestante conlleva el riesgo de la fototoxicidad y la biofumigación, como se ha visto, permite alcanzar niveles bastante apropiados de control pero requiere períodos de tiempo demasiado prolongados bajo condiciones de temperatura constante que difícilmente pudieran lograrse en ambientes no forzados.

Las limitaciones mencionadas nos sugieren que es conveniente integrar las prácticas de desinfestación a fin de incrementar sus posibilidades de aplicación y aumentar su eficacia. En este sentido varios antecedentes nos dan la pauta de que las prácticas empleadas en el presente trabajo no son en principio mutuamente excluyentes ni antagónicas en sus alcances y posibilidades, sino que por el contrario se complementan adecuadamente y admiten ser integradas en forma simultánea o secuencial. La biofumigación y la solarización, que en el presente trabajo fueron presentadas como dos alternativas en competencia a causa del análisis comparativo a que fueron sometidas, son en realidad totalmente complementarias y sus efectos particulares pueden ser combinadas sinérgicamente (ver 4.1.5.2). Gamliel *et al.* (2000) reseñan los mecanismos que explican este efecto sinérgico. Se sabe, por una parte, que las altas temperaturas determinan un mayor desprendimiento de los metabolitos volátiles con acción biológica (Gamliel y Stapleton, 1993; Lodha y Mawar, 2000). Los suelos solarizados, por otra parte, logran un mayor calentamiento cuando se les han incorporado previamente alguna enmienda orgánica debido, probablemente, a una mejor conductividad

térmica o a la promoción de la actividad microbiana exotérmica (Gamliel, 2000).

Hemos comprobado que, cuando se elige la especie adecuada para cada cultivar y situación, la micorrización es una estrategia apropiada de protección. Esta práctica puede, por lo tanto, complementar exitosamente las medidas de exclusión y desinfección de sustratos que se hayan dispuesto para los sustratos de crianza. De esta forma, en un sistema racional de manejo, la micorrización otorgaría un reaseguro frente a eventuales fallos de control en las etapas previas del sistema. La bibliografía nos muestra múltiples ejemplos acerca de la perfecta compatibilidad de la micorrización con las prácticas de desinfección evaluadas en el presente trabajo. Se ha comprobado, por una parte, que las enmiendas orgánicas en muchos casos estimulan la micorrización (Douds *et al.*, 1997; Tarkalson *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2000). Las micorrizas, por otra parte, ayudan a la planta a soportar mejor el estrés por fitotoxicidad que pueden provocar ciertas enmiendas (Sylvia y Williams, 1992; Jeffries, 1987; Bethlenfalvay, 1992). El efecto de la solarización sobre las micorrizas silvestres presentes naturalmente en los suelos o sustratos no está completamente dilucidado, ya que algunos autores afirman que la solarización estimula a estos microorganismos (Afek *et al.*, 1991) y otros mencionan el efecto contrario (Soulas *et al.*, 1997). Sin embargo, cuando las dos técnicas se aplican en forma secuencial, ya sea transplantando plantas micorrizadas a suelos solarizados o infestando los mismos con aislados seleccionados se pueden conseguir óptimos resultados en el control de enfermedades (López-Cosme y González-Torres, 2000). Por otra parte, cabe resaltar que la micorrización es una técnica que prácticamente no registra contraindicaciones sino que, por el contrario, además de los beneficios que otorga en el campo de la protección que nos ocupan aquí en forma particular, brinda muchísimas ventajas adicionales como factor antiestrés y promotor del crecimiento que animan a su adopción (Azcón-Aguilar y Barea, 1997).



# Conclusiones

---

En este trabajo de Tesis Doctoral se han alcanzado las siguientes conclusiones:

1. En los viveros de olivo inspeccionados en las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla destacan por su incidencia en raíz y por su importancia fitopatológica, las infecciones por los nematodos noduladores de raíz (*Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica*), y los nematodos lesionadores de raíz (*Pratylenchus penetrans* y *Pratylenchus vulnus*). Los plantones de olivo infectados por nematodos fitoparásitos constituyen un medio potencial para la dispersión de estos agentes a nuevas áreas olivareras.

2. Los cvs. Arbequina y Picual de olivo no son huéspedes de los nematodos lesionadores de raíz *Pratylenchus thornei*, *Pratylenchus fallax* y *Zygotylenchus guevarai*, pero sí de los nematodos ectoparásitos migratorios *Criconemella xenoplax*, *Helycotylenchus pseudorobustus* y *Helycotylenchus vulgaris*. Por lo tanto, las poblaciones de estas últimas especies pueden incrementarse sobre dichos cultivares de olivo durante la producción en vivero y tras la plantación definitiva.

3. La infección de plantones de los cvs. Arbequina y Picual de olivo por *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus penetrans* y *Pratylenchus vulnus* causa una reducción significativa del crecimiento relativo del diámetro del tallo. Asimismo, la infección de plantones de 'Picual' por *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne javanica* determina la aparición de una clorosis que sugiere alteraciones perjudiciales en la nutrición mineral.

4. La solarización de sustratos de uso viverístico durante 3 semanas dispuestos en montículos de 80 cm de altura bajo las condiciones meteorológicas estivales de Córdoba, determina una reducción de la viabilidad superior al 95 % de los huevos de *Meloidogyne incognita* que sirven como inóculo, independientemente de su localización dentro del montículo y de que estén libres o en masas.

5. La micorrización de plantones de los cvs. Arbequina y Picual de olivo presenta un efecto protector contra la patogénesis causada por *Meloidogyne incognita* y *Pratylenchus vulnus*. Este efecto protector se manifiesta en un incremento significativo del crecimiento relativo en los plantones micorrizados e infectados con nematodos, respecto de los respectivos controles infectados no micorrizados. Dicho efecto protector es dependiente de la composición del inóculo micorrícico, el cultivar de la planta huésped y la especie del nematodo fitoparásito.

6. El inóculo micorrícico mixto de *Glomus intraradices* y *Glomus fasciculatum*, fue el más efectivo, ya que protegió a 'Picual' del efecto patogénico de *Meloidogyne incognita* y *Pratylenchus vulnus* y a 'Arbequina' del efecto patogénico de *Meloidogyne incognita*. La reducción de la patogenicidad no estuvo relacionada con una reducción en la infección por el nematodo, sugiriendo que el efecto protector se debe a un incremento de la tolerancia de la planta al nematodo.

7. La enmienda del sustrato viverístico con compost de corcho redujo significativamente las poblaciones de *Meloidogyne incognita*. Dicha reducción fue directamente proporcional a la concentración de la enmienda en el sustrato, y alcanzó porcentajes superiores al 95 % con una concentración del 75 %. El crecimiento de los plantones mantenidos en los sustratos enmendados con compost de corcho no aumentó significativamente en consonancia con la reducción de la población del nematodo, lo que sugiere alguna acción fitotóxica que anula parcialmente a dosis altas los efectos positivos de la desinfestación.

8. La biofumigación de sustratos viverísticos enmendados con paja de sorgo triturada (2 y 4 %, p/p) determinó una reducción significativa de la viabilidad del inóculo de *Meloidogyne incognita*, independientemente del porcentaje de sorgo empleado y de la utilización de cobertura plástica. No obstante, dicha reducción de viabilidad fue inferior a la que se obtuvo mediante solarización o enmienda con compost de corcho, y requiere un tiempo de exposición más prolongado. Por tanto, esta práctica por sí sola resulta un método insuficiente para la desinfestación de sustratos de uso viverístico.

# Bibliografía

---

- Abawi, G. S. y Mai, W. F. (1975)** Effect of foliar applications of oxamyl on movement of *Pratylenchus penetrans* in and outside host roots. *Pl. Dis. Reprtr.* 59:795-799.
- Abawi, G. S. y Mai, W. F. (1978)** Root diseases of fruit trees in New York State. X. Toxicity of oxamyl to *Pratylenchus penetrans*. *Pl. Dis. Reprtr.* 62:637-641.
- Abawi, G. S. y Mai, W. F. (1990)** Dagger nematodes. pp. 73-74. En: *Compendium of Apple and Pear Diseases* (Jones, A. L. y Aldwinckle, H. S., eds.) APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Abrantes, I. M. de O. y Santos, M. S. N. de A. (1991)** *Meloidogyne lusitanica* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing olive tree (*Olea europaea* L.). *J. Nematol.* 23: 210-224.
- Abrantes, I. M. de O., Vovlas, N. y Santos, M. S. N. de A. (1987)** Morphological studies on six Tylenchid species associated with olive in Portugal. *Ciência Biológica, Ecologia e Systematica* 7:1-9.
- Abrantes, I. M. de O., Vovlas, N. y Santos, M. S. N. de A. (1992)** Host-parasite relationships of *Meloidogyne javanica* and *M. lusitanica* with *Olea europaea*. *Nematologica* 38: 320-327.
- Abu-Laban, A. Z. y Saleh, H. M. (1989)** Evaluation of animal manures for mass production, storage and application of some nematode egg parasitic fungi. *Nematologica* 38:237-244.
- Adams, R. E. y Eichenmuller, J. J. (1962)** *Gracilacus capitatus* n. sp. from Scarlet Oak in West Virginia. *Nematologica* 8: 87-92.
- Afek, U., Menge J. A. y Johnson, E. L. V. (1991)** Interaction among mycorrhizae, soil solarization, metalaxyl and plants in the field. *Plant Dis.* 75:665-671
- Akhtar, M. y Alam, M. M. (1993)** Utilization of waste materials in nematode control: A review. *Biores. Technol.* 45:1-7.
- Akhtar, M. y Malik, A. (2000)** Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Biores. Technol.* 74:35-47.
- Al-Ahmad, M. A. y Moslin, M. N. (1993)** Verticillium wilt of olive in Syria. *Bull. OEPP/EPPO Bull* 23:521-529.

- Alam, M. M., Siddiqi, S. A. y Khan, A. M. (1977)** Mechanism of control of plant parasitic nematodes as a result of the application of organic amendments to the soil. *Indian J. Nematol.* 3:94-98.
- Allen, M. W. y Jensen, H. J. (1950)** *Cacopaurus epacris*, new species (Nematoda: Criconematidae), a parasite of California Black walnut roots. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 17:10-14.
- Allen, W. R. y Marks, C. F. (1977)** Chemical control and population studies of *Pratylenchus penetrans* on fruit tree understocks. *Pl. Dis. Rep.* 61:84-87.
- Angles, S. (1999)** Evolución de la geografía oleícola en Andalucía. *Olivae* 78:12-22.
- Arias, M., Navas, A. y Bello, A. (1985)**. Nematodos ectoparásitos y transmisores de virus de la familia Longidoridae. Su distribución en España continental. *Bol. Serv. Plagas* 11: 275-337.
- Arora, D. K. y Pandey, A. K. (1989)** Effects of soil solarization on *Fusarium* wilt of chickpea. *J. Phytopathol.* 124:13-22
- Aruntyunov, A. V. (1985)** [The use of solar energy in the control of gall nematodes from the genus *Meloidogyne*.] *Isvestiya Akademii Nauk Turkmenskoi SSR. Biologicheskikh Nauk* 4:52-56.
- Ashwort, L. J. Jr., Morgan, D. P., Gaona, S. A. y McCain, A. H. (1983)** Control of *Verticillium* wilt of pistachio. *Plasticulture* 58:33-44.
- Atilano, R. A., Menge, J. A. y Van Gundy, S. D. (1981)** Interaction between *Meloidogyne arenaria* and *Glomus fasciculatus* in grape. *J. Nematol.* 13:52-57.
- Azcón, R. y Ocampo, J. A. (1981)** Factors affecting the vesicular-arbuscular infection and mycorrhizal dependency of thirteen wheat cultivars. *New. Phytol.* 87:677-685.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. (1997)** Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae* 68:1.24.
- Badra, T. y Khattab M. M. (1980)** The effect of nitrogen fertilizers on the growth of olive and in relation to infestations of *Rotylenchulus reniformis*. *Nematol. mediterr.* 8: 67-72.
- Badra, T., Saleh, M. A. y Oteifa, B. A. (1979)** Nematicidal activity and composition of some organic fertilizers and amendments. *Revue Nematol.* 2:29-36.
- Bakker, J. (1992)** Current state of nematicides. pp. 21-26. En: *Modern crop protection:*

- developments and perspectives.* (Zadoks, J.C., Ed.). PHLO, Wageningen, The Netherlands.
- Barba, M. (1993)** Viruses and virus-like diseases of olive. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 23: 493-497.
- Barbecheck, M. (1986)** Control of *Meloidogyne javanica* in dormant grapevine nursery stock. *Phytophylactica* 19:39-40.
- Barker, K. R. (1985)** Nematode extractions and bioassays. pp. 19-35. En: *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Volume II. Methodology.* (Barker, K. R., Carter, C. C. y Sasser, J.N., eds.) North Carolina State University Graphics.
- Barker, K. R. (1998)** Introduction and Synopsis of Advancements in Nematology. pp. 1-20. En: *Plant and Nematode Interactions.* (Barker, K. R., Pederson, G.A. y Windham, G.L., eds.), American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Bello, A. (1979)** Distribution of Criconeematidae. En *Atlas of Plant Parasitic Nematodes of Spain* (Alphey, T. J. W., Ed.) Scottish Horticultural Research Institute, 57 maps.
- Bello, A. (1983)** Nematodos patógenos de los árboles frutales. *Bol. Serv. Plagas* 9: 133-165
- Bello, A., Escuer, M. y Pastrana, M. A. (1996)** Nematodos fitoparásitos y su control en ambientes mediterráneos. pp. 1039-1069. En: *Patología Vegetal. Tomo II* (Llácer, G., López, M. M., Trapero, A. y Bello, A., eds.). Sociedad Española de Fitopatología, Phytoma, Madrid.
- Ben-Yephet, Y. (1988)** Control of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* by metham sodium, methil bromide and soil solarization. *Crop Prot.* 7:25-27.
- Ben-Yephet, Y., Melero-Vera, J. M. y De Vay J. E. (1988)** Interaction of soil solarization and metham-sodium in the destruction of *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. *Crop Prot.* 7:327-331
- Bergeson, G. B. (1959)** The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne* in the absence of a host. *Nematologica* 4:344-354.
- Bertrand, P. F. y Nyczepir, A. P. (1989)** Nematodes. pp. 146-151. En: *Peach Production Handbook.* (Meyers, S. C., Ed.). University of Georgia Cooperative Extension Service, Athens.

- Bertrand, P. F., Evert, D. R. y Nyczepir, A. P. (1988)** Experience with bahiagrass in Georgia peach orchards. *Proceedings of the Southeastern Professional Fruit Workers Conference. Vol. 3.* University of Georgia, Athens
- Besri, M. (1983)** Lutte contre le chacre a *Didymella lycopersice* de la tomate par chauffage solaire (Solarisation) des tuteurs. *Phytopathol. Zeitschrift.* 108:333-340.
- Bethlenfalvay, G. J. (1992)** Mycorrhizae and crop productivity. pp 1-28. En: *Mycorrhizae in sustainable agriculture.* (Bethlenfalvay, G. J. y Linderman, R. G., eds.) American Society of Agronomy , Inc., Spec. Publ. Madison, Wisconsin, USA.
- Birchfield, W. (1954)** The hot water treatment of infested nursery stock. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.*67:94-96.
- Bird, A. F. (1974)** Suppression of embryogenesis and hatching in *Meloidogyne javanica* by thermal stress. *J. Nematol.* 6:95-99.
- Bird, A. F. y P. G. Brisbane (1988)** The influence of *Pasteuria penetrans* in field soils on the reproduction of root-knot nematodes. *Revue Nematol.* 11:75-81.
- Blake, C. D. (1972)** Nematode diseases of banana plantations. pp. 245-267. En: *Economic Nematology* (Webster, J.M., ed.). Academic Press, New York.
- Blanco-López, M. A., Hernández, M. E. y Trapero, A. (1998)** Problemática de la "seca" del olivo en las nuevas plantaciones. *Phytoma* 102:136-141.
- Blanco-López, M. A., Jiménez-Díaz, R. M. y Caballero, J. M. (1984)** Symptomatology, incidence and distribution of Verticillium wilt of olive trees in Andalucía. *Phytopath. medit.* 23: 1-8.
- Blok, W. J., Lamers, J. G., Termorshuizen, A. J. y Bollen, G. J. (2001)** Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. *Phytopathology* 90:253-259.
- Bocquet, J. C. (1975)** *Contribution à l'étude de la biologie et de la nuisibilité du genre Pratylenchus sur céréales.* Memoire de fin d'Etudes. ENSA Rennes, France. 32 pp.
- Bolla, R. (1979)** Developmental nutrition of nematodes: the biochemical role of sterols, heme compounds, and lysosomal enzymes. *J. Nematol.* 11:251-259.
- Bollen, G. T. (1974)** Fungal recolonization of heat-treated glasshouse soils. *Agro-Ecosystems.* 1:139-155.

- Bottjer, K. P., Weinstein, P. P. y Thompson, M. J. (1985)** Effects of an azasteroid on growth, development of the free-living nematodes *Caenorhabditis briggsae* and *Pangrellus redivivus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B:99-103.
- Bridge, J. y Hague, N. G. M. (1974)** The feeding behaviour of *Tylenchorhyncus* and *Merlinius* species and their effect on growth of perennial ryegrass. *Nematologica* 20: 119-130.
- Bridge, J., Luc, M. y Plowright, R. A., (1990)** Nematode parasites of rice. pp. 69-108. En: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. (Luc, M., Sikora, R. A. y Bridge, J., eds.). CAB International Wallingford, UK.
- Brodie, B. B. (1998)** Potato. pp. 567-594. En: *Plant and Nematode Interactions*. (Barker, K. R., Pederson, G.A. y Windham, G.L., eds.), American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Brooks, R. M. y Olomo, H. P. (1961)** Register of new fruit and nut varieties: Nemaguard peach. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 78:334-635.
- Brzeski, M. W. y Hendricks, E. K. (1971)** The overwintering and hatching of *Melodogyne hapla* Chitw. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych* 121:235-244.
- Burr, T. J., Ophel, K., Katz, B. H. y Kerr, A. (1989)** Effect of water treatment on systemic *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 in dormant grape cuttings. *Plant Dis.* 73:242-245.
- Caballero, J. M. (1980)** Multiplicación del olivo por estaquillado semileñoso bajo nebulización. *Comunicaciones INIA. Serie Producción Vegetal.* 31:39
- Caballero, J. M. y Del Río, C. (1994)** *Propagación del olivo por enraizamiento de estaquillas semileñosas bajo nebulización*. Comunicación I + D Agroalimentaria, 7/94. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. 23 pp.
- Caballero, J. M. y Del Río, C. (1998)** Métodos de multiplicación. En *El Cultivo del Olivo* (D Barranco, R Fernández-Escobar y Luis Rallo, eds.) pp. 89-113 Junta de Andalucía -Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Caballero, J. M., Pérez-Hernández, J., Blanco-López, M. A., y Jiménez Díaz, R. M. (1980)** Olive, a new host of *Verticillium dahliae* in Spain. p. 50. En: *Proceedings of the 5<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Patras, Greece*.

- Calvet, C., Pinochet, J., Camprubí, A. y Fernández, C. (1995)** Increased tolerance to the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* in mycorrhizal micropropagated BA-29 quince rootstock. *Mycorrhiza* 5: 253-258.
- Calvet, C., Pinochet, J., Hernández Dorrego, A., Estaún, V. y Camprubí, A. (2001)** Field microplot performance of the peach-almond hybrid GF-677 after inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi in a replant soil infested with root-knot nematodes. *Mycorrhiza* 10:295-300.
- Campbell, C. L. y Madden, L. V. (1990)** *Introduction to plant disease epidemiology*. Wiley-Interscience, NY. 532 pp.
- Campos, V. P., Sivapalan, P. y Gnanapragasam, N. C. (1990)** Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. pp. 387-430. En: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. (Luc, M., Sikora, R.A. y Bridge, J., eds.). Cab International. Wallingford.
- Camprubí, A., Pinochet, J., Calvet, C. y Estaun, V. (1993)** Effects of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* and the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the growth of three plum rootstocks. *Plant Soil* 153: 223-229.
- Caroppo, S. (1998)** L'importanza dei nematodi nella moltiplicazione delle piante da frutto. *Inf.tore fitopatol.* 7-8: 20-24.
- Cartia, G. (1989)** La solarizzazione del terreno: esperienze maturate in Sicilia. *Informatore Fitopatologico*. 39:49-52
- Cartia, G. y Greco, N. (1987)** Effeti della 'solarizzazione del suolo' su una coltura di perperone in serra. *Colture Protette* 16:61-65.
- Cascone, G., D'Emilio, A. D., Polizzi, G. y Grillo, R. (2000)** Effectiveness of greenhouse soil solarization with different plastic mulches in controlling corky root and root-knot on tomato plants. pp.145-150. En: *Acta Hort. 532: Proceedings of the International Symposium on chemical and non-chemical soil and substrate disinfestations*. (Gullino, M. L. y Garibaldi, A., eds.). Pub. International Society for Horticultural Science. ISHS, Leuven, Bélgica.
- Castillo, P. (1988)** *Morfología y distribución de los nematodos del orden Tylenchida Thorne, 1949; en la Sierra de Cazorla*. Tesis Doctoral. Fac. Cienc. Univ. de Granada. 460 pp.

- Castillo, P., Peña-Santiago, R., y Jimenez-Millán, F. (1985).** Modelos de distribución vertical de las especies de nematodos en un biotopo natural. *Bol. Serv. Plagas* 11: 155-162.
- Castillo, P., Mora-Rodriguez, M<sup>a</sup>. P., Navas-Cortés, J. A. y Jiménez-Díaz, R. M. (1998a)** Interactions between *Pratylenchus thornei* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on chickpea. *Phytopathology* 88: 836-844.
- Castillo, P., Vovlas, N. y Jiménez-Díaz, R. M. (1998b)** Pathogenicity and histopathology of *Pratylenchus thornei* populations on selected chickpea genotypes. *Plant Pathol.* 47:370-376
- Castillo, P., Di Vito, M., Vovlas, N. y Jiménez-Díaz, R. M. (2001)** Host-parasite relationships in root-knot disease of white mulberry. *Plant Dis.* 85: 277-281.
- Cenis, J. L. (1989)** Temperature evaluation in solarized soils by Fourier analysis. *Phytopathology* 79:506-510.
- Chellemi, D. O., Olson, S. M., Mitchell, D. J., Secker, I. y McSorley, R. (1997)** Adaptation of soil solarization to the integrated management of soilborne pests of tomato under humid conditions. *Phytopathology* 87:250-258.
- Chen I. y Katan J. (1980)** Effect of solar heating of soils by transparent polyethylene mulching on their chemical properties. *Soil Sci.* 130:271-277
- Chomé-Fuster, P. (1998)** Programa de certificación de plantas de vivero de olivo en España y registro de variedades comerciales *Phytoma* 102: 41-44.
- Christie, J. R. (1959)** *Plant nematodes, their bionomics and control.* The H & WB Drew Company. Jacksonville, FL. 256 pp.
- Churchill, R. C. y Ruehle, J. L. (1971)** Occurrence, parasitism, and pathogenicity of nematodes associated with sycamore (*Platanus occidentalis* L.). *J. Nematol.* 3:189-196.
- Ciancio, A. y Grasso, G. (1998)** Endomigratory feeding behaviour of *Mesocriconema xenoplax* parasitizing walnut (*Juglans regia* L.). *Fundam. appl. Nematol.* 21: 63-68.
- Civantos, L. (1998)** La olivicultura en el mundo y en España. pp.17-33. En: *El Cultivo del Olivo* (Barranco, D., Fernández-Escobar, R. y Rallo, L., eds.) Junta de Andalucía - Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

- Cohn, E. y Mordechai, M. (1976)** Ultrastructure of hypertrophied cell induced in soybean roots by *Rotylenchulus macrodoratus*. pp. 17-18. En: *XIII Int. Nematol.Symp., Dublin Ireland (Sept. 5-11, 1976)*.
- Cohn, E. y Duncan, L. W. (1990)** Nematode Parasites of Subtropical and Tropical Fruit Trees. pp. 347-362. En: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* (Luc, M., Sikora, R. A. y Bridge, J., eds.) CAB International. Wallingford, UK.
- Conde, E., García-Vallejo, M. C. y Cadahía, E. (1999)** Waxes composition of *Quercus suber* reproduction cork from different Spanish provenances. *Wood Sci. Technol.* 33:271-283.
- Condorí Tintaya, F. (1987)** *Métodos y técnicas de evaluación empleadas en control químico y biológico del nematodo del nódulo de la raíz Meloidogyne incognita en el cultivo del olivo, departamento de Tacna.* Informe de prácticas pre-profesionales para optar al grado de Bachiller en Ciencias Agrícolas. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. 25 pp.
- Consejo Oleícola Internacional (1995)** Series Estadísticas del Aceite de Oliva y de la Aceituna de Mesa.
- Coolen, W. A. (1979)** Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. pp. 317-329. En: *Root knot nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control.* (Lamberti, F.y Taylor, C. E., eds.) Academic Press, London.
- Cooper, K. M. y Grandison, G. S. (1986)** Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and root-knot nematode on cultivars of tomato and white clover susceptible to *Melodogyne hapla*. *Ann. appl. Biol.*108:555-565.
- Cooper, K. M. y Grandison, G. S. (1987)** Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on infection of Tamarillo (*Cyphomandra betacea*) by *Meloidogyne incognita* in fumigated soil. *Plant Dis.* 71:1101:1106.
- Corbett, D. C. M. (1974)** *Pratylenchus vulnus*. CIH Descriptions of Plant-Parasitic Nematodes. Set 2 N° 25, Commonwealth Institute of Helminthology, St Albans, UK. 4 pp.
- COSAVE (1999)** *Estándar regional en proteccion fitosanitaria. Seccion III: medidas*

*fitosanitarias 3.3. Listado de plagas de importancia cuarentenaria.* 12 pp.

- Cuadra, R., Vazquez, J., Perez, J. A. (1999)** Comportamiento de variedades de café frente al ataque de *Meloidogyne incognita*. *Revista de Proteccion Vegetal*.14:101-105.
- D'Addabbo, T. (1995)** The nematicidal effect of organic amendments: a review of the literature: 1982:1994. *Nematol. medit.* 23:299-305.
- D'Addabbo, T. y Sasanelli, N. (1996)** Effect of olive pomace soil amendment on *Meloidogyne incognita*. *Nematol. medit.* 24:91-94.
- D'Addabbo, T. y Sasanelli, N. (1997)** Suppression of *Meloidogyne incognita* by combinations of olive pomace or wheat straw with urea. *Nematol. medit.* 25:159-164.
- D'Addabbo, T., Fontanazza, G., Lamberti, F., Sasanelli, N. y Patumi, M. (1997)** The suppressive effect of soil amendments with olive residues on *Meloidogyne incognita*. *Nematol. medit.* 25:195-198.
- Daft, M. J. y Hogarth, B. G. (1983)** Competitive interactions amongst four species of *Glomus* on maize and onion. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 80:339-345.
- Daulton, A. C. y Nusbaum. C. J. (1961)** The effect of soil temperature on the survival of the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica* 6:280-294.
- Davies, F. T., Olalde-Portugal, V., Alvarado M. J., Escamilla, H. M., Ferrera-Cerrato, R. C. y Espinosa, J. I. (2000)** Alleviating phosphorus stress of Chile ancho pepper (*Capsicum annum* L. 'San Luis') by arbuscular mycorrhizal inoculation. *J. Hort. Sci Biotechnol.* 75:655-661.
- Davis, J. R., Huisman, O. C., Westermann, D. T., Hafez, S. L., Everson, D. O., Sorensen, L. H. y Schneider, A. T. (1996)** Effects of green manures on Verticillium Wilt of potato. *Phytopathology* 86:444-453.
- Davis, R. H. (1991)** Cyanogens. pp. 202-213. En: *Toxic Substances in Crop Plants*. (Felix D'Mello, J. P., Duffus, C. M. y Duffus, J. H., eds.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Daykin, M. E. y Hussey, R. S. (1985)** Staining and histopathological techniques in nematology. pp. 39-48. En: *An Advanced treatise on Meloidogyne spp.: Volume II:*

*Methodology*. (Barker, K.R., Carter, C.C. y Sasser, J.N., eds.). North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, USA.

**De Andrés, F. (1991)** *Enfermedades y plagas del olivo*. 2ª ed. Riquelme y Vargas Ediciones, Jaén. 646 pp.

**De Liñán, C. (2001)** *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Ediciones Agrotécnicas, Madrid. 672 pp.

**Decraemer, W., Roca, F., Castillo, P., Peña-Santiago, R. y Gómez-Barcina, A. (1993)** Trichodoridae from southern Spain, with description of *Trichodorus giennensis* n. sp. (Nemata: Trichodoridae) *Fundam. appl. Nematol* 16: 407-416.

**Del Río, C. y Proubi, A. (1999)** Training initiation date affects height of nursery olive trees. *Hort Technol.* 9:482-485.

**De Man, J. G. (1880)** Die Einheimischen, frei in der reinen Erde und im süßen Wasser lebenden Nematoden. Vorläufiger Bericht un descriptiv-systematischer. *Theil. Tijdschr. Ned. Dierk. Ver.* 5:1-104.

**Devakumar, C., Goswami, D. K. y Mukerjee, S. K. (1985)** Nematicidal principles from neem (*Azadirachta indica* Juss). Part 1. Screening of neem fernel fractions against *Meloidogyne incognita*. *Indian J. Nematol.* 15:121-124.

**Di Silvestro, D. y Tacconi, R. (1998)**. Nematodi: passaporto e certificazione delle piante da frutto. *Inf.tore fitopatol.* 7-8:25-29.

**Di Vito, M., Vovlas, N. y Simeone, A. M. (1988)** Effect of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on the growth of kiwi (*Actinidia deliciosa*) in pots. *Adv. Hort. Sci.* 2:109-112.

**Di Vito, M., Greco, N. y Saxena, M.C (1991)** Effectiveness of soil solarization for control of *Heterodera ciceri* and *Pratylenchus thornei* on chickpea in Syria. *Nematol. medit.* 19:109-111.

**Diab, K. A. y El-Eraki, S. (1968)** Plant parasitic nematodes associated with olive decline in the United Arab Republic. *Plant Dis. Repr.* 52:150-154.

**Díaz, G., Azcón-Aguilar, C. y Honrubia, M. (1996)** Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cystoides*. *Plant Soil* 180:241-249.

- Doucet, M. E., Ponce de León, E. L. y Poloni, N. (1997)** Alteraciones histológicas inducidas por *Meloidogyne incognita* en raíces de olivo en Catamarca, Argentina. *Nematol. medit.* 25:275-277
- Douds Jr., D. D., Galvez, L., Franke-Snyder, M., Reider, C. y Drinkwater, L. E. (1997)** Effect of compost addition and crop rotation point upon VAM fungi. *Agr. Ecosyst. Environ.* 65:257-266.
- Dropkin, V. H. (1969)** Cellular responses of plants to nematode infections. *Ann. Rev. Phytopathol.* 7:101-122.
- Dropkin, V. H. (1989)** *Introduction to Plant Nematology.* Willey-Interscience, New York. 304 pp.
- Duff, J. D. y Barnaart, A. (1992)** Solarisation controls soilborne fungal pathogens in nursery potting mixes. *Australas. Plant Pathol.* 21:2023.
- Duncan, L. W. y Cohn, E. (1990)** Nematode Parasites of Citrus. pp.: 321-346. En: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture.* (Luc, M., Sikora, R. y Bridge, J.). Wallingford, Institute of Parasitology.
- Duncan, R. A., Stapleton, J. J. y McKenry, M. V. (1992)** Establishment of orchards with black polyethylene film mulching: Effect on nematode and fungal pathogens, water conservation, and tree growth. *J. Nematol.* 24:681-687.
- Duncan, L. W. y Eissenstat, D. M. (1993)** Responses of *Tylenchulus semipenetrans* to Citrus fruit removal: implications for carbohydrate competition. *J. Nematol.* 25:7-14.
- Dunn, R. A. (1973)** Extraction of eggs of *Pratylenchus penetrans* from alfalfa callus and relationship between age of culture and yield of eggs. *J. Nematol.* 5:73-74.
- Duranti, A. y Cuocolo, L. (1988)** Solarization in weed control for onion (*Allium cepa* L.). *Adv. Hort. Sci.* 2:104-108
- Dusenberry, D. B. (1986)** Prospects for exploiting sensory stimuli in nematode control. pp. 131-135. En *Vistas in nematology* (Veech, J. A. y Dickson, D. W., eds.) Soc. Nematol., Hyattsville, MD.
- Dusenberry, D. B. (1989)** A simple animal can use a complex stimulus pattern to find a location : nematode thermotaxis in soil. *Biol. Cybern.* 60:431-437.
- Eayre, C. G., Jaffee, B. A. y Zehr, E. I. (1987)** Suppression of *Criconebella xenoplax* by

the nematophagous fungus, *Hirsutella rhossiliensis*. *Plant Dis.* 71:832-834.

**Eddaoudi, M. y Ammati, M. (1994)** Etude des effets simple et combiné de la solarisation du sol et de l'utilisation de variétés de tomate résistante sur les populations telluriques de *Meloidogyne javanica* et sur la production de la tomate dans le sud marocain. *Afro-Asian J. Nematol.* 5:28-33.

**Edongali, E. A. (1989)** Plant-parasitic nematodes associated with olive trees in Libya. *Int. Nematol. Newsl.* 6:36-37.

**Ehwaeti, M. E., Phillips, M. S. y Trudgill, D. L. (1998)** The viability of *Meloidogyne incognita* eggs released from egg masses of different ages using different concentrations of sodium hypochlorite. *Nematologica* 44:207-217.

**Elmiligy, I. A. y Norton, D. C. (1973)** Survival and reproduction of some nematodes as affected by muck and organic acids. *J. Nematol.* 5:50-54.

**EPPO/OEPP (1988)** *Eppo Standard. Certification schemes. Pathogen-Tested olive trees and rootstocks. Phytosanitary Measure 4/17.* European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris. 9 pp.

**Esnard, J. y Zuckerman, B. M. (1998)** Small Fruits. pp. 685-725. En: *Plant and Nematode Interactions.* (Barker, K. R., Pederson, G. A. y Windham, G. L., eds.), American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

**Espárrago, G. y Navas, A. (1995)** Nematofauna fitoparásita asociada a cultivos hortícolas y tabaco en regadíos de Extremadura. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 21:303-317.

**Esser, J. H., O'Bannon, J. H. y Riherd, C. C. (1988)** The citrus nursery site approval for burrowing nematode and its beneficial effect on the citrus industry of Florida. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 18:579-586.

**Esser, R. P. (1977)** *How soil borne nematodes enter and disperse in Florida nurseries. Nematology Circular N° 32.* Fla. Dept. of Agric. and Consumer Services. Division of Plant Industry. 2 pp.

**Esser, R. P. (1979)** *Nematode entry and dispersion by water in Florida nurseries. Nematology Circular N° 54.* Fla. Dept. of Agric. and Consumer Services. Division of Plant Industry. 2 pp.

**Evans, K., Trudgill, D. L. y Brown, N. J. (1977)** Effects of potato cyst-nematodes on

- potato plants. 5. Root system development in lightly- and heavily-infested susceptible and resistant varieties , and its importance in nutrient and water uptake. *Nematologica* 23:153-164.
- Fallas, G. y Sarah, J. L. (1995)** Effect of temperature on the *in vitro* multiplication of seven *Radopholus similis* isolates from different banana producing zones of the world. *Fundam. appl. Nematol.* 18:445-449.
- Fallas, G. A., Sarah, J. L. y Fargette, M. (1995)** Reproductive fitness and pathogenicity of eight *Radopholus similis* isolates on banana plants (Musa AAA cv. Poyo). *Nematropica* 25:135-141.
- FAO (1997)** *Guidelines for surveillance. International Standard for Phytosanitary Measures* Nº 7. IPPC Secretariat – FAO, Roma. 15 pp.
- Fassuliotis, F. (1979)** Plant breeding for root-knot nematode resistance. pp. 425-454. En: *Root-knot nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control* (F. L. y Taylor, C. E., eds.) London, Academic Press.
- Fatemy, F. y Evans, K. (1982)** Growth and water use of Arran Banner potato plants infested with *Globodera pallida*. *Nematologica* 28:144-145 (Res.).
- Fatemy, F., Trinder, K. E., Wingfield, J. N. y Evans, K. (1985)** Effects of *Globodera rostochiensis*, water stress and exogenous abscisic acid on stomatal function and water use of Cara and Pentland Dell potato plants. *Rev. Nématol.* 8:249-255.
- Fernández, C., Pinochet, J. y Dolcet, R. (1992)** Host-parasite relationship of *Pratylenchus vulnus* on apple and pear rootstocks. *Nematropica* 22:227-236.
- Fernández-Alvárez, P. (2001)** *Modelos estocásticos en el tratamiento de series temporales en energías renovables*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 223 pp.
- Fernández-Escobar, R. (1998)** Fertilización. pp. 237-257. En *El Cultivo del Olivo* (Barranco, D., Fernández-Escobar, R. y Rallo, L., eds.) Junta de Andalucía -Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Ferraz, L. C. C. B. y Silva, A. T. (1978)** Efeitos da adição de palha de arroz e casca de amendoim, na forma de coberturas de solo, sobre a incidência de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). pp. 77-78. En: *Resumos dos trabalhos científicos e conferencias. III Reunião Sociedade Brasileira de Nematologia. Mossoro, RN, Brasil.*

- Ferris, H. y Noling, J. W. (1987)** Analysis and prediction as a base for management decisions. pp 49-86. En: *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. (Brown, R. H. y Kerry, B. R., eds.). Academic Press Australia.
- Firoozabady, E. y Olomo, H. P. (1982)** The heritability of resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* Chit.) in *Vitis vinifera* x *V. rotundiflora* hybrid derivatives. *Vitis* 21:136-144.
- Fisher, J. M. (1967)** Effect of temperature and host on *Pratylenchus neoamblycephalus* and effect of the nematode on the host. *Aust. J. Agric. Res.* 18:921-929.
- Fisher, J. M. (1969)** Investigations on fecundity of *Aphelenchus avenae*. *Nematologica* 15:22-28.
- Fiume, F. (1978)** I generi dei nematodi viventi nella rizosfera dell'olivo in Calabria. *Inf.tore fitopatol.* 7:11-14.
- Fortuna, P., Citernes, A. S., Morini, S., Vitagliano, C. y Giovannetti, M. (1996)** Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphate fertilization on shoot apical growth of micropropagated apple and plum rootstocks. *Tree Physiol.* 16:757-763.
- Fortuner, R. (1985)** *Helicotylenchus pseudorobustus*. C.I.H. Descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 8, No. 109. CAB International. Slough, UK. 3 pp.
- Francl, L. J. (1993)** Interactions of nematodes with mycorrhizae and mycorrhizal fungi. pp. 203-216. En: *Nematode Interactions*. (Khan, M. W., Ed.). London, Chapman & Hall.
- Francl, L. J. y Dropkin, V. H. (1985)** *Glomus fasciculatum*, a weak pathogen of *Heterodera glycines*. *J. Nematol.* 17:470-475.
- Freeman, S., Sztejnberg, A., Shabi, E. y Katan, J. (1990)** Long-term effect of soil solarization for the control of *Rosellinia necatrix* in apple. *Crop Prot.* 9:312-316
- Gadzhiev, S. G. y Sadowski, A. T. I. (1999)** Influence of quality of the dwarfing 62-396 rootstocks on growth of apple trees in the nursery and in the young orchard. pp. 29-30. En: *Apple rootstocks for intensive orchards. Proceedings of the international seminar*. Warsaw-Ursynow, Poland
- Gallo, D. P. y Jiménez, R. M. (1976)** Nematofauna fitoparásita asociada al olivo (*Olea europaea* L.) en el valle de Azapa. *Idesia, Chile* 4:105-109.
- Gallo-Llobet, L., Siverio, F. y Muñoz-Carpena, R. (1996)** Influence of Soil Solarization on *Phytophthora cinnamomi* in avocado. *Phytoparasitica* 24:75-76.

- Galper, S., Cohn, E., Spiegel, Y. y Chet, I. (1990)** Nematicidal effect of collagen-amended soil and the influence of protease and collagenase. *Rev. Nématol.* 13:67-71.
- Gamliel, A. (2000)** Soil amendments: a non chemical approach to the management of soilborne pest. pp. 39-48 En: *Acta Hort. 532: Proceedings of the International Symposium on chemical and non-chemical soil and substrate disinfections.* (Gullino, M. L. y Garibaldi, A., eds.). Pub. International Society for Horticultural Science. ISHS, Leuven, Bélgica.
- Gamliel, A., Stapleton, J. J., (1993)** Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. *Phytopathology* 83:899-905.
- Gamliel, A., Austerweil, M. y Kritzman, G. (2000)** Non-chemical approach to soilborne pest management - organic amendments. *Crop Prot.* 19:847-853
- García Ferriz, L., Ghorbel, R., Ybarra, M., Belaj, M. A. y Trujillo, I. (2000)** Micropropagation of mature olive trees. p. 133. En: *Proc. 4th international Symposium on Olive Growing, Bari.*
- Gardner, J., Caswell-Chen, E. P., Westerdahl, B., Anderson, C. y Lanini, T. (1992)** The influence of *Raphanus sativus*, *Sinapis alba* and *Phacelia tanacetifolia* on California populations of *Heterodera schachtii*. *J. Nematol.* 24:591.
- Gaur, H. S. y Dhingra, A. (1991)** Management of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchus reniformis* in nursery-beds by soil solarization and organic soil amendment. *Rev. Nématol.* 14:189-195.
- Gerdemann, J. W. (1968)** Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Ann. Rev. Phytopathol.* 6:397-418.
- Gerson, U., Yathom, S. y Katan, J. (1981)** A demonstration of bulb mite control by solar heating. *Phytoparasitica* 9:153-155.
- Gianinazzi-Pearson, V. (1984)** Host-fungus specificity in mycorrhizae. pp. 225-253. En: *Genes involved in plant-microbe interactions.* (Verma, D. P. S. y Hohn, T. H., eds.). Springer, Viena.
- Gianinazzi-Pearson, V. y Azcón-Aguilar, C. (1991)** Fisiología de la micorrizas vesiculo-arbusculares. pp. 175-201. En: *Fijación y movilización biológica de nutrientes. Vol.*

II (Olivares, J. y Barea, J. M., eds.). CSIC, Madrid.

**Giblin-Davis, R. M. y Verkade, S. D. (1988)** Solarization for nematode disinfestation of small volumes of soil. *Ann. Appl. Nematol.* 2:41-45.

**Godoy, G., Rodríguez-Kábana, R. y Morgan-Jones, G. (1983)** Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and greenhouse studies. *Nematropica* 13:201-213.

**Gómez Barcina, A., Gonzalez-País, A. y Castillo, P. (1989)** Nematodos del orden Tylenchida Thorne, 1949 en España. *Rev. Ibér. Parasitol.* 49:85-109.

**González, A. y Canto-Saenz, M. (1992)** Comparación de cinco enmiendas orgánicas en el control de *Globodera pallida* en microparcels en Perú. *Nematropica* 23:133-139.

**González, H. (1969)** Es en los viveros donde hay que detener el avance de los nematodos. *Inv. y Progreso Agrícola* 3:28-30.

**González-Torres, R., Melero-Vara, J. M., Gomez-Vázquez, J. y Jiménez-Díaz, R. M. (1993)** The effects of soil solarization and soil fumigation on fusarium wilt of watermelon grown in plastic houses in south-eastern Spain. *Plant Pathol.* 42:858-864.

**Goswami, B. K. y Meshram, N. J. (1991)** Studies on comparative efficacy of mustard and karanj oil seed cakes with a nematicide, carbofuran, against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, on tomato. *Indian J. Nematol.* 21:66-70.

**Goswami, B. K. y Swarup, G. (1971)** Effect of oil-cake ammended soil on the growth of tomato and root-knot nematode population. *Indian Phytopathol.* 24:491-494.

**Govindaiah, D. S. B. y Sharma, D. D. (1991)** Pathogenicity and avoidable leaf yield loss due to *Meloidogyne incognita* in mulberry (*Morus alba* L.). *Indian J. Nematol.* 21:52-57.

**Graham J. H., Leonard, R. T. y Menge, J. A. (1981)** Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorous inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Plant Physiol.* 68:548-552.

**Grandison, G. S. y Cooper, K. M. (1986)** Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultivars of alfalfa susceptible and resistant to *Meloidogyne hapla*. *J. Nematol.* 18:141-149.

- Graniti, A. (1955)** A dieback of olive in Sicilia associated with two nematode species. *Olearia* 9:114-120. (in Italian)
- Greco, N. (1990)** Problemas nematológicos en la replantación de frutales. pp. 321-326. En: *FRUT- Revista de Fruticultura. Especial Jornadas Técnicas Eurofruit '90*.
- Greco, N. Brandonisio, A. y Elia, F. (1985)** Control of *Ditylenchus dipsaci*, *Heterodera carotae* and *Meloidogyne incognita* by solarization. *Nematol. medit.* 13:191.
- Greco, N., D'Addabbo, T., Stea, V. y Brandonisio, A. (1992)** The synergism of soil solarization with fumigant nematicides and straw for the control of *Heterodera carotae* and *Ditylenchus dipsaci*. *Nematol. medit.* 20:25-32.
- Griffin, G. D. (1964)** Association of nematodes with corn in Wisconsin. *Plant Dis. Repr.* 48:458-459.
- Griffin, G. D. (1998)** Alfalfa. pp. 381-397. En: *Plant and Nematode Interactions*. (Barker, K. R., Pederson, G.A. y Windham, G.L., eds.), American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Griffin, G. D. y Asay, K. H. (1996)** Biology and pathogenicity of three ectoparasitic nematode species on crested wheatgrasses. *Nematropica* 26:15-25.
- Hackney, R. W. y Dickerson, O. J. (1974)** Marigold, castor bean and chrysanthemum as controls of *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus alleni*. *J. Nematol.* 7:84-90.
- Hafez, S. L. y Sundararaj P. (2000)** Host parasite interaction of *Meloidogyne incognita* and *Vitis vinifera* under green house condistons. *Int. J. Nematol.* 10:71-74.
- Hague, N. G. M. y Gowen, S. R. (1987)** Chemical control of nematodes pp. 131-178. En: *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. (Brown, R. H. y B. R. Kerry, eds.) Academic Press Australia.
- Hahn, M. L., Sarah, J. L., Boisseau, M., Vines, N. J., Wright, D. J. y Burrows, P. R. (1996)** Reproductive fitness and pathogenicity of selected *Radopholus populations* on two banana cultivars. *Plant pathol.* 45:223-231.
- Halbrendt, J. M. (1996)** Allelopathy in the management of plan-parasitic nematodes. *J. Nematol.* 28:8-14.
- Halbrendt, J. M. y Jing, G. (1994)** Nematode suppressive rotation crops for orchard

renovation. pp. 49-56 En: *Acta Horticulturae 363: Proceedings of the Third International Symposium on Replant Problems*. (Utkhede, R. S., ed.). Pub. International Society for Horticultural Science. ISHS, Leuven, Bélgica.

**Hansen E. L. y Hansen J. W. (1988)** Nutritional and metabolic diseases. pp. 23-34. En: *Diseases of Nematodes. Vol. I* (Poinar, G. O. y Jansson, H. B., eds.) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

**Harr, J., Basel, S. A. G. y Klingler, J. (1976)** Single and combined effect of *Pratylenchus penetrans* and *Thielaviopsis basicola* on the growth of cherry tree cuttings. *J. Plant Dis. Prot.* 83:615-619.

**Hartman, K. M. y Sasser, J. N. (1985)** Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. pp. 69-77. En: *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol. II: Methodology* (Barker, K.R., Carter C. C., y Sasser, J.N., eds.). North Carolina State University Graphics..

**Hartmann, H. T. (1952)** Further studies on the propagation of the olive by cuttings. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 72:242-251.

**Hartz, T. K., Boble, C. R., Bender, D. A. y Ávila, F. A. (1989)** Control of pink root disease in onion using solarization and fumigation. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 114:587-590

**Hasan, N. y Jain, R. K. (1987)** Parasitic nematodes and vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi associated with berseem (*Trifolium alexandrinum* L.) in Bundelkhand region. *Indian J. Nematol.* 17:184-188.

**Hashim, Z. (1979)** A preliminary report on the plant-parasitic nematodes in Jordan. *Nematol. medit.* 7:177-186.

**Hashim, Z. (1982)** Distribution, pathogenicity and control of nematodes associates with olive. *Rev. Nématol.* 5:169-181.

**Hashim, Z. (1983a)** Plant-parasitic nematodes associated with olive in Jordan. *Nematol medit.* 11:27-32.

**Hashim, Z. (1983b)** Plant-parasitic nematodes associated with pome granate (*Punica granatum* L.) in Jordan and an attempt to chemical control. *Nematol. medit.* 11:199-200.

**Hayman, D. S. (1982)** The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis.

*Can. J. Bot.* 61:944-963.

- Haugh, R. T. (1993)** *The Practical Handbook of Compost Engineering*. Lewis Publishing, Boca Raton, FL. 311 pp.
- Heald, C. M. (1987)** Classical nematode management practices. pp. 100-104. En: *Vistas on Nematology* (J. A. Veech y D. W. Dickson, eds.). Soc. Nematol., Hyattsville, MD.
- Heald, C. M. y Wayland, J. R. (1975)** Ultra-high frequency electromagnetic energy as a means for nematode control. *Nematropica* 5:1.
- Heald, C. M., Robinson, A. F., (1987)** Effects of soil solarization on *Rotylenchulus reniformis* in the Lower Rio Grande Valley of Texas. *J. Nematol.* 19:93-103.
- Heald, C. M., Bruton, B. D. y Davis, R. M. (1989)** Influence of *Glomus intraradices* and soil phosphorus on *Meloidogyne incognita* infecting *Cucumis melo* *J. Nematol.* 21:69-73.
- Hernández-Dorrego, A., Pinochet, J. y Calvet, C. (1999)** Growth response of peach and plum rootstocks infected with *Pratylenchus vulnus* in microplots. *J. Nematol.* 31:656-661
- Herrera, R., Aballay, E. y Montealegre, J. R. (1999)** Efecto de una solarización prolongada en la sobrevivencia del nematodo del nudo (*Meloidogyne incognita*) en un suelo con monocultivo de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Fitopatología* 34:63-68.
- Hirschmann, H., Paschalaki-Kourtzi, N. y Triantaphyllou, A. C. (1966)** A survey of plant-parasitic nematodes in Greece. *Annls. Inst. phytopath. Benaki* 7:144-156.
- Hoagland, D. R. y Arnon, D. I. (1950)** The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station Circular* 347.
- Hoitink, H. A. J. y Fahy, P. C. (1986)** Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24:93-114.
- Hooper, D. J. (1986)** Handling, fixing, staining and mounting nematodes. pp. 59-80. En: *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. (Southey, J. F., Ed.). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London.
- Hooper, D. J. y Evans, K. (1993)** Extraction, identification and control of plant parasitic nematodes. pp. 1-59. En: *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*

(Evans, K., Trudgill, D. L. y Webster, J. M., eds.) CAB International, Wallingford, UK.

**Horiuchi, S. (1984)** Soil solarization for suppressing soilborne diseases in Japan. pp. 11-23. En *FFTC Book Series* N° 26. Soilborne Crop Diseases in Asia. Food and Fertilizer Technology Center. Taiwan. ROC.

**Horowitz, M., Regev, Y., y Herzlinger, G. (1983)** Solarization for weed control. *Weed Sci.* 31:170-179.

**Hsu, D. y Hendrix, F. F. Jr (1973)** Influence of *Criconemoides quadricornis* on pecan feeder root necrosis caused by *Pythium irregulare* and *Fusarium solani* at different temperatures. *Can. J. Botany* 51: 1421-1424.

**Huang, C. S., Tenente, R. C. V., Da Silva, F. C. C. y Lara, J. A. R. (1981)** Effect of *Crotalaria spectabilis* and two nematicides on numbers of *Meloidogyne incognita* and *Helicotylenchus dihystera*. *Nematologica* 27:1-5.

**Huebner, R. A., Rodríguez-Kábana, R. y Patterson, R. M. (1983)** Hemicellulosic waste and urea for control of plant-parasitic nematodes: Effect on soil enzyme activities. *Nematropica* 13:37-53.

**Huettel, R. N. (1985)** Carrot disc culture. pp. 153-154 En *Plant nematology laboratory manual*. (Zuckerman, B. M., Mai, W F. y Harrison, M.B., eds.) Amherst, University of Massachusetts Agriculture Experimental Station.

**Huettel, R. N. y Hammerschlag, F. A. (1993)** Response of peach scion cultivars and rootstocks to *Meloidogyne incognita* in vitro and in microplots. *J. Nematol.* 25:472-475.

**Hussey, R. S. (1985)** Host-parasite relationships and associated physiological changes. pp. 143-154. En: *An Advanced Treatise on Meloidogyne: I. Biology and Control*. Sasser, (J.N., Carter, C. C., eds.) North Carolina State University Graphics.

**Hussey, R. S. y Barker, K. R. (1973)** A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Dis. Repr.* 57:1025-1028.

**Hussey, R. S. y McGuire, J. M. (1987)** Interaction with other organisms. pp. 293-328. En: *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. (Brown, R. H. y B. R. Kerry, eds.) Academic Press, Australia.

**Hussey, R. S. y Mims, C. W. (1991)** Ultrastructure of esophageal glands and their

- secretory granules in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma* 156:9-18.
- Hussey, R. S. y Roncadori, R. W. (1982)** Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. *Plant Dis.* 66:9-14.
- Hussey, R. S. y Williamson, V. M. (1998)** Physiological and Molecular Aspects of Nematode Parasitism. pp. 87-108. En: *Plant and Nematode Interactions*. (Barker, K. R., Pederson, G. A. y Windham, G. L., eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Inagaki, H. (1978)** Apple root-knot nematode *Meloidogyne mali*, its taxonomy, ecology, damage and control. *Kasetsart Journal* 12:25-30.
- Inomoto, M. M., Oliveira, C. M. G., Mazzafera, P. y Gonçalves, W. (1998)** Effects of *Pratylenchus brachyurus* and *P. coffeae* on seedlings of *Coffea arabica*. *J. Nematol.* 30:362-367.
- Inserra, R. N. y Vovlas, N. (1980)** The biology of *Rotylenchulus macrodoratus*. *J. Nematol* 12:97-102.
- Inserra, R. N. y Vovlas, N. (1981)** Indagine sulla distribuzione geografica dei nematodi parassiti dell'olivo in Italia. *Inf.tore fitopatol.* 31:117-119.
- Inserra, R., Vovlas, N., Lamberti, F. y Bleve-Zacheo, T. (1976)** Plant parasitic nematodes associated with declining olive trees in southern Italy. *Poljoprivredna znanstvena smotra-Agriculturae Conspectus Scientificus* 39:419-424.
- Inserra, R. N., Vovlas, N. y Golden, A. M. (1979a)** *Helycotylenchus oleae* n. sp. and *Helycotylenchus neopaxilli* n. sp (Hoplolaimidae) two new spiral nematodes parasitic on olive trees in Italy. *J. Nematol.* 11:56-62.
- Inserra, R. N., Tirrò, A., Nucifora, A. y Tropea, M. (1979b)** Response of "Troyer" citrange seedlings infested with *Tylenchulus semipenetrans* Cobb in three different soils. *Nematol. medit.* 7:37-44.
- Inserra, R. N., Vovlas, N., O'Bannon, J. H. (1980)** A classification of *Tylenchulus semipenetrans* biotypes. *J. Nematol.* 12:283-287.
- Inserra, R., Vovlas, N., Fontanazza, G. y La Casta, G. (1981)** Comportamento di alcune cultivar di olivo alle infestazioni di quattro specie di nematodi. *Ortoflorofrutt.*

*Ital.* 65:143-148.

**Jaccard, P. (1908)** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223-270.

**Jacoboni, N., Battaglini, M., y Preziosi, P. (1976)** *Olivicultura moderna*. Eds. FAO-INIA, Editorial Agrícola Española, S. A., Madrid. 373 pp.

**Jaffee, A., Ferris, H., Stapleton, J. J., Norton, M. V. K. y Muldoon, E. (1994)** Parasitism of nematodes by the fungus *Hirsutella rhossiliensis* as Affected by certain organic amendments. *J. Nematol.* 26:152-161.

**Jarvis, W. R. (1998)** *Control de enfermedades en cultivos de invernadero*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 334 pp.

**Jeffries, P. (1987)** Use of mycorrhizae in agriculture. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 5:319-358.

**Jensen, W. A. (1962)** *Botanical histochemistry*. W.H. Freeman and Co., San Francisco. 408 pp.

**Jepson, S. (1987)** *Identification of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species)*. CAB International, Wallingford, UK. 265 pp.

**Jiménez, R. M. (1982)** Phytoparasitic nematodes and olive growing. En: *Primeras Jornadas Olivícolas Nacionales*. Arica, Chile.

**Jiménez-Guirado, D., Arias, M. y Bello, A. (1976)** Distribution of the soil nematodes belonging to Orden Tylenchida and Family Longidoridae in Sierra Nevada (Granada) pp. 36-37. En: *Compt. XIIIth Simpos. Int. Nematology, Dublin*.

**Jiménez-Millán, F., Arias, M., Bello, A. y López Pedregal, J. M. (1965)** Catálogo de los nematodos fitoparásitos y peri-radicales encontrados en España. *Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.)* 63:47-104.

**Johnson, C. E., Lancaster, D. M., Young, W. A. y Overstreet, C. (1987)** Postplant use of Nematicur for control of ring nematodes in peaches 1982-1986. *Fungicide and Nematicide Tests. American Phytopathological Society* 42:161.

**Johnson, J. D. (1986)** Current status of rootknot nematodes on pecans and their control. *Proceedings of the Annual Conference for the Texas Pecan Growers Association*, 64:37-38.

- Jones, M. G. K. (1981)** Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. *Ann. appl. Biol.* 97:353-372.
- Jones, R. K. (1979)** Migratory plant parasitic nematodes as pests of cereals. *Ann. appl. Biol.* 78:319-330.
- Kaewruang, W., Sivasithamparam, K. y Hardy, G. E. (1989)** Effect of solarization of soil within plastic bags on root rot of gerbera (*Gerbera jamesonii* L). *Plant Soil* 120:303-306.
- Kaplan, D. T. (1982)** Eradication of *Pratylenchus coffeae* in "Carrizo" citrange seedlings. *Proc. Fla. State Horic. Soc.*95:70-72.
- Kaplan, D. T. y Timmer, L. W. (1982)** Effects of *Pratylenchus coffeae*-*Tylenchulus semipenetrans* Interactions on Nematode Population Dynamics in *Citrus*. *J. Nematol.* 14:368-373.
- Kaplan, D. T., Tatter, T. A. y Rohde, R. A. (1976)** Reduction of electrical resistance in sunflower roots infected with lesion nematodes. *Phytopathology* 66:1262-124.
- Kaplan, M. y Noe J. P. (1993)** Effects of chicken-excrement amendmets on *Meloidogyne arenaria*. *J. Nematol.* 25:71-77.
- Katan, J. (1980)** Solar pasteurization of soils for disease control: status and prospects. *Plant Dis.* 64:450-454.
- Katan, J. (1981)** Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19:211-236.
- Katan, J. (1987)** Soil solarization. pp. 77-105. En: *Innovative approaches to plant disease control*. (Chet, I., Ed.). J. Wiley & Sons. New York.
- Katan, J. y De Vay, E. (1991)** *Soil Solarization*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA. 267 pp.
- Katan, J., Greenberger, A., Alon, H. y Grinstein, A. (1976)** Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soilborne pathogens. *Phytopathology* 73:1215-1219.
- Kauri-Pääsuke, M. (1973)** *Biologisk bekampning av jortrötthet i plantsdejord*. *Lantbrukshögskolans Meddelanden Serie A No 190*. 11 pp.
- Kaye, J. W., Pflieger, F. L. y Stewart, E. L. (1984)** Interaction of *Glomus fasciculatum* and *Pythium ultimum* on greenhouse-grown poinsettia. *Can. J. Bot.* 62:1575-1579.

- Keinath, A. P. (1996)** Soil amendment with cabbage residue and crop rotation to reduce gummy stem blight and increase growth and yield of watermelon. *Plant Dis.* 80:564-570.
- Kelman, A. y Cook, R. J. (1979)** Plant pathology in the People's Republic of China. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15:409-429.
- Kerry, B. R. (1987)** Biological Control. pp. 233-263. En: *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*, (Brown, R. H. y B. R. Kerry, eds.) Academic Press Australia.
- Khan, F. A. (1985a)** Hatching response of *Rotylenchus reniformis* to root leacheates of certain hosts and nonhosts. *Rev. Nématol.* 8:319-393.
- Khan, F. A. (1985b)** Influence of host nutrition on the population and sex ratio of the reniform nematode *Rotylenchulus reniformis*. *Rev. Nématol.* 8:143-145.
- Khan, A. M. (1969)** *Estudies on plant parasitic nematodes associated with vegetable crops in Uttar Pradesh*. Final Tech. Rep. Grant. no. FG-In-225. Project no. A7-CR-65. Aligarh Muslim Univ. Aligarh, India.
- Kierkegaard, J. A., Gardner, P. A., Desmarchelier, J. M. y Angus, J. F. (1993)** Biofumigation: using *Brassica* species to control pests and diseases in horticulture and agriculture. pp. 77-82. En: *9<sup>th</sup> Australian Research Assembly on Brassicas*. (Wratten, N. y Mailer, R. J., eds.). Agricultural Research Institute, Wagga Wagga, Australia.
- Kimpinsky, J. (1979)** Root lesion nematodes in potatoes. *Amer. Potato J.* 56:79-86.
- Kluepfel, D. A. (1993)** Involvement of root-colonizing bacteria in peach orchard soils suppressive of the nematode *Criconemella xenoplax*. *Phytophatology* 83:1240-1245.
- Koike, S. T., Xiao, C. L., Hubbard, J. C., Schulbach, K. F. y Subbarao, K. V. (1997)** Effects of broccoli residue on the cauliflower-*Verticillium dahliae* host-pathosystem. pp. 317-321. En: *Advances in Verticillium research and disease management* (Tjamos, E. C., Rowe, R. C., Heale, J. B. y Favel, D. R., eds.). APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Koomen, I., Grace, C. y Hayman, D. S. (1987)** Effectiveness of single and multiple mycorrhizal inocula on growth of clover and strawberry plants at two soils. *Soil Biol. Biochem.* 19:539-544.

- Kotcon, J. B. y Loria, R. (1986)** Influence of *Pratylenchus penetrans* on plant growth and water relations in potatoes. *J. Nematol.* 18:385-392.
- Kotcon, J. B., Bird, G. W., Rose, L. M. y Dimoff, K. (1985)** Influence of *Glomus fasciculatum* and *Meloidogyne hapla* on *Allium cepa* in organic soils. *J. Nematol.* 17:55-60.
- Krishna Rao, A. B. V., Padhi, N. N. y Acharya, A. (1987)** Effect of different nematicides, oil-cakes and urea in the control of *Rotylenchus reniformis* in okra. *Indian J. Nematol.* 17:171-173.
- Kuc, J. (1978)** Changes in intermediary metabolism caused by disease. pp. 349-374. En: *Plant Disease. Vol 3.* (Horsfall, J. G. y Cowling, E. B., eds.). Academic Press, New York.
- Lamberti, F. (1969)** The olive as a host for *Xiphinema americanum* Cobb. *Phytopath. Mediterr.* 7:230.
- Lamberti, F. (1981)** Combating nematode vectors of plant viruses. *Plant Dis.* 65:113-117.
- Lamberti, F. y Baines, R. C. (1969a)**. Pathogenicity of four species of *Meloidogyne* on three varieties of olive trees *J. Nematol.* 1 :111-115
- Lamberti, F. y Baines, R. C. (1969b)**. Effect of *Pratylenchus vulnus* on the growth of "Ascolano" and "Manzanillo" olive trees in a glasshouse *Plant Dis. Repr.* 7:557-558.
- Lamberti, F. y Baines, R. C. (1970)**. Infectivity of three biotypes of the citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) on two varieties of olive. *Plant Dis. Repr.* 54:717-718.
- Lamberti, F. y Di Vito, M. (1972)** Sanitation of root-knot nematode infected olive-stocks, pp. 401-411 En: *Actas III Congr. Un. fitopat. medit.*, Oeiras, Portugal.
- Lamberti, F. y Lownsbery., B. F. (1968)**. Olive varieties differ in reaction to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Phytopath. Mediterr.* 7:48-50.
- Lamberti, F. y Vovlas, N. (1993)** Plant parasitic nematodes associated with olive. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 23:481-488.
- Lamberti, F., Boiboi J. B., Ciancio, A., Tuopay, D. K., Arias Jiménez, E. y Elia, F. (1992)** Plant parasitic nematodes associated with tree crops in Liberia. *Nematol. medit.* 20:79-85.
- Lamberti, F., Ciccarese, F., Sasanelli, N., Ambrico, A., D'Addabbo, T. y Schiavone,**

- D. (2001)** Relationships between plant parasitic nematodes and *Verticillium dahliae* on olive. *Nematologia Mediterranea* 29:3-9.
- Lamberti, F., Greco, N. y Zauchi, H. (1975)** A nematological survey of date palms and other major crops in Algeria. *FAO Plant Prot. Bull.* 23:156-160.
- Lazarovits, G., Hawke, M. A., Tomlin, A. D., Olthof, T. H. A. y Squire, S. (1991)** Soil solarization to control *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans* on potatoes in central Ontario. *Can J. Plant Pathol.* 13:116-123.
- Lazarovits, G., Conn, K. y Tenuta, M. (1997)** Control of *Verticillium dahliae* with soil amendments; efficacy and mode of action. pp. 274-291. En: *Advances in Verticillium research and disease management* (Tjamos, E. C., Rowe, R. C., Heale, J. B. y Fravel, D. R., eds.). APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Lazarovits, G., Tenuta, M. y Conn, K. L. (2000)** Utilization of high nitrogen and swine manure amendments for control of soil-borne diseases: efficacy and mode of action. pp. 59-64. En: *Acta Hort. 532: Proceedings of the International Symposium on chemical and non-chemical soil and substrate disinfestations.* (Gullino, M. L. y Garibaldi, A., eds.). Pub. International Society for Horticultural Science. ISHS, Leuven, Bélgica.
- Lazzeri, L. y Manici, L. M. (2000)** The glucosinolate-myrosinase system: a natural and practical tool for biofumigation. pp. 89-96. En: *Acta Hort. 532: Proceedings of the International Symposium on chemical and non-chemical soil and substrate disinfestations.* (Gullino, M. L. y Garibaldi, A., eds.). Pub. International Society for Horticultural Science. ISHS, Leuven, Bélgica.
- Lee, Y. B. y Evans, A. A. F. (1973)** Correlation between attractions and susceptibilities of rice varieties to *Aphelenchoides besseyi*. *Korean J. Plant Prot.*12:147-151.
- Lewis SA (1986)** Nematode-plant compatibility. pp.246-252. En: *Vistas in nematology* (Veech, J. A. y Dickson, D. W., eds.) Soc. Nematol., Hyattsville, MD.
- Lodha, S. y Mawar, R. (2000)** Utilizing solar heat for enhancing efficiency of cruciferous residues for disinfesting soil-borne pathogens from aridisols. pp. 49-52. En: *Acta Hort. 532: Proceedings of the International Symposium on chemical and non-chemical soil and substrate disinfestations.* (Gullino, M. L. y Garibaldi, A., eds.). Pub. International Society for Horticultural Science. ISHS, Leuven, Bélgica.
- López-Cosme, E. y González-Torres, R. (2000)** Integración de la solarización y la

micorrización en el control de la fusariosis vascular del melón. p. 98. En: *Programa y resúmenes. X Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Valencia.*

- López-Escudero, F. J. y Blanco-López, M. A. (2001)** Effect of a single or double soil solarization to control *Verticillium* wilt in established olive orchards in Spain. *Plant Dis.* 85:489-496.
- López-Herrera, C. J., Basallote-Ureba, M. J., Pérez-Jiménez, R. M., Verdú-Valiente, B. y Melero-Vara, J. M. (1996)** Control of *Dematophora necatrix* and *Phytophthora cinnamomi* in established avocado orchards by soil solarization. *Phytoparasitica* 24:76
- Lorrain, R. (1998)** Moyens de contrôle du risque nématologique. *L'arboriculture fruitière* 514:37-41.
- Lorrain, R. y Tarditti, M. T. (1992)** Risque Nématologique. *L'arboriculture fruitière* 453:27-29.
- Loveys, B. R. y Bird, A. F. (1973)** The influence of nematodes on photosynthesis in tomato plants. *Physiol. Plant. Pathol.* 11:11-21.
- Lownsbery, B. F. (1959)** Studies of the nematode *Criconemella xenoplax*, on peach. *Plant Dis. Repr.* 43:913-917.
- Lownsbery, B. F. (1961)** Factors affecting population levels of *Criconemoides xenoplax*. *Phytopathology* 51:101-103.
- Lownsbery, B. F., Hart, H. W. y Martin, G. C. (1969)** Procedures for controlling root-lesion nematodes. *Diamond Walnut News* 51:5-6.
- Lownsbery, B. F., Moody, E. H., Moretto, A., Noel, G. R. y Burlando, T. M. (1978)** Pathogenicity of *Macrophostonia xenoplax* to walnut. *J. Nematol.* 10:232-236.
- Maas, P. W. T. (1987)** Physical methods and quarantine. pp. 265-293. En: *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. (Brown, R. H. y B. R. Kerry, eds.) Academic Press Australia.
- Madulu, J. D. y Trudgill, D. L. (1994)**. Influence of temperature on the development and survival of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 40:230-243.
- Maggenti, A. R. (1991)** Nemata: Higher classification. pp. 147-187. En: *Manual of Agricultural Nematology* (Nickle, W., ed.). Marcel Dekker, Inc., NewYork.

- Mahrer, Y. (1979)** Prediction of soil temperatures of a soil mulched with transparent polyethylene. *J. Appl. Meteorol.* 18:1263-1267.
- Mahrer, Y. y Katan, J. (1981)** Spatial soil temperatures regime under transparent polyethylene mulch. Numerical and experimental studies. *Soil Sci.* 131:82-87.
- Mai, W. F. y Parker, K. G. (1967)** Root diseases of fruit trees in New York State. Populations of *Pratylenchus penetrans* and growth of cherry in response to soil treatment with nematodes. *Plant Dis. Reprtr.* 51:398-401.
- Mai, W. F. y Abawi, G. S. (1978)** Determining the cause and extent of apple, cherry, and pear replant diseases under controlled conditions *Phytopathology* 68:1540-1544.
- Mai, W. F. y Abawi, G. S. (1981)** Controlling replant diseases of pome and stone fruits in northeastern United States by preplant fumigation. *Plant Dis.* 65:859-864.
- Mai, W. F., Merwin, I. A. y Abawi, G. S. (1994)** Diagnosis, etiology and management of replant disorders in New York cherry and apple disorders. *Acta Horticulturae* 363:33-41.
- Mankau, R. (1982)** Attractiveness, predacity and ecological relationships of nematode-trapping fungi associated with the citrus nematode. *Nematologica* 28:158-159
- Margalef, R. (1974)** *Ecología*. Ediciones Omega. Barcelona. 951 pp..
- Marois, J. J., Dunn, M. T. y Papavizas, G. C. (1983)** Reinvasion of Fumigated Soil by *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *Phytopathology* 73:680-684.
- Marre, R., Caubel, G, Champion, R. y Pedron, J. P. (1983)** Traitment des semences de luzerne et de trefle au bromure de méthyle contre le nematode des tiges. *Phytoma* 352:48-50.
- Marte, M., Gadani, F., Savino, V. y Rugini, E. (1986)** Strawberry latent ringspot virus associated with a new disease of olive in central Italy. *Plant Dis.*70:171-172.
- Marull, J. y Pinochet, J. (1991)** Host suitability of *Prunus* rootstocks to four *Meloidogyne* species and *Pratylenchus vulnus* in Spain. *Nematropica* 21:185-195.
- Marull, J., Pinochet, J. y Verdejo, S. (1990)** Respuesta de cinco cultivares de almendro a cuatro especies de nematodos lesionadores en España. *Nematropica* 20:143-151.
- Marull, J., Pinochet, J., Verdejo, S. y Soler, A. (1991)** Reaction of *Prunus* Rootstocks to *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* in Spain. *J. Nematol.* 23:564-569.

- Mayton, H. S., Olivier, C., Vaughn, S. F. y Loria, R. (1996)** Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. *Phytopathology* 86:267-271.
- McElroy, F. D. (1972)** Nematodes of tree fruits and small fruits. pp. 335-376. En: *Economic nematology* (Webster, J.M., ed.) Academic Press. London.
- McGuidwin, A. E. y Layne, T. L. (1995)** Response of nematode communities to sudangrass and sorghum-sudangrass hybrids grown as green manure crops. *J. Nematol.* 27:609.
- McGuidwin, A. E., Bird, G. W. y Safir, G. R. (1985)** Influence of *Glomus fasciculatum* on *Meloidogyne hapla* infecting *Allium cepa*. *J. Nematol.* 17:389-395.
- McInnis, R., Kluepfel, D. A. y Zehr, W. I. (1990)** Suppression of *Criconebella xenoplax* on peach by rhizosphere bacteria. *Nematologica* 36:370.
- McKenry, M. V. (1985)** Nematodes. pp. 127-133. En: *Integrated Pest Management for Almonds*. Publication 3308. Division of Natural Resources. University of California Publications. Oakland.
- McKenry, M. V. (1989a)** Damage and development of several nematode species in a plum orchard. *Appl. Agric. Res.* 4:10-14.
- McKenry, M. V. (1989b)** Nematodes of stone-fruit, California. pp. 761-770. En: *The Peach* (Childers, N.F. y Sherman, W.B., eds.). Horticultural Publications, Gainesville, FL.
- McKenry, M. V. (1994)** Nematodes of olive. pp. 97-99. En: *Olive Production Manual* (Ferguson, L., Sibbett, G. S. y Martin, G. C., eds.) University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3353.
- McKinley, R. T. y Talboys, P. W. (1979)** Effects of *Pratylenchus penetrans* on development of strawberry wilt caused by *Verticillium dahliae*. *Ann. appl. Biol.* 92:347-357
- McLeod, R., Reay, F. y Smyth, J. (1997)** *Plant Nematodes of Australia Listed by Plant and by Genus*. NSW Agriculture and RIRDC. 201 pp.
- McSorley, R. y Gallaher, R. N. (1995)** Effect of yard waste compost on plant-parasitic nematode densities in vegetable crops. *J. Nematol.* 27:545-549.
- Mehta, U. K. y Raski, D. J. (1971)** Revision of the genus *Criconema* Hofmänner and

Menzel, 1914 and other related genera (Criconematidae : Nematoda). *Indian J. Nematol.* 1:145-198.

**Melakerberhan, H., Ferris, H., (1989)** Impact of *Meloidogyne incognita* on physiological efficiency of *Vitis vinifera*. *J. Nematology* 21:74-80.

**Melakerberhan, H. y Webster, J. M. (1993)** The phenology of plant-nematode interaction and yield loss. pp 26-41. En: *Nematode interactions* (Khan, M.W., ed.) Chapman & Hall, New York.

**Melakerberhan, H., Webster, J. M. y Brooke, R. C. (1984)** Improved techniques for measuring the CO<sub>2</sub> exchange rate of *Meloidogyne*-infected beans. *Nematologica* 30:213-221.

**Melakerberhan, H., Webster, J. M. y Brooke, R. C. (1985)** The influence of *Meloidogyne incognita* on growth, nutrient content and physiology of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant. Pathol.* 26:259-268.

**Melakerberhan, H., Webster, J. M. y Brooke, R. C. (1986)** Relationship between physiological response and yield loss of different age French bean to *Meloidogyne incognita*. *Plant Pathol.* 35:203-213.

**Melakeberhan, H., Webster, J. M., Brooke, R. C., D'Auria, J. M. y Cackette, M., (1987)** Effect of *Meloidogyne incognita* on plant nutrient concentration and its influence on the physiology of beans. *J. Nematol.* 19:324-330.

**Melakerberhan, H, Ferris, H. y Dias. J. (1990)** Physiological response of resistant and susceptible *Vitis vinifera* cultivars to *Meloidogyne incognita*. *J. Nematol.* 22:224-230.

**Melero-Vara, J. M., Blanco-López, M. A., Bejarano-Alcázar, J. (1995)** Control of *Verticillium* wilt of cotton by means of soil solarization and tolerant cultivars in southern Spain. *Plant Pathol.* 44:250-260.

**Meon, S., Wallace, H. R. y Fisher, J. R. (1978)** Water relations of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Early Dwarf Red) infected with *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. *Physiol. Plant. Pathol.* 13:275-281.

**Merwin, I. A. y Stiles, W. C. (1989)** Root-lesion nematodes, potassium deficiency and prior cover crops as factors in apple replant disease. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114:724-728.

**Mian, I. H. y Rodríguez-Kábana, R. (1982)** Organic amendments with high tannin and

phenolic contents for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. *Nematropica* 12:221-234.

- Michelakis, N. y Barbopoulou, E. (1999)** Olive tree stem diameter variations under irrigation based on plant and soil parameters. pp. 391-394. En: *Acta Hort. 474:Proceedings of the Third Symposium on Olive Growing. Chania, Crete, Greece.*
- Miller, P. M., Sands, D. C. y Rich, S. (1973)** Effects of industrial residues, wood-fibre wastes, and chitin on plant parasitic nematodes and some soil borne disease. *Plant Dis. Repr.* 57, 438-442.
- Ministerio de Agricultura (1972)** *El Olivar Español*. Madrid. 136 pp.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2000)** *Manual de Estadística Agraria, 2000*. Dirección General de Planificación Económica y Coordinación Institucional. Madrid. 331 pp..
- Mojtahedi, H. y Lownsbery, B. F. (1975)** Pathogenicity of *Criconemoides xenoplax* to prune and plum rootstocks. *J. Nematol.* 7:114-119.
- Mojtahedi, H., Santo, G. S., Hang, A. N. y Wilson, J. H. (1991a)** Suppression of root-knot nematode populations with selected rapessed cultivars as green manure. *J. Nematol.* 23:170-174.
- Mojtahedi, H., Santo, G. S. y Pinkerton, J. N. (1991b)** Efficacy of Ethoprop on *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi* and enhanced biodegradation in soil. *J. Nematol.* 23:372-379.
- Mojtahedi, H., Santo, G. S. e Ingham, R. E. (1993)** Suppression of *Meloidogyne chitwoodi* with sudangrass cultivars as green manure. *J. Nematol.* 25:303-311.
- Monke, B. J., Zeck, W. M. y Noegel, K. A. (1992)** Citrus trunk application of fenamiphos to control *Tylenchulus semipenetrans*. pp. 1175-1180. En: *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference. Pest and Diseases, 3.*
- Monticelli, S., Puppi G. y Damiano, C. (2000)** Effects of in vivo mycorrhization on micropropagated fruit tree rootstocks. *Appl. Soil Ecol.* 15:105-111.
- Moriana, A. (2001)** *Relaciones hídricas del olivo (Olea europaea L.) bajo riego deficitario*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 156 pp.
- Moriones, E. y Luis, M. (1996)** Métodos de control de las virosis. pp. 333-377. En:

*Patología Vegetal Tomo I* (Llácer, G, López, M. M., Traperó, A. y Bello, A., eds.).  
Sociedad Española de Fitopatología–PHYTOMA España, Valencia.

- Mountain, W. B. y Patrick, Z. A. (1959)** The peach replant problem in Ontario. VII. The pathogenicity of *Pratylenchus penetrans* (Cobb, 1917) Filip. & Stek. 1941. *Can. J. Bot.* 37:459-470.
- Müller, J. (1977)** Interactions between five species of *Pratylenchus* and *Verticillium albo-atrum*. *Z. Pflanzenkr. Pflanzensch.* 84:215-220.
- Muller, R. y Gooch, P. S. (1982)** Organic amendments in nematode control, an examination of the literature. *Nematropica* 12:319-326.
- Murphy, J. G., Rafferty, S. M. y Cassells, A. C. (2000)** Stimulation of wild strawberry (*Fragaria vesca*) arbuscular mycorrhizas by addition of shellfish waste to the growth substrate: interaction between mycorrhization, substrate amendment and susceptibility to red core (*Phytophthora fragariae*). *Appl. Soil Ecol.* 15:153-158.
- Nair, S. K., Peethambaran, C. K., Geetha, D., Nayar, K. y Wilson, K. I. (1990)** Effect of soil solarization on nodulation, infection by mycorrhizal fungi and yield of cowpea. *Plant Soil* 125:153-154.
- Nandini, G. y Mathur, V. K. (1995)** Erradication of root-knot nematodes from grapevine rootstocks by thermal therapy. *Nematologica* 41:269-271.
- Nasr, T. A., Ibrahim, I. K. A., El-Azab, E. M. y Hassan, M. W. A. (1980)** Effect of root-knot nematodes on the mineral amino acid and carbohydrate concentrations of almond and peach rootstocks. *Nematologica* 26:133-138.
- Navarro, L. (1994)** Programa de mejora sanitaria de variedades de agrios. *Phytoma* 58:10-16.
- Navas, A., Bello, A. y Arias, M. (1988)** Ecology and potential distribution of *Xiphinema diversicaudatum* and *X. pachtaicum* (Nematoda: Longidoridae) in continental Spain. *Nematologica* 34:314-330.
- Nemeth, M. (1986)** Control of fruit tree virus diseases. pp. 121-144. En: *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. (M. Nijhoff, Ed.). W. Junk Publishers, Hungary.
- Newsham, K. K., Fitter, A. H. y Watkinson, A. R. (1995)** Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Ecology & Evolution* 10:407-411.

- Nico, A. (2002)** El empleo de enmiendas orgánicas para el control de hongos de suelo y nemátodos. En prensa En: *Agroecología: El camino hacia una agricultura sustentable* (Sarandón, S. J., Ed.) Ediciones Científicas Latinoamericanas, La Plata.
- Noling, J. W. (1995)** Physical methods of nematode control. *J. Nematol.* 27:512 (Res.).
- Noling, J. W. (1997)**. Relative lethal dose, a time-temperature model of thermally induced mortality of nematodes. *J. Nematol.* 29:596-597 (Res.)
- Norton, D. C. (1989)** Abiotic soil factors and plant-parasitic nematode communities. *J. Nematol.* 21:299-307.
- Nyczepir, A. P. (1990)** Influence of *Criconemella xenoplax* and pruning time on short life of peach trees. *J. Nematol.* 22:97-100.
- Nyczepir, A. P. (1991)** Nematode management strategies in stone fruits in the United States. *J. Nematol.* 23:334-341.
- Nyczepir, A. P. y Halbrendt, J. M. (1993)** Nematode Pests of Deciduous Fruit and Nut Trees. pp. 381-425. En: *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture* (Evans K., Trudgill D. L, y Webster J. M, eds) CAB International.
- Nyczepir, A. P. y Ole Becker, J. (1998)** Fruit and Citrus Trees. pp. 637-684. En: *Plant Nematode Interactions* (Barker, K. R., Pederson, G. A. y Windham, G. L., eds.) American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Nyczepir, A. P., Zehr, E. I., Lewis, S. A. y Harshman, D. C. (1983)** Short life of peach trees induced by *Criconemella xenoplax*. *Plant Dis.* 67:507-508
- Nyczepir, A. P., Reilly C. C. y Okie W. R. (1987)** Effect of initial population density of *Criconemella xenoplax* on reducing sugars, free amino acids, and survival of peach seedlings over time *J. Nematol.* 19:296-303.
- Nyczepir, A. P., B. W. Wood y G. L. Reighard (1997)** Impact of *Meloidogyne incognita* on the incidence of peach tree short life in the presence of *Criconemella xenoplax*. *J. Nematol.* 29:725-730.
- O'Bannon, J. H. y Nemec, S. (1979)** The response of citrus limon seedlings to a symbiont, *Glomus etunicatus*, and a pathogen, *Radopholus similis*. *J. Nematol.* 11:270-275.

- O'Bannon, J. H. y Tarjan, A. C. (1973)** Preplant Fumigation for Citrus Nematode Control in Florida. *J. Nematol.* 5:88-95.
- O'Bannon, J. H. y Tarjan, A. C. (1979)** Management of *Radopholus similis* infested citrus with DBCP and oxamyl. *Pl. Dis Repr.* 63:456-460.
- O'Bannon, J. H. y Taylor, A. C. (1967)** Control of nematodes on Citrus seedlings by chemical bare-root dip. *Pl. Dis Repr.* 51:995-998.
- O'Bannon, J. H. y Tomerlin, A. T. (1973)** Citrus Tree Decline Caused by *Pratylenchus coffeae*. *J. Nematol.* 5:311-316.
- O'Bannon, J. H. y Tomerlin, A. T. (1977)** Control of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, with DBCP and oxamyl. *Pl. Dis Repr.* 61:450-454.
- O'Bannon, J. H., Radewald, J. D., Tomerlin, A. T., Inserra, R. N., (1976)** Comparative Influence of *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae* on Citrus. *J. Nematol.* 8:58-63.
- O'Bannon, J. H., Inserra, R. N., Nemec, S. y Vovlas, N. (1979)** The influence of *Glomus mosseae* on *Tylenchulus semipenetrans* infected and uninfected *Citrus limon* Seedlings. *J. Nematol.* 11:247-250.
- Oduor Owino, P. (1993)** Effects of Aldicarb, *Datura stramonium*, *Datura metel* and *Tagetes minuta* on the pathogenicity of root-knot nematodes in Kenya. *Crop Prot.* 12:315-317.
- Oduor Owino, P., Waudu, S. W. y Sikora, R. A. (1993)** Biological control of *Meloidogyne javanica* in Kenya: effect of plant residues, Benomyl and decomposition products of mustard (*Brassica campestris*). *Nematologica* 39:127-134.
- Orion, D. (1995)** Structure and function of the root-knot (*Meloidogyne* spp.) gelatinous matrix. *Nematologica* 41:395-397.
- Orion, D., y Kritzman, G. (1991)** Antimicrobial activity of *Meloidogyne javanica* gelatinous matrix. *Rev. Nematologie* 14:481-483.
- Overman, A. J. (1981)** Off-season land management and soil fumigation for tomato on sandy soil. *J. Nematol.* 13:455 (Res.)
- Overman, A. J. y Jones, J. P. (1987)** Soil solarization, reaction and fumigation effects on double-cropped tomato under full-bed mulch. *Proc. Fla. State Horic. Soc.* 93:248-

250.

- Paredes, C., Roig, A., Bernal, M. P., Sánchez-Monedero, M.A. y Cegarra, J. (2000)** Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes. *Biol. Fertil. Soils* 3:222-227.
- Patel, R. R., Patel, D. J. y Patel, B. A. (1991)** Influence of organic amendments on growth and sporulation of nematophagous fungus *Pacylomices lilacinus* (Thom.) Samson. *Curr. Nematol.* 2:39-40.
- Peña-Neira, A., Fernández de Simón, B., García-Vallejo, M. C., Hernández, T., Cadahía, E. y Suarez J. A. (2000)** Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. *Eur. Food Res. Technol.* 211:257-261.
- Peña-Santiago, R. (1990)** Plant-parasitic nematodes associated with olive (*Olea europea* L.) in the province of Jaén, Spain. *Revue Nématol.* 13:113-115.
- Pera, J. y Calvet, C. (1989)** Suppression of Fusarium Wilt of Carnation in a Composted Pine Bark and a Composted Olive Pumice. *Plant Dis.* 73:699-700.
- Pérez, F. y Pérez, M. C. (1996)** *El alcornoque y el corcho*. Asociación Cultural Vicente Rollano, Badajoz. 214 pp.
- Pérez, J. (2000)** *Influencia de dos tipos de substrato en la micorrización (Glomus mossae) y en el crecimiento de plántones de olivo (Olea europaea)*. Trabajo Profesional Fin de Carrera. ETSIAM Córdoba. 107 pp.
- Perrotta, G., Inserra, R. N., Vito, M. y Cartia, G. (1979)** Effetto dell'infestazione di meloidogyne javanica sullo sviluppo di semenzali di agrumi. *Nematol. medit.* 7:7-14.
- Perry, R. N. (1987)** Host-Induced hatching of phytoparasitic nematode eggs. pp. 159-164. En: *Vistas in nematology* (Veech, J. A. y Dickson, D. W., eds.). Soc. Nematol., Hyattsville, MD.
- Perry, R. N. y Aumann, J. (1998)** Behaviour and sensory responses. En: *The Physiology and biochemistry of Free-Living and Plant Parasitic Nematodes* (Perry, R.N. y Wright, D.J., eds.) CAB International Publishing, Wallingford UK.
- Perry, R. N. y Wright, D. J. (1998)** *Free-living and plant parasitic nematodes*. Wallingford, UK., CAB International. 438 pp.
- Philis, I. (1988)** Control of the citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb) in

Valencia orange groves in Cyprus. *Nematol Medit.* 16:159-161.

**Pinochet, J. (1996)** Selección de patrones de frutales de hueso frente a nematodos. pp. 1119-1139. En: *Patología Vegetal. Tomo II* (Llácer, G., López, M. M., Trapero, A. y Bello, A., eds.). Sociedad Española de Fitopatología, Phytoma, Madrid.

**Pinochet, J. (1998)** El control de calidad sanitaria y genética en un vivero productor de plantas de olivo. *Phytoma España* 102 13-14.:

**Pinochet, J., Cordero, D. y Bernal, J. A. (1987)** Nematodos en viveros frutales en Panamá, diagnóstico, manejo e importancia económica. *Nematropica* 17:111-124.

**Pinochet, J., Verdejo, S. y Marull, (1989)** Evaluación de siete patrones de *Prunus* a tres especies de *Meloidogyne* en España. *Nematropica* 19 :125-134.

**Pinochet, J., Verdejo, S. y Marull, J. (1991)** Host suitability of eight *Prunus* spp. and one *Pyrus communis* rootstocks to *Pratylenchus vulnus*, *P. neglectus* and *P. thornei*. *J. Nematol.* 23:570-575.

**Pinochet, J., Bello, A. y Rodríguez-Kábana, R. (1992a)** Nematodos en viveros frutales y cítricos, su introducción, dispersión y control. *Fruticultura Profesional* 44:55-61.

**Pinochet, J., Marull J. y Felipe A (1992b)** Respuesta de patrones de melocotonero, ciruelo y cerezo de reciente introducción en España a *Meloidogyne javanica*. *Nematropica* 22:99-102.

**Pinochet, J., Verdejo-Lucas S., Soler, A. y Canals, J. (1992c)** Host range of a population of *Pratylenchus vulnus* in commercial fruit, nut, citrus, and grape rootstocks in Spain. *J. Nematol.* 24:693-698.

**Pinochet, J., Marull, J., Rodríguez-Kábana, R., Felipe, A. y Fernández, C. (1993a)** Pathogenicity of *Pratylenchus vulnus* on plum rootstocks. *Fundam. appl. Nematol.* 16:375-380.

**Pinochet, J., Camprubi, A. y Calvet, C. (1993b)** Effects of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* and the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the growth of EMLA-26 apple rootstock. *Mycorrhiza* 4:79-83.

**Pinochet, J., Calvet, C., Camprubí, y Fernández, C. (1995a)** Growth and nutritional response of Nemared peach rootstock infected with *Pratylenchus vulnus* and the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Fund. Appl. Nematol.* 17:205-210.

**Pinochet, J., Calvet, C., Camprubí, y Fernández, C. (1995b)** Interaction between the

- root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* and the mycorrhizal association of *Glomus intraradices* and Santa Lucia 64 cherry rootstock. *Plant Soil* 170:323-329.
- Pinochet, J., Fernández, C. y Alcañiz, E. (1996a)** Damage by a Lesion Nematode, *Pratylenchus vulnus*, to *Prunus* Rootstocks. *Plant Dis.* 80:754-757
- Pinochet, J., Anglés, M., Dalmau, E., Fernández, C. y Felipe, A. (1996b)** *Prunus* rootstock evaluation to root-knot and lesion nematodes in Spain. *J. Nematol.* 28:616-623.
- Pinochet, J., Calvet, C., Camprubí, A., Fernández, C. (1996c)** Interactions between migratory endoparasitic nematodes and arbuscular mycorrhizal fungi in perennial crops: a review. *Plant Soil* 185:183–190
- Pinochet, J., Camprubi, A., Calvet, C., Fernández, C. y Rodríguez-Kábana, R. (1998)** Inducing tolerance to the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* by early mycorrhizal inoculation of micropropagated myrobalan 29 C plum rootstock. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:342-347.
- Pinochet, J., Calvet, C., Hernández-Dorrego, A., Bonet, A., Felipe, A. y Moreno, M. (1999)** Resistance of peach, and plum rootstocks from Spain, France, and Italy to Root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *HortSci.* 35:1333-1337.
- Pinochet, J., Fernández, C., Calvet, C., Hernández-Dorrego, A. y Felipe, A. (2000)** Selection against *Pratylenchus vulnus* population attacking *Prunus* rootstocks. *HortSci.* 35:1333-1337.
- Pitcher, R., Patrick, Z. A. y Mountain, W. B. (1960)** Studies on the host-parasite relations of *Pratylenchus penetrans* (Cobb) to apple seedlings. I. Pathogenicity under sterile conditions. *Nematologica* 5:309-314.
- Pliego, F. (1992)** El material vegetal y su propagación: la micropropagación. pp. 87-103. En: *Nueva Horticultura. Tecnología y economía de los sistemas hortícolas intensivos* (Ramos, E. y Rallo, L., eds.). Ed. Mundi-Prensa-Universidad Hispanoamericana Santa María de la Rábida. Madrid.
- Pline, M. y Dusenberry D. B. (1987)** Responses of plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita* to carbon dioxide determined by video camera-computer tracking. *J. Chem. Ecol.* 13:873-888.
- Poinar Jr., G. O. (1983)** *The natural history of nematodes*. Prentice-Hall, NJ. 323 pp.

- Poskuta, J. W., Dropkin, V. H. y Nelson, C. J. (1986)** Photosynthesis, photorespiration, and respiration of soybean after infection with root nematodes. *Photosynthetica* 20:405-410.
- Potter, J. W., Dirks, V. A., Johnson, P. W., Olthof, T. H. A., Layne, R. E. C. y McDonnell, M. M. (1984)** Response of peach seedlings to infection by the root lesion nematode *Pratylenchus penetrans* under controlled conditions. *J. Nematol.* 16:317-322.
- Poucher, C., Ford, H. W., Suit, R. F. y Du Charme, E. P. (1967)** Burrowing nematode in citrus. *Florida Department of Agriculture & Consumer Services. Division of Plant Industry. Bulletin N° 7.* Tallahassee, US.
- Pullman, G. S., DeVay J. E., Garber, R. H. y Weinhold A. R. (1981)** Soil Solarization: Effects on *Verticillium* wilt of cotton and soil borne populations of *V.dahliae*, *Pythium* spp, *R .solani* and *T. basicola*. *Phytopathology* 71:954-959
- Punja, Z. K. y Zhang, Y. (1993)** Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J. Nematol.* 25:526-540.
- Quinn, M. A. (1987)** The influence of saprophytic competition on nematode predation by nematode-trapping fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 49:170-174.
- Radewald, J. D., O'Bannon, J. H. y Tomerlin, A. T. (1971)** Temperature effects on reproduction and pathogenicity of *Pratylenchus coffeae* and *P. brachyurus* and survival of *P. coffeae* in roots of *Citrus jambhiri*. *J. Nematol.* 3:390-394.
- Rallo Romero, L. (1998a).** Sistemas frutícolas de secano: el olivar. pp. 471-487. En: *Agricultura Sostenible*, (R.M. Jiménez Díaz y J. Lamo de Espinosa, eds.) Agrofuturo-Life-eds. Mundi-Prensa. Madrid.
- Rallo Romero, L. (1998b).** El olivar y la innovación tecnológica. *Phytoma* 102:6-8.
- Ramming, D. W. y Tanner, O. (1983)** 'Nemared' peach rootstock. *HortSci.* 18:376.
- Ramos Clavero, P. (1969)** Estudios epidemiológicos sobre la *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hugh. en la zona de Granada. *Ars Pharm.* 9:453-460.
- Raymundo, S. A. y Alcazar, J. (1986)** Increasing efficiency of soil solarization in controlling root-knot nematodes by using two layers of plastic mulch. *J. Nematol.* 18:628 (Res.).
- Raymundo, S. A., Alcazar, J. y Salas, R. (1986a)** A technique for testing the efficiency

- of soil solarization in controlling root-Knot nematodes at varying soil depths. *J. Nematol.* 18:629 (Res.).
- Raymundo, S. A., Alcazar, J. y Salas, R. (1986b)** Effectiveness of soil solarization and dazomet in controlling root knot nematodo and weeds in potato fields. *Philippine Agriculturist* 69:89-97.
- Reddy, K. C., Soffes, A. R., Prine, G. M. y Dunn, R. A. (1986)** Tropical legumes for green manures. II: Nematode populations and their effects on succeeding crop yields. *Agron. J.* 78:5-10.
- Ricciardi, P., Amici, A. y Lalatta, F. (1975)** Ulteriori indagini sul ruolo di *Pratylenchus vulnus* nel problema del reimpianto del pesco. *Riv. Ortoflorofrut. It.* 59:109-123.
- Rich, J. R., Rahi, G. S., Opperman, C. H. y Davis, E. L. (1989)** Influence of the castor bean (*Ricinus communis*) lectin (Ricin) on motility of *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 19:99-103.
- Ridolfi, M., Patumi, M., D'addabbo, T., Sasanelli, N. y Lemos, R. J. (2001)** Enzymatic response of olive varieties to parasitism by *Xiphinema index* (Nematoda: Longidoridae). *Russian J. Nematol.* 9:25-32.
- Riedel, R. M., Rowe, R. C., Martin, M. J. (1985)** Differential interactions of *Pratylenchus crenatus*, *P. penetrans*, and *P. scribneri* with *Verticillium dahliae* in potato early dying disease. *Phytopathology* 75:419-422.
- Riffle, J. W. (1972)** Effect of certain nematodes on the growth of *Pinus edulis* and *Juniperus monosperma* seedlings. *J. Nematol.* 4:91-100.
- Rinaldelli, E. y Mancuso, S. (1998)** Respuesta a corto y largo plazo de plantones de olivo (*Olea europaea* L.) micorrizados y no micorrizados cultivados en substratos salinos. *Olivae* 74:45-49.
- Ristaino JB y W Thomas (1997)** Agriculture, Methyl Bromide, and the Ozone Hole. Can We Fill the Gaps? *Plant Dis.* 81:964-977.
- Ritchie, D. F. (1986)** Population dynamics of ring nematodes an peach tree sort life in North Carolina. pp. 34-37. En: *Proceedings of the Stone Fruit Decline Workshop. Vol 3.* Clemson University. Clemson SC.
- Ritzinger, C. H. S. P. y McSorley, R. (1998)** Effect of fresh and dry organic amendments on *Meloidogyne arenaria* in greenhouse experiments. *Nematropica* 28:173-185.

- Rizaeva, S. M. (1983)** [Ocurrence of root-knot nematodes in new greenhouse nurseries.] *Usbeksii Biologicheskii Zhurnal* 6:64.
- Roan, J., Mareggiani, G., García, M. (1992)** Efecto de una enmienda orgánica y nematicida sobre la dinámica poblacional de *Paratylenchus* sp. (Nematoda, Paratylenchinae) en apio. *Rev. Facultad de Agronomía Bs. As.* 13:227-231.
- Roberts, P. A. (1983)** The future of nematology: Integration of new and improved management tactics and strategies. *J. Nematol.* 25:383-394.
- Roberts, P. A. (1992)** Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes. *J. Nematol.* 24:213-227.
- Rodríguez-Kábana, R., Morgan-Jones, G. y Chet, I. (1987)** Biological control of nematodes: Soil amendments and microbial antagonists. *Plant Soil* 100:237-247.
- Rodríguez-Kábana, R., Boube, D. y Young, R. W. (1989)** Chitinous materials from blue crab for control of root-knot nematode, I. Effect of urea and enzymatic studies. *Nematropica* 19:53-74.
- Rodríguez-Kábana, R., Weaver, D. B., Robertson, D. G., Weaver, C. F. y Garden, E. L. (1991)** Rotations of soybean with tropical corn and sorghum for the management of nematodes. *J. Nematol.* 23:662-667.
- Rodríguez-Kábana, R., Estaún, V., Pinochet, J. y Marfá, O. (1995)** Mixtures of olive pomace with different nitrogen sources for the control of *Meloidogyne* spp. on tomato. *J. Nematol.* 27:575-584.
- Roe, N. E., Stofella, P. J. y Bryan, H. H. (1993)** Municipal solid waste compost suppresses weeds in vegetable crops alleys. *HortSci.* 29:1171-1172.
- Rohlf, F. J. (1975)** Note on Algorithm 81: Dendrogram plot. *Computer J.* 18:90-92.
- Roldán-Fajardo, B. E. y Barea, J. M. (1986)** Mycorrhizal dependency in the olive tree (*Olea europaea* L.) pp. 323-326. En: *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Proceeding of the First European Symposium on Mycorrhizae. Dijon, 1985.
- Rössner, J. (1971)** Untersuchungen zur Entwicklung von *Rotylenchus robustus*. *Nematologica* 17:255-261.
- Rowe, R. C., Riedel, R. M. y Martin, M. J. (1985)** Synergistic interactions between

- Verticillium dahliae* and *Pratylenchus penetrans* in potato early dying disease. *Phytopathology* 75:412-418.
- Rouse, D. I. (1988)** Use of crop growth-models to predict the effects of disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:183-201.
- Ruggieri, G. (1946)**: Una nuova malattia dell'olivo. *L' Italia Agricola* 83:369-372.
- Rugini, E. (1995)** Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). pp. 171-189. En: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 2* (Jain, S., Gupta, P. y Newton, R., eds.) Kluiver Academic Publishers, Netherlands.
- Runia, W. T. (1984)** A recent development in steam sterilisation. *Acta Hortic.* 152:195-200.
- Ryan, N. A., Duffy, E. M., Cassells, A. C. y Jones, P. W. (2000)** The effect of mycorrhizal fungi on the hatch of potato cyst nematodes. *Appl. Soil Ecol.* 15:233-240.
- S.´Jacob, J., Berkum, J., Guevara-Pozo, D. (1959)** *Tylenchorrynchus parvus* (Nematoda) hallado por primera vez en Europa en muestras de suelo de Granada (España). *Rev. Ibér. Parasitol.* 19:427-428.
- Saad, A. T. y Nienhaus, F. (1969)** Plant diseases in Lebanon. *Z. Pflanzenkr. Pflanzensch.* 76:537-551.
- Saeed, I. A. M., McGuidiwin, A. E. y Rouse, D. I. (1997)** Synergism of *Pratylenchus penetrans* and *Verticillium dahliae* manifested by reduced gas exchange in potato. *Phytopathology* 87:435-439.
- Saleh, H. y Sikora, R. A. (1984)** Relationship between *Glomus fasciculatum* root colonization on cotton and its effecto on *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 30:230-237.
- Sánchez-Hernández, M. E., Pérez de Algava, A., Blanco-López, M. A. y Trapero-Casas, A. (1996)** A disease survey of the drying syndrome in new olive tree plantations in Southern Spain. *Olea* 23:137.
- Sánchez-Hernández, M. E., Ruiz Dávila, A., Pérez de Algava, A., Blanco López, M. A. y Trapero Casas, A. (1998)** Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. *Eur. J. Plant Pathology* 104:347-357.
- Sanford, G. B. (1926)** Some factors affecting the pathogenicity of *Actinomyces scabies*.

*Phytopathology* 16:525-547.

- Sang, J. P., Minchinton, I. R., Johnstone, P. K. y Trustcott, R. J. W. (1984)** Glucosinolate profile in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed and swede. *Can. J. Plant Sci.* 64:77-93.
- Santos-Antunes A. F. (1999)** *Acortamiento del periodo juvenil en olivo mediante técnicas de forzado de crecimiento y elección de genitores.* Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 205 pp.
- Sarah, J. L., Sabatini, C. y Boisseau, M. (1993)** Differences in pathogenicity to banana (*Musa* sp., cv. poyo) among isolates of *Radopholus similis* from different production areas of the world. *Nematropica* 23:75-79.
- Sarwar, M., Kirkegaard, J. A., Wong, P. T. W. y Desmarchelier, J. M. (1998)** Biofumigation potential of brassicas. III. In vitro toxicity of isothiocyanates to soil-borne fungal pathogens. *Plant Soil* 201:103-112.
- Sasanelli, N., Fontanazza, G., Lamberti, F., D'Addabbo, T., Patumi M. y Vergari G. (1997)** Reaction of olive cultivars to *Meloidogyne* species *Nematol. mediterr.* 25:183-190
- Sasser, J. N. (1979)** Pathogenicity, host ranges and variability in *Meloidogyne* species. pp. 257-268. En: *Root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. (Lamberti, F. y Taylor, C. E., eds.) Academic Press, London.
- Sauerborn, J., Linke, K. H., Saxena, M. C. y Koch W. (1989)** Solarization, a physical control method for weeds and parasitic plants (*Orobancha* spp.) in Mediterranean agriculture. *Weed Res.* 29:391-397
- Savino, V., Barba, M., Gallitelli, D. y Martelli, G. (1979)** Two nepoviruses isolated from olive in Italy. *Phytopath. mediterr.* 18:135-142.
- Savino, V. y Gallitelli, D. (1981)** Cherry leafroll virus in olive. *Phytopath. mediterr.* 20:202-203.
- Savino, V., Gallitelli, D., Barba, M. (1983)** Olive latent ring spot virus, a newly recognized virus infecting olive in Italy. *Ann. appl. Biol.* 103:243-249.
- Savino, V., Murolo, O., Di Terlizzi, B., Digiaro, M. y D'Onghia, A. M. (1995)** Certificazione delle produzioni vivaistiche frutticole in Puglia: da strumento di prevenzione a mezzo di promozione della qualità. *Rivista di Frutticoltura.* 57:33-39.

- Sayre, R. M., Patrick, Z. A. y Thorpe, H. J. (1965)** Identification of a selective nematicidal component in extracts of plant residues decomposing in soil. *Nematologica* 11:263-268.
- Schenk, N. C. y Kinloch, R. A. (1980)** Incidence of mycorrhizal fungi on six fields crops in monoculture on a newly clear woodland site. *Mycologia* 72:445-456.
- Schreiner, R. P. y Bethlenfalvay, G. J. (1997)** Plant and soil response to single and mixed species of arbuscular mycorrhizal fungi under fungicide stress. *Appl. Soil Ecol.*7:93-102.
- Sconamiglio, A., Talamè, M. y Giandomenico, N. (1968)** Indagine sui nematodi viventi nella rizosfera dell'olivo (1º contributo) *Boll. Lab. Ent. agr. "Filippo Silvestri", Portici* 26:205-226.
- Scotto La Massese, C. (1972)** New hosts and new location of *Cacopaurus pestis*. *FAO Plant Protection Bulletin* 20:21.
- Scotto La Massese, C. (1973)** Nouvel hôte et nouvelle localisation de *Rotylenchulus macrodoratus* (Dasgupta, Raski et Sher, 1968). *Nematol. medit.* 1:55-59.
- Seinhorst, J. W. (1959)** A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4:67-69.
- Seinhorst, J. W. (1962)** On the killing, fixation and transferring to glycerine of nematodes. *Nematologica* 8:29-32.
- Seinhorst J. W. (1969)** The relationships between population increase and populations density in plant parasitic nematodes, III & IV. *Nematologica* 13:429-442.
- Seinhorst, J. W. (1977)** *Pratylenchus fallax* C.I.H. Descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 7, No. 100. Slough, UK. CAB International. 2 pp.
- Seinhorst, J. W. (1979)** Nematodes and growth of plants: formalization of the nematode-plant system. pp. 231-256. En: *Root-knot nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control*. (Lamberti, F. y Taylor, C.E., eds.). London, Academic Press.
- Serr, E. F. y Day, J. H. (1949)** Lesion nematode to California fruit and nut trees, and comparative tolerance of various species of Juglandaceae. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 53:134-140.

- Serrhini, M. N. y Zeroual, A. (1995)** The Verticillium of the olive tree in Morocco. *Olivae* 58:58-62.
- Seshadri, A. R. (1964).** Investigations on the biology and life cycle of *Criconemoides xenoplax* Raski, 1952 (Nematoda: Criconematidae). *Nematologica* 10:540-562.
- Sethi, C. L., Ganz, M. S., Kauslial, K. K., Srivastava, A. N. y Khan, E. (1988)** Occurrence of root-knot nematodes of fruit plants in association with *Agrobacterium tumefaciens*. *Int. Nematol. Network Newsl.* 5:12-13.
- Shafiee, M. F. y Jenkins, W. R. (1963)** Host-parasite relationships of *Capsicum frutescens* and *Pratylenchus pen etrans*, *Meloidogyne incognita acrita* and *M. hapla*. *Phytopathology* 53:325-328.
- Shaner, G., E. L. Stromberg, G. H. Lacy, K. R. Barker y T. P. Pirone (1992)** Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:47-66.
- Sharma, G. C. y Sharma, N. K. (1987)** Effect of *Paratylenchus prunii* and *Meloidogyne incognita* on peach seedlings. *Nematol. medit.* 16:117
- Sharon, E. y Spiegel, Y. (1993)** Glycoprotein characterization of the gelatinous matrix in the Root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *J. Nematol* 25:585-589.
- Sharpe, R. R., Pusey, P. L., Nyczepir, A. P., Florkowski, W. J. (1993)** Influence of soil fumigation, rootstocks and time of pruning on peach yield and economics in peach tree short life orchards. *J. Prod. Agric.*6:241-244.
- Shepherd, J. A. y Barker, K. R. (1990)** Nematode parasites of tobacco and tomato plants to root knot nematode infection. *Tob. Res.* 14:51-57.
- Shetty, K. G., Subbarao, K. V., Huisman, O. C. y Hubbard, J. C. (2000)** Mechanism of broccoli-mediated Verticillium Wilt reduction in cauliflower. *Phytopathology* 90:305-310.
- Shukla, P. K., Haseeb, A. y Srivastava, N. K. (1998)** Influence of pH on reproduction and damage potential of *Pratylenchus thornei* on *Mentha piperita*. *Fundam. appl. Nematol.* 21:103-105.
- Shurtleff, M. C. y Averre, C. W. (2000)** *Diagnosing Plant Diseases Caused by Nematodes*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 187 pp.
- Siddiqi, M. R. (2000)** *Tylenchida. Parasites of Plants and Insects*. CAB International. 508

pp.

- Sidhu, G. S. y Webster, J. M. (1981)** The genetics of plant-nematode parasitic systems. *Bot. Rev.* 47:387-419.
- Sieverding, E. (1991)** *Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems*. Deutsche GTZ, Eshborn, Germany. 42 pp.
- Sijmons, P. C., Grundler, F. M. W., VonMende, N., Burrows, P. R., Wyss, U. (1991)** *Arabidopsis thaliana* as a new model for plant-parasitic nematodes. *Plant J.* 1:245-254.
- Silveira, H. L., Gomes, R., Aguiar, L., Caixinhas, M. L., Bica, J. y Bica M. (1990)** Soil solarization and polyethylene film: Cultivation of lettuce and onions. *Plasticulture* 85:35-42
- Singh, S. P., Pant, V., Khan, A. M. y Saxena, S. K. (1983)** Attractiveness of *Meloidogyne incognita* larvae to roots of tomato and changes in biochemical content of plants as affected by oilcakes and nematicides. *Nematol. medit.* 11:115-118.
- Sitaramaiah, K. y Singh, R. S. (1974)** The possible effects on *Meloidogyne javanica* of phenolic compounds produced in amended soil. *J. Nematol.* 6:152 (Res.).
- Sitaramaiah, K. y Singh, R. S. (1977)** Effect of atmosphere of amended soil on larval hatch of *Meloidogyne javanica* and its subsequent parasitic capacity. *Indian J. Nematol.* 7:163-166.
- Sitaramaiah, K. y Singh, R. S. (1978)** Effect of organic amendment on phenolic content of soil and plant response of *Meloidogyne javanica* and its host to related compounds. *Plant Soil* 50:671-679.
- Smith, G. S. (1987)** Interactions of nematodes with mycorrhizal fungi. pp. 292-300. En: *Vistas on Nematology* (Veech, J. A. y Dickson, D. W., eds.). Soc. Nematol., Hyattsville, MD.
- Smith, G. S. y Kaplan, D. T. (1988)** Influence of mycorrhizal fungus, phosphorus, and burrowing nematode interactions on growth of rough lemon citrus seedlings. *J. Nematol.* 20:539-544.
- Smith, G. S., Hussey, R. S. y Roncadori, R. W. (1986)** Penetration and postinfection development of *Meloidogyne incognita* on cotton as affected by *Glomus intraradices* and phosphorus. *J. Nematol.* 18:429-435.

- Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973)** *Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco. 573 pp.
- Sosa Moss, C. y Weihs, A. H. (1973)** Uso de la melaza de caña en frijol ejotero para combatir *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood (Nematoda: Heteroderidae). *Nematropica* 3:18-19.
- Soulas, M. L., Le Bihan, B., Camporota, P., Jarros, C., Salerno, M. I. y Perrin, R. (1997)** Solarization in a forest nursery: effect on ectomycorrhizal soil infectivity and soil receptiveness to inoculation with *Laccaria bicolor*. *Mycorrhiza* 7 :95–100
- Southey, J. F. (1986)** *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Her Majesty's Stationery Office Publications Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London, 202 pp.
- Stapleton, J. J. y De Vay, J. E. (1982)** Effect of soil solarization on populations of selected soilborne microorganisms and growth of deciduous fruit tree seedlings. *Phytopathology* 72:323-326.
- Stapleton, J. J. y De Vay, J. E. (1984)** Thermal components of soil solarization as related to changes in soil, and root microflora and increased plant growth responses. *Phytopathology* 74:255-259.
- Stapleton, J. J., Quick, J. y DeVay, J. E. (1985)** Soil solarization: Effects on soil properties, crop fertilization and plant growth. *Soil Biol. Biochem.* 17:369-373
- Stapleton, J. J., Lear, B. y DeVay J. E. (1987)** Effect of combining soil solarization with certain nematicides on target and nontarget organisms and plant growth. *Ann. Appl. Nematol.* 1:107-112.
- Stapleton, J. J., Ferguson, L., McKenry, M. V., Dougherty, D. S. y Stapleton S. C. (1999)** Using solarization to disinfest soil for olive nursery production. pp. 589-591. En: *Acta Hort. 474: Proceedings of the III ISHS International Symposium on Olive Growing* (Metzidakis, I. T. y Voyiatzis, D. G., eds.). ISHS, Leuven, Bélgica.
- Stephan, Z. A. (1982)** The influence of temperature and storage time on eggs of four species of *Meloidogyne*. *Nematol. medit.* 10:167-173.
- Stirling, G. R. (1991)** *Biological control of plant parasitic nematodes*. CAB International, Brisbane, Australia. 282 pp.
- Stirling, G. R. y Mankau, R. (1977)** New fungal parasites of *Meloidogyne* spp. *J. Nematol.*

9:285-286.

- Stirling, G. R., McKenry, M. V. y Mankau, R. (1979)** Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on peach. *Phytopathology* 69:806-809.
- Stoffelen, R., Jimenez, M. I., Dierckxsens, C., Tam, V. T. T., Swennen. R., De Waele, D. (1999)** Effect of time and inoculum density on the reproductive fitness of *Pratylenchus coffeae* and *Radopholus similis* populations on carrot disks. *Nematology* 1:243-250.
- Sturhan, D. y Brzeski, M. W. (1991)** Stem and Bulb Nematodes, *Ditylenchus* spp. pp. 423-464. En: *Manual of Agricultural Nematology* (Nickle, W., ed). Marcel Dekker, Inc., New York.
- Subbarao, K. V. y Hubbard, J. C. (1996)** Interactive effects of broccoli residue and temperature on *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil and on wilt in cauliflower. *Phytopathology* 86:1303-1310.
- Sutter, E. G. (1994)** Olive cultivars and propagation. pp. 23-29. En: *Olive Production Manual* (Ferguson, L., Sibbett, G. S. y Martin, G. C., eds.) University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3353.
- Swarup, G. y Sosa-Moss, C. (1990)** Nematode Parasites of Cereals Plants. pp. 109-136. En: *Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. (Luc, M. Sikora, R. A. y Bridge, J., eds.) CAB International Wallingford, UK.
- Sylvia, D. M. (1998)** Mycorrhizal symbioses. pp. 408-426. En: *Principles and Applications of Soil Microbiology*. (Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. y Zuberer, D. A., eds.). Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Sylvia, D. M. y Williams, S. E. (1992)** Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stresses. pp. 101-124. En: *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. (Bethlenfalvay, G. J. y Linderman, R. G., eds.) American Society of Agronomy, Inc., Spec. Publ. Madison, Wisconsin, USA.
- Sylvia, D. M. y Chellemi, D. O. (2001)** Interactions among root-inhabiting fungi and their implications for biological control of root pathogens. *Advan. Agron.* 73:1-33.
- Szczygiel, A. y Danek, J. (1976)** Experiments on the harmfulness of (the nematode) *Pratylenchus penetrans* (Cobb) to generative rootstocks of fruit trees *Prace Instytutu Sadownictwa* 19:153-166.

- Szczygiel, A. y Rebandel, Z. (1991)** Wpływ korzeniaka szkodliwego (*Pratylenchus penetrans*) na wzrost i plonowanie wisny. *Prace z Zakresu Nauk Rolniczych* 65:199-209.
- Talavera, M. y Tobar Jiménez, A. (1997)** Plant parasitic nematodes from unirrigated fields in Alhama, southeastern Spain. *Nematol. medit.* 25:73-81.
- Talavera, M., Magunacelaya, J. C. y Tobar, A. (1999)** Plant parasitic nematodes from a forest tree nursery in southern Spain with some notes about the influence of soil storage on the quantitative recovery of *Meloidogyne arenaria*. *Nematology* 1:261-266.
- Tamietti, G. y Valentino, D. (2000)** Effectiveness of soil solarization against soil-borne plant pathogens and weeds in Piedmont (Northern Italy). pp. 151-156. En: *Acta Hort. 532: Proceedings of the International Symposium on chemical and non-chemical soil and substrate disinfections*. (Gullino, M. L. y Garibaldi, A., eds.). Pub. International Society for Horticultural Science. ISHS, Leuven, Bélgica.
- Tanda, A. S. y Atwal, A. S. (1988)** Effect of sesame intercropping against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in okra. *Nematologica* 34:484-492.
- Tarjan, A. C. (1961)** Attempts at controlling citrus burrowing nematodes using nematode-trapping fungi. *Proc. Soil Crop Sci. Soc. Fla.* 21:17-36.
- Tarjan, A. C. (1976)** Applications of systemic nematicides to trunks of trees. *J. Nematol.* 8:303.
- Tarjan, A. C. y O'Bannon, J. H. (1974)** Postplant Fumigation with DBCP for Citrus Nematode Control in Florida. *J. Nematol.* 6:41-48
- Tarkalson, D. D., Jolley, V. D. Robbins, C. W. y Terry, R. E. (1998)** Mycorrhizal colonization and nutrition of wheat and sweet corn grown in manure treated and not treated topsoil and subsoil. *J. Plant Nutr.* 21:1985-1999.
- Taylor, A. L. (1971)** *Introducción a la nematología vegetal aplicada*. FAO, Roma. 131 pp.
- Taylor, C. E. y Brown, D. J. F. (1997)** *Nematode vectors of plant viruses*. CAB International. Cambridge, UK. 286 pp.
- Taylor, S. A. y Jackson, R. D. (1986)** Temperature. pp. 927-940. En: *Methods of Soil Analysis Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. (Klute, A., ed.). American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI.

- Tefft, P. M. y Bone, L. W. (1985)** Plant-induced hatching of eggs of the soybean cyst nematode *Heterodera glycine*. *J. Nematol.* 17:275-279.
- Teva, M. (2000)** Control de *Pratylenchus vulnus*, el nematodo lesionado de raíz, mediante tratamientos de termoterapia de plantones de olivo. Trabajo Profesional Fin de Carrera. ETSIAM Córdoba. 129 pp.
- Thanassoulopoulos, C. C. (1993)** Spread of Verticillium wilt by nursery plants in olive groves in the Halkidiki area (Greece). *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 23:517-520.
- Thanassoulopoulos, C. C., Biris, D. A. y Tjamos, E. C. (1979)** Survey of verticillium wilt of olive trees in Greece. *Plant Dis. Reprtr.* 63:936-940.
- Thomason, I. J. (1987)** Challenges facing nematology: environmental risks with nematicides and the need for new approaches. pp. 469- 476. En: *Vistas on Nematology* (Veech, J. A. y Dickson, D. W., eds.). Soc. Nematol., Hyattsville, MD.
- Thomason, I. J. y Caswell, E. P. (1987)** Principles of nematode control. pp. 87-130. En: *Principles and Practice of Nematode Control in Crops* (Brown, R. H. y Kerry, B. R., eds). Academic Press, Sidney.
- Thomason, I. J., Rich, J. R. y O'Melia, F. C. (1976)** Pathology and histopathology of *Pratylenchus scribneri* infecting snap bean and lima bean. *J. Nematol.* 8:330-335.
- Thurston, H. D. (1990)** Plant disease management practices of traditional farmers. *Plant Dis.* 74:96-102.
- Tjamos, E. C. (1983)** Prospects for controlling Verticillium Wilt of olive trees by soil solarization. p. 15 (Res.) En: *Hellenic Congress on Plant Diseases*. Atenas, Grecia.
- Tjamos, E. C. y Paplomatas, E. J. (1988)** Long term effect of soil solarization in controlling *Verticillium* wilt of globe artichokes in greece. *Plant pathol.* 37:507-515
- Tjamos, E. C., Graniti, A., Smith, I. M. y Lamberti, F. (1993)** Conference on olive diseases. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 23:365-550.
- Tobar Jiménez, A., Salmerón Parra, T, y Martínez Sierra, V. (1984)** Los nematodos del suelo, factor limitante grave para el desarrollo agrario de Andalucía. *Bol. San. Veg., Plagas* 10:117-151.
- Townshend, J. L. (1990)** Growth of 'Bartlett' pear seedlings in response to number of root-lesions nematodes and temperature. *HortSci.* 25:318-320.

- Townshend, J. L., L. Stobbs y R. Carter (1989)** Ultrastructural pathology of cells affected by *Pratylenchus penetrans* in alfalfa roots. *J. Nematol.* 21:530-539.
- Trapero, A. y Blanco, M. A. (1998)** Enfermedades. En: *El Cultivo del Olivo* (Barranco, D., Fernández-Escobar, R. y Rallo, L., eds.) pp. 469-515. Junta de Andalucía - Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Triantaphyllou, A. C. (1987)** Genetics of nematode parasitism of plants. pp. 354-363. En: *Vistas in nematology* (Veech J. A. y Dickson, D. W., eds.) Soc. Nematol., Hyattsville, MD.
- Tribe, H. T. (1977)** Pathology of cyst-nematodes. *Biol. Rev.* 52:477-507.
- Trudgill D. L. (1967)** The effect of environment on sex determination in *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* 13:263-272.
- Tsao, P. H., Martin, J. P. y Davis, R. M. (1989)** The citrus replant problem. pp. 261-279. En: *The citrus industry* (Reuther, W., Ed.). Univ. California, Statewide Integrat. Pest Manage. Proj., Div. Agric. Natural Resour., Berkeley, CA.
- Tudor, M. E. y McKenry, M. V. (1989)** Unravelling the various nematocidal activities within aqueous extracts of plant refuse. *J. Nematol.* 21:592.
- Uhlenbroek, J. H. y Bijloo, J. D. (1959)** Investigations on nematocides. II. Structure of a second nematocidal principle isolated from *Tagetes* roots. *Recueil des Trafaux Chimiques des Pays-Bas et de la Belgique.* 78:382-390.
- Upadhyaya, K. D. y Swarup, G. (1981)** Growth of wheat in the presence of *Merlinius brevidens* singly and in combination with *Tylenchorhyncus vulgaris*. *Ind. J. Nematol* 11:42-46.
- Valcarce, E. y Laborda, E. (1980)** Estudio de la nematofauna de viveros de agríos. *An. Edaf. Agrobiol.* 39:2093-2099.
- Van der Boogert, P. H. J. F., Velvis, H., Hetteema, C. H. y Bouwman, L. A. (1994)** The role of organic matter in the population dynamics of the endoparasitic nematophagous fungus *Drechmeria coniospora* in microcosms. *Nematologica* 40:249-257.
- Van der Laan, P. A. (1956)** The influence of organic manuring on the development of the potato eelworm, *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* 1:112-115.

- Varea, S., García-Vallejo, M. C., Cadahía E. y Fernández de Simón, B. (2001)** Polyphenols susceptible to migrate from cork stoppers to wine. *Eur. Food Res. Technol.* 213:56–61
- Varo-Alcalá, J., Tobar-Jiménez, A. y Muñoz-Medina, J. M. (1970)** Lesiones causadas y reacciones provocadas por algunos nematodos en las raíces de ciertas plantas. *Rev. Ibér. Parasitol.* 30:547-556.
- Vega, E. (1973)** Tratamiento contra *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae) de barbados de vid. *Idia* 303:15-20.
- Verdejo, S. y Pinochet, J. (1991)**. Nematodos asociados a plantones de frutales y cítricos en viveros comerciales. *Invest. Agr.: Prod. Veg.* 6:379-385.
- Verdejo, S., Sorribas, F. J., Pons, J., Forner, J. B. y Alcaide, A. (1997)** The mediterranean biotypes of *Tylenchus semipenetrans* in Spanish citrus orchards. *Fundam. appl. Nematol.* 20:399-404.
- Viaene, N. M. y Abawi, G. S. (1998)** Management of *Meloidogyne hapla* on lettuce in organic soil with sudangrass as a cover crop. *Plant Dis.* 82:945-952.
- Vlachopoulos, E. (1991)** Nematode species in nurseries of Greece. *Annls. Inst. phytopath. Benaki* 16:115-122.
- Vouyoukalou, E. (1994)** Use of green leaves from olive trees as soil amendment for control of *Meloidogyne* *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 24:485-488.
- Vouyoukalou, E. y Stefanoudaki, E. (1998)** Nematicidal activity of waste water from olive oil-mills. *Nematol. medit.* 26:157-160.
- Vovlas, N. (1982)**. *Macroposthonia sicula* n. sp. (Nematoda: Criconeematidae), a parasite of olive trees in Sicily. *J. Nematol.* 14:95-99.
- Vovlas, N. (1983)** Gall Formation on *Pistacia vera* by *Rotylenchulus macrodoratus*. *J. Nematol.* 15:148-150.
- Vovlas, N. y Lamberti, F. (1974)** Nuovi ospiti naturali di *Rotylenchulus macrodoratus* Dasgupta, Raski & Sher, 1968 nella regione mediterranea. *Nematol. medit.* 2:177-179.
- Vovlas, N. e Inserra, R. N. (1978)** The systematic position of *Praytlenchoides ritteri* Sher with observations on its embryogenic development. *Nematol. medit.* 6:49-56.

- Vovlas, N., Cham, S., (1981).** Scanning electron microscope observations on the morphology of *Tylenchorhynchus aduncus*. *Nematol. mediterr.* 9:91-97.
- Vovlas, N. e Inserra, R. N. (1981)** Parasitic habit of *Ogma rhombosquamatum* and description of the male. *J. Nematol.*13:87-90.
- Vovlas, N. y Laritza, A. (1994)** Embryogenic patterns and parasitic habits of *Helicotylenchus oleae* and *H. pseudorobustus*. *Afro-Asian J. Nematol.* 4:17-21.
- Vovlas, N., Inserra R. y Lamberti F. (1975)** Risanamento di piantoni di arancio amaro, olivo e vite infestati da nematodi. pp. 271-277 En: *Atti Giornate Fitopatologiche 1975*.
- Vrain, T. C. (1978)** Influence of chilling and freezing temperatures on infectivity of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla*. *J. Nematol.* 10:177-180.
- Wallace, H. R. (1968)** The influence of soil moisture on survival and hatch of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 14:231-242.
- Wallace, H. R. (1974)** The influence of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, on photosynthesis and on nutrient demand by roots of tomato plants. *Nematologica* 20:27-33.
- Wallace, H. R. (1987)** Effects of nematode parasites on photosynthesis. pp. 253-259. En: *Vistas in nematology* (Veech, J. A. y Dickson, D. W., eds.). Soc. Nematol., Hyattsville, MD.
- Wang, H., Parent, S., Gosselin, A. y Desjardins, Y. (1993)** Study of vesicular-arbuscular mycorrhizal peat-based substrates on symbioses establishment, acclimatization and growth of three micropropagated species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 118:896-901
- Webster, J. M. (1987)** Introduction. pp. 1-11. En : En *Principles and Practice of Nematode Control in Crops* (Brown, R. H. y Kerry, B. R., eds). Academic Press, Sidney.
- Welsh, M. F. (1976)** Control of stone fruit virus diseases. pp. 10-15. En: *Virus diseases and non infectious disorders of stone fruits in North America*. Agriculture Handbook Nº 437, Agricultural Research Service. Washington.
- Weltzien, H. C. (1992)** Biological Control of Foliar Fungal Diseases with Compost Extracts. pp. 430-449. En: *Microbial Ecology of Leaves*. (Andrews, J. H. y Hirano, S. S., eds.)

Springer-Verlag, Berlin.

- Westcott, S. W. I. y Burrows, P. M. (1991)** Degree-day Models for Predicting Egg Hatch and Population Increase of *Criconebella xenoplax*. *J. Nematol.* 23:386-392.
- Westcott, S. W. I. y Zehr, E. I. (1991)** Evaluation of Host Suitability in *Prunus* for *Criconebella xenoplax*. *J. Nematol.* 23(4): 393-401.
- Westcott, S. W. I. y Hussey, R. S. (1992)** Feeding behavior of *Criconebella xenoplax* in monoxenic cultures. *Phytopathology* 82:936-940.
- Wheeler, T. A. y Riedel, R. M. (1994)** Interactions among *Pratylenchus penetrans*, *P. scribneri*, and *Verticillium dahliae* in the potato early dying disease complex. *J. Nematol.* 26:228-234.
- Whitehead, A. G. (1980)** Nematode control with special reference to non-fumigant nematicides. pp. 1-17. En: *Factors affecting the application and use fo nematicides in Western Europe*. Workshop, Nematology Group Association of Applied Biologists, Junio 1980.
- Whitehead, A. G. (1998)** *Plant nematode control*. CAB International, Wallingford. 384 pp.
- Wilcox-Lee, D. A. y Loria, R. (1986)** Water relations, growth, and yield in two snap bean cultivars infected with root-knot nematode *Meloidogyne hapla* (Chitwood). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*111:34-38.
- Wilcox-Lee, D. A. y Loria, R. (1987a)** Effects of soil moisture and root-knot nematode, *Meloidogyne hapla* (Chitwood), on water relations, growth and yield in snap bean. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*112:629-633.
- Wilcox-Lee, D. A. y Loria, R. (1987b)** Effects of nematode parasitism on plant-water relations. pp.260-266. En: *Vistas in nematology* (Veech, J. A. y Dickson, D. W., eds.). Soc. Nematol., Hyattsville, MD.
- Wilson, E. E. y Ogawa, J. M. (1978)** *Fungal, bacterial, and certain non parasitic diseases of fruit and nut crops in California*. Division of Agricultural Sciences. University of California. Berkeley, 190 pp..
- Windham, G. L. (1998)** Corn. pp. 637-684. En *Plant and Nematode Interactions* (Barker, K. R., Pederson, G. A. y Windham, G. L., eds.) American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

- Wolny, S. (1989)** [Preliminary estimation of pathogenicity of root-lesion nematode (*Pratylenchus neglectus* Rensch, 1924) on spring barley] *Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roslin* 31, 41-51.
- Woodville, H. C. (1972)** *Hot-water treatment of plant material*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Bulletin 201. Weels KPL Swindon Press, Swindon. 46 pp.
- Wright, D. J. (1981)** Nematicides: Mode of action and new approaches to chemical control. pp., 421-449. En: *Plant Parasitic Nematodes, Vol III* (Zuckerman, B. M. y Rohde, R. A., eds.). Academic Press, London & New York.
- Wu, Y, Perry, K. B. y Ristaino, J. B. (1996)** Estimating temperature of mulched and bare soil from meteorological data. *Agr. Forest Meteorol.* 81:299-323.
- Wyss, U., Grundler, F. M. W. y Münch, A. (1992)** The Parasitic Behaviour of Second-Stage Juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38:98-111.
- Xiao, C. L., Subbarao, K. V., Schulbach, K. F. y Koike S. T. (1998)** Effects of crop rotation and irrigation on *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil and wilt in cauliflower. *Phytopathology* 88:1046-1055.
- Yang, B. J. y Zhong, X. W. (1980)** The identification of root-knot nematodes in *Olea europaea*. *Scient. Silv. Sinic.* 16:264-265.
- Yeates, G. W. (1999)** Effects of plants on nematode community structure. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:127-149.
- Yeates, G. W. y Bongers, T. (1999)**. Nematode diversity in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 74:113-135.
- Yocom, D. H. (1985)** VA mycorrhizae and host plant reproduction: a study with green peppers. pp. 298-299. En: *Proc. of the 6<sup>th</sup> North American Conference on Mycorrhizae*. Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis OR.
- Zehr, E. I. (1985)** Evaluation of parasites and predators of plant parasitic nematodes. *J. Agr. Entomol.* 2:130-134.
- Zehr, E. I., Lewis, S. A. y Gambrel, C. E. Jr. (1982)** Effectiveness of certain nematicides for control of *Macrophostonia xenoplax* and short life of peach trees. *Plant Dis.* 66:225-228.

- Zehr, E. I., Aitken, J. B., Scott, J. M. y Meyer, J. R. (1990a)** Additional hosts for the ring nematode, *Criconebella xenoplax*. *J. Nematol* 22:86-89.
- Zehr, E. I., Whittington, D. P. y Scott, J. M. (1990b)** Suppression of the nematode *Criconebella xenooplax* with orchard vegetation. pp. 28-30. En: *Proceedings of the Stone Fruit Decline Workshop*. University of California, Parlier, California. Vol 4.
- Zhang, F. y Noe, J. P. (1997)** Potential fungal biocontrol agents isolated from chicken manures and litter. *J. Nematol.*29:616 (Res.).
- Zunke, U. (1990)** Observations on the Invasion and Endoparasitic Behavior of the Root Lesion Nematode *Pratylenchus penetrans*. *J. Nematol.* 22:309-320

